



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRO-ORGANISMOS

## **Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes na infecção pelo *Zika virus (Flaviviridae)***

**LETÍCIA TRINDADE ALMEIDA**

**OURO PRETO  
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRO-ORGANISMOS

## **Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes na infecção pelo *Zika virus* (*Flaviviridae*)**

**LETÍCIA TRINDADE ALMEIDA**

**ORIENTAÇÃO: PROF<sup>a</sup> CINTIA LOPES DE BRITO MAGALHÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular

**OURO PRETO  
2020**

## SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

A447a Almeida, Letícia Trindade .

Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes na infecção pelo Zika virus (Flaviviridae). [manuscrito] / Letícia Trindade Almeida. - 2020.

71 f.: il.: color., gráf., tab., mapa.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães.

Tese (Doutorado). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Vírus da Zika . 2. Stress oxidativo. 3. Antioxidantes. I. Magalhães, Cintia Lopes de Brito. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 616.92/93

Bibliotecário(a) Responsável: Celina Brasil Luiz - CRB6-1589



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
REITORIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Letícia Trindade Almeida**

**Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes na infecção pelo Zika virus (Flaviviridae)**

Membros da banca

Daniela Caldeira Costa - doutora - Universidade Federal de Ouro Preto  
Mauro César Isoldi - doutor - Universidade Federal de Ouro Preto  
Jaqueline Maria Siqueira Ferreira - doutora - Universidade Federal de São João Del Rey  
Giliane de Souza Trindade - doutora - Universidade Federal de Minas Gerais

Versão final

Aprovado em 27 de março de 2020

De acordo

Professor (a) Orientador (a) Cintia Lopes de Brito Magalhães



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Lopes de Brito Magalhães, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 31/07/2020, às 11:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufop.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0071542** e o código CRC **8AC3797C**.

**Referência:** Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.005439/2020-78

SEI nº 0071542

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000  
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

*Aos meus pais Mônica Trindade  
e Wellington de Almeida pelo amor,  
compreensão e suporte de sempre.*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao meu pai, Wellington de Almeida, por toda torcida, carinho e amor incondicional.

Te perder bem no meio dessa jornada foi muito difícil, mas o Sr. de alguma forma, sempre me motivou a querer continuar e concluir esse trabalho da melhor forma possível.

Pai, o Senhor pode se orgulhar de ter uma filha doutora!!!

Amo você!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Professora Cintia por todos esses anos de orientação e parceria. Obrigada por confiar em mim para a realização de mais esse trabalho e por compartilhar seu conhecimento comigo. Não teria me tornado a profissional que sou hoje sem seu apoio e orientação verdadeira.

A minha mãe, Mônica, que sempre foi meu porto seguro e a quem eu recorria nos momentos de desespero. Obrigada pelo seu amor e por estar presente me encorajando a continuar. Essa conquista também é sua, mãe.

Ao meu noivo, Tiago, pelo companheirismo, amor, parceria e paciência. Obrigada por acreditar em mim, por sempre me aconselhar com sua maturidade, e dizer as palavras certas quando precisei, mesmo de longe.

A minha irmã, Ana Carolina (Nem/Saraiva), pela parceria incondicional e por sempre estar ao meu lado.

A todos os colegas do LBTM, em especial, as minhas amigas Erica, Bruna, Samille por tornarem a rotina de trabalho mais leve e muito mais divertida. Vou sentir muita falta de vocês, minhas “Perfect Friends”.

A todos os alunos do grupo da professora Cintia, as “Cintilantes”, especialmente, Rafaela, Marília e Camila que foram minhas companheiras durante esses quatro anos e que me auxiliaram tanto na realização dos experimentos como na troca de conhecimentos. Ainda, gostaria de agradecer, de forma mais especial, a Ariane, minha B1. Não podia ter escolhido pessoa melhor para ser minha parceira direta na realização dos experimentos. Obrigada por encarar o desafio de enfrentar os “crazyblacks” comigo, por passar dias de semana e finais de semana na bancada e no biotério, por sempre estar disponível para me ajudar no que fosse necessário. Já sinto falta dos nossos áudios longos discutindo resultados, anatomia, histologia, cálculos de diluição e até situações da vida mesmo. Além de parceira de trabalho, você se tornou uma grande amiga!

Aos professores do LBTM, Silvana e Breno, que juntamente com a professora Cintia, abriram as portas do laboratório para mim e sempre estiveram disponíveis para me auxiliar no que fosse necessário.

As “Anas” da minha vida, A. Cláudia, A. Luísa e A. Maria, pela amizade de longa data. Cada uma com seu jeito diferente e especial me ensinaram muitas coisas.

Juntas, vivenciamos vários momentos tão especiais que ficarão comigo para sempre. Vocês são inesquecíveis!

A minha amiga Carolina Moraes, que além de ser uma grande amiga me presenteou com um sobrinho postigo o João Henrique. Obrigada por tudo Carrol!

Aos meus amigos Carol e Luiz Paulo pela torcida e pelas boas energias de sempre. Mesmo de longe eu sentia vocês pertinho de mim!

As minhas queridas “Bem Boladas” pela convivência diária, troca de experiências e muitas risadas. Vocês não imaginam o quanto eu sinto falta de vocês!!!

A Universidade Federal de Ouro Preto e ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade e pelo ensino gratuito de qualidade.

À FAPEMIG, ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

E, por fim, agradeço a todos que torceram por mim... Muito obrigada!



## RESUMO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. A primeira epidemia do ZIKV no continente Americano foi reportada em 2015. Febre, exantema, artralgia, mialgia, cefaleia e conjutivite são alguns sintomas clássicos da doença causada por esse vírus. Entretanto, as epidemias mais atuais do ZIKV revelaram aspectos que até então não haviam sido relatados, como a microcefalia em bebês e a síndrome de Guillian-Barré em adultos. A emergência recente do ZIKV e sua associação com manifestações clínicas graves aumentaram a necessidade de mais estudos para elucidar a patogênese do vírus. Assim, compreender como o hospedeiro reage frente às infecções virais é de primordial importância, pois pode auxiliar na maior compreensão da patogênese viral, bem como na busca por estratégias de controle e/ou prevenção da doença. Nesse sentido, na tentativa de conter a infecção viral, muitas respostas do hospedeiro são elicitadas, dentre elas, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, dentre outras funções, atuam na defesa contra agentes infecciosos. No entanto, quando essas espécies estão em excesso e não são efetivamente neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante, podem ocasionar danos às estruturas celulares, incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos, num evento conhecido como estresse oxidativo. Para muitas infecções virais, incluindo infecções por flavivírus, estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo é fator importante na patogênese viral. Entretanto, o papel do estresse oxidativo na patogênese do ZIKV ainda precisa ser elucidado. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar se a infecção pelo ZIKV está relacionada com o estresse oxidativo e com modulação das vias antioxidantes celulares. Para tal, células neuronais U87-MG e hepáticas HepG2, susceptíveis e permissivas ao ZIKV, foram infectadas e 15 e 24 horas pós-infecção (hpi) foram avaliados a produção de ERO, os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo malondialdéido (MDA) e proteína carbonilada, a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) e a atividade do fator de transcrição (eritróide-2)- fator 2 (Nrf2). A infecção resultou, em ambas as linhagens celulares, num aumento significativo na produção de ERO e nos níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo. Ainda, foi observada uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e uma diminuição na ativação do fator de transcrição Nrf2. Juntos, esses resultados mostram que a infecção com o ZIKV *in vitro* resulta em um aumento na produção de ERO, estresse oxidativo e depleção de enzimas antioxidantes via inibição da sinalização de Nrf2. Em seguida, para verificar se a infecção *in vivo* com o ZIKV também seria capaz de causar estresse oxidativo e alterar as defesas antioxidantes, foram avaliados os mesmos parâmetros em cérebro e fígado de camundongos C57BL/6. Nos animais infectados 8 dias pós-infecção (dpi) foi observado no soro um aumento da atividade das transaminases hepáticas aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT) e no fígado e cérebro foram observados aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo e depleção nas enzimas antioxidantes. Assim, nossos resultados mostram que a infecção *in vitro* e *in vivo* pelo ZIKV leva a um aumento na produção de ERO, causa uma depleção do sistema de defesa antioxidante, culminando com estresse oxidativo. Embora mais estudos sejam necessários para melhor compreender como e quanto o desbalanço redox contribui para a patogênese do ZIKV, os resultados aqui obtidos chamam atenção para o caráter conspícuo do estresse oxidativo e depleção das enzimas antioxidantes na infecção pelo ZIKV, além de abrir perspectivas para futuras abordagens terapêuticas, especificamente àquelas baseadas em compostos antioxidantes capazes de reverter o dano oxidativo.

**ABSTRACT**

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that belongs to family Flaviviridae, genus Flavivirus. The first ZIKV epidemic in the American continent was reported in 2015. Fever, rash, arthralgia, myalgia, headache and conjunctivitis are some classic symptoms of the disease caused by this virus. However, the most current epidemics of ZIKV revealed aspects that had not been previously reported, such as microcephaly in babies and Guillian-Barré syndrome in adults. The recent emergence of ZIKV and its association with severe clinical manifestations has increased the need for further studies to elucidate the pathogenesis of the virus. Thus, understanding how the host reacts to viral infections is very important since it can assist in a greater understanding of viral pathogenesis as well as in the search for strategies to control and / or prevent the disease. In this sense, to contain viral infection, many responses from the host are elicited, among them, the production of reactive oxygen species (ROS), which, among other functions, acts in defense against infectious agents. However, when these species are in excess and are not effectively neutralized by the antioxidant defense system, they can cause damage to cellular structures, including lipids, proteins and nucleic acids, in an event known as oxidative stress. For many viral infections, including flavivirus infections, studies have shown that oxidative stress is an important factor in viral pathogenesis. However, the role of oxidative stress in the pathogenesis of ZIKV has yet to be elucidated. Thus, the objective of this study was to assess whether ZIKV infection is related to oxidative stress and modulation in cellular antioxidant pathways. For this, neuronal U87-MG and hepatic HepG2 cells, susceptible and permissive to ZIKV, were infected and 15 and 24 hours post-infection (hpi) were evaluated the production of ROS, the levels of the biomarkers of oxidative stress malondialdehyde (MDA) and carbonyl protein, the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and the activity of the transcription factor (erythroid-2) - factor 2 (Nrf2). The infection resulted, in both cell lines, in a significant increase in the production of ROS and in the levels of oxidative stress biomarkers. In addition, a decrease in the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT and a decrease in the activation of the transcription factor Nrf2 was observed. Together, these results show that infection with ZIKV *in vitro* results in an increase in the production of ROS, oxidative stress and depletion of antioxidant enzymes via inhibition of Nrf2 signaling. Then, to verify whether infection with ZIKV would also be able to cause oxidative stress and alter antioxidant defenses *in vivo*, the same parameters were evaluated in the brain and liver of C57BL/6 mice. We observed in infected animals, an increase in the activity of liver transaminases in the serum. In the liver and brain an increase in the biomarkers of oxidative stress and depletion in antioxidant enzymes was observed. Thus, our results show that ZIKV infection *in vitro* and *in vivo* leads to an increase in ROS production causing a depletion of the antioxidant defense system, culminating in oxidative stress. Although more studies are needed to better understand how and how much the redox imbalance contributes to the pathogenesis of ZIKV, the results obtained here call attention to the conspicuous character of oxidative stress and depletion of antioxidant enzymes in ZIKV infection, in addition opening perspectives for future therapeutic approaches, specifically those based on antioxidant compounds capable of reversing oxidative damage.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ALT**- Alanina aminotransferase  
**ARE**- Elementos de resposta antioxidante  
**AST**- Aspartato aminotransferase  
**BOD**- Demanda bioquímica de oxigênio  
**BSA**- Albumina do soro bovino  
**C**- Capsídeo viral  
**CAT**- Catalase  
**CCA**- Centro de Ciência Animal  
**cdNA** – DNA complementar  
**CEUA**- Comissão de Ética no Uso de Animais  
**CHIKV**- Vírus Chikungunya  
**CMC**- Carboximetilcelulose  
**CUL3**- Proteína Cullin-3  
**DENV**- Vírus da Dengue  
**DMEM**- Meio Dulbecco's Modified Eagle  
**DMSO**- Dimetilsulfóxido  
**DNP**- Dinitrofenilhidrazona  
**DNPH**- 2,4- Dinitrofenilhidrazina  
**E**- Envelope viral  
**ERO**- Espécies reativas de oxigênio  
**G6PD**- Glicose-6- fosfato desidrogenase  
**PGx**- Glutaciona peroxidase  
**GR**- Glutaciona redutase  
**GSSG**- Glutaciona oxidada  
**GSH**- Glutaciona Total  
**GST**- Glutaciona S-transferase  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**- Peróxido de hidrogênio  
**HBSS**- Solução Salina Equilibrada de Hanks  
**HCV**- Vírus da Hepatite C  
**HIV**- Vírus da Imunodeficiência Humana

**H&E**- Hematoxilina e Eosina  
**Hpi**- Horas pós- infecção  
**HO-1**- Heme oxigenase  
**IFN1**- Interferon tipo I  
**JEV**- Vírus da Encefalite Japonesa  
**μM**- micromolar  
**MAYV**- Vírus Mayaro  
**MDA**- Malondialdeído  
**MOI**- Multiplicidade de infecção  
**MTT**- (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)  
**NADPH**- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato  
**NOx**- NADPH oxigenase  
**NQO**- NADPH quinona oxidoreductase-1  
**Nrf2**- Fator de transcrição (eritróide-2)- fator 2  
**O<sub>2</sub>•-** Ânion superóxido  
**OH•**- Radical hidroxil  
**ORF**- Janela única de leitura  
**PrM**- Proteína pré-membrana viral  
**PBS**- *Phosphatebuffered saline*  
**RNA<sub>m</sub>**- RNA mensageiro  
**RPMI**- Meio Roswell Park Memorial Institute  
**RSV**- Vírus Respiratório Sincicial  
**SCZ**- Síndrome congênita do Zika  
**SDS**- Dodecil sulfato de sódio  
**SFB**- Soro fetal bovino  
**SGB**- Síndrome de Guillian-Barré  
**SINDV**- Vírus Sindbs  
**SOD**- Superóxido dismutase  
**TBARS**- Ácido tiobarbitúrico  
**TCA**- Ácido tricloroacético  
**UFP**- Unidades formadoras de placa  
**WNV**- Vírus do Oeste do Nilo  
**YFV**- Vírus da Febre Amarela

**ZIKV**- Vírus Zika

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela I:</b> Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado do amplificado e número de acesso no GenBank.....	33
--	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo ecológico dos arbovírus.....	2
<b>Figura 2:</b> Distribuição geográfica dos principais arbovírus de importância médica.....	4
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática das partículas virais dos Flavivírus.....	6
<b>Figura 4:</b> Genoma dos Flavivírus.....	7
<b>Figura 5:</b> Ciclo de multiplicação dos Flavivírus.....	9
<b>Figura 6:</b> Transmissão e manifestações clínicas do ZIKV.....	13
<b>Figura 7:</b> Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.....	17
<b>Figura 8:</b> Ativação da via de Nrf2 decorrente de uma infecção viral.....	20
<b>Figura 9:</b> Desenho experimental da etapa <i>in vivo</i> .....	31
<b>Figura 10:</b> Curva de ciclo único do ZIKV nas células U87-MG e HepG2.....	37
<b>Figura 11:</b> Produção de ERO nas células U87-MG e HepG2 infectadas com ZIKV.....	38
<b>Figura 12:</b> Estresse oxidativo em células U87-MG e HepG2 infectadas com ZIKV.....	39
<b>Figura 13:</b> Depleção no sistema antioxidante enzimático em células U87-MG e HepG2 infectadas .....	40
<b>Figura 14:</b> Inibição da ativação da via de Nrf2 em células U87-MG e HepG2 infectads com ZIKV.....	41
<b>Figura 15:</b> Taxas de sobrevivência, massa corporal e sinais clínicos em camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.....	42
<b>Figura 16:</b> Porcentagem de redução de unidades formadoras de placa em amostras de soro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.....	43
<b>Figura 17:</b> Níveis séricos das transaminases hepáticas AST e ALT em camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.....	44
<b>Figura 18:</b> Estresse oxidativo no fígado e no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.....	45
<b>Figura 19:</b> Diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT no fígado e no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.....	46
<b>Figura 20:</b> Representação esquemática dos possíveis fatores que contribuíram para o estabelecimento do estresse oxidativo após a infecção pelo ZIKV.....	55

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2- REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
2.1- Arbovírus .....	2
2.2- Família <i>Flaviviridae</i> , gênero <i>Flavivirus</i> .....	5
2.3- Vírus Zika .....	9
2.4- Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e estresse oxidativo .....	14
2.5- Estresse oxidativo e infecções virais.....	18
<b>3- OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1- Geral.....	23
3.2- Específicos .....	23
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
4.1- Células e vírus.....	24
4.2- Multiplicação e titulação do vírus.....	24
4.3- Curva de ciclo único em células HepG2 e U87-MG .....	25
4.4- Dosagem das ERO .....	25
4.5- Dosagem dos biomarcadores de estresse oxidativo .....	26
4.5.1- Preparo da amostra biológica .....	26
4.5.2- Dosagem de MDA.....	27
4.5.3- Dosagem de proteína carbonilada .....	27
4.6- Atividade das enzimas antioxidantes .....	28
4.6.1- Preparo da amostra biológica .....	28
4.6.2- Atividade total de SOD .....	28
4.6.3- Atividade de CAT .....	29
4.7 - Dosagem de proteínas totais .....	29
4.8- Ensaio de luciferase .....	29
4.9- Infecção experimental de camundongos C57BL/6.....	30
4.10- Histopatologia e imunohistoquímica .....	32



4.11- Titulação ZIKV fígado e cérebro.....	32
4.12- Detecção do genoma do ZIKV no fígado e cérebro por PCR em tempo real.....	33
4.13- Ensaio de soroneutralização.....	34
4.14- Dosagem da atividade das transaminases hepáticas .....	34
4.15- Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e no cérebro .....	34
4.16- Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes no fígado e no cérebro .....	35
4.17- Análise estatística.....	35
<b>5- RESULTADOS .....</b>	<b>36</b>
5.1- Curva de ciclo único do ZIKV em células U87-MG e HepG2.....	36
5.2- Produção de ERO em células U87-MG e HepG2.....	37
5.3- Avaliação do estresse oxidativo em células U87-MG e HepG2.....	38
5.4- Avaliação da atividade de SOD e CAT em células U87-MG e HepG2 .....	39
5.5- Avaliação da regulação da via Nrf2 pelo ZIKV em células U87-MG e HepG2 .....	41
5.6 - Sobrevida e sinais clínicos em camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV .....	41
5.7 –Avaliação da produção de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV .....	43
5.8- Avaliação da presença do vírus no fígado e cérebro dos animais infectados .....	44
5.9- Avaliação de dano hepático e neuronal provocado pela infecção pelo ZIKV .....	44
5.10- Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV .....	45
5.11- Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV .....	46
<b>6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>7- REFERÊNCIAS .....</b>	<b>56</b>
<b>8- ANEXOS .....</b>	<b>66</b>

## 1- INTRODUÇÃO

As viroses emergentes e re-emergentes chamam a atenção das autoridades sanitárias em todo o mundo, pois surgem como problemas de Saúde Pública importantes, tanto em áreas urbanas quanto em áreas rurais. Alterações no ecossistema e, principalmente, no comportamento humano podem propiciar a disseminação dessas viroses, que por sua vez, afetam toda a sociedade.

Nesse contexto, as doenças virais transmitidas por artrópodes (arboviroses) estão entre as mais preocupantes e para muitas dessas doenças não há tratamento específico e/ou vacinas disponíveis. Ainda, o combate aos vetores é muito difícil, pois eles estão altamente adaptados não só ao ambiente urbano como também aos hábitos de vida humanos.

O ZIKV é um exemplo de arbovírus emergente, que já causou doença, muitas vezes com sequelas graves, milhares de pessoas desde que foi isolado em 1947. Entretanto, muitos aspectos da sua patogênese permanecem desconhecidos.

Desse modo, tentar elucidar as respostas celulares desencadeadas após a infecção pelo ZIKV é de fundamental importância, pois poderão auxiliar no entendimento da patogênese desse vírus e nas medidas de prevenção e/ou controle da doença. Nesse sentido, trabalhos da literatura têm demonstrado que a infecção por vários patógenos, incluindo os vírus, está relacionada com alterações no sistema redox das células hospedeiras e que essas alterações podem ter papel chave na progressão das doenças por eles causadas. Assim, o objetivo desse trabalho foi investigar se a infecção *in vitro* e *in vivo* pelo ZIKV resulta em estresse oxidativo e altera as defesas antioxidantes celulares.

Para a etapa *in vitro* foram utilizadas células de linhagem neuronal (U87-MG) e hepática (HepG2) e para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6. De uma forma geral, observamos nos dois modelos que a infecção pelo ZIKV culmina com o estresse oxidativo e que provavelmente esse evento é decorrente de um aumento na produção de ERO e uma ineficiência do sistema antioxidante em neutralizar essas espécies.

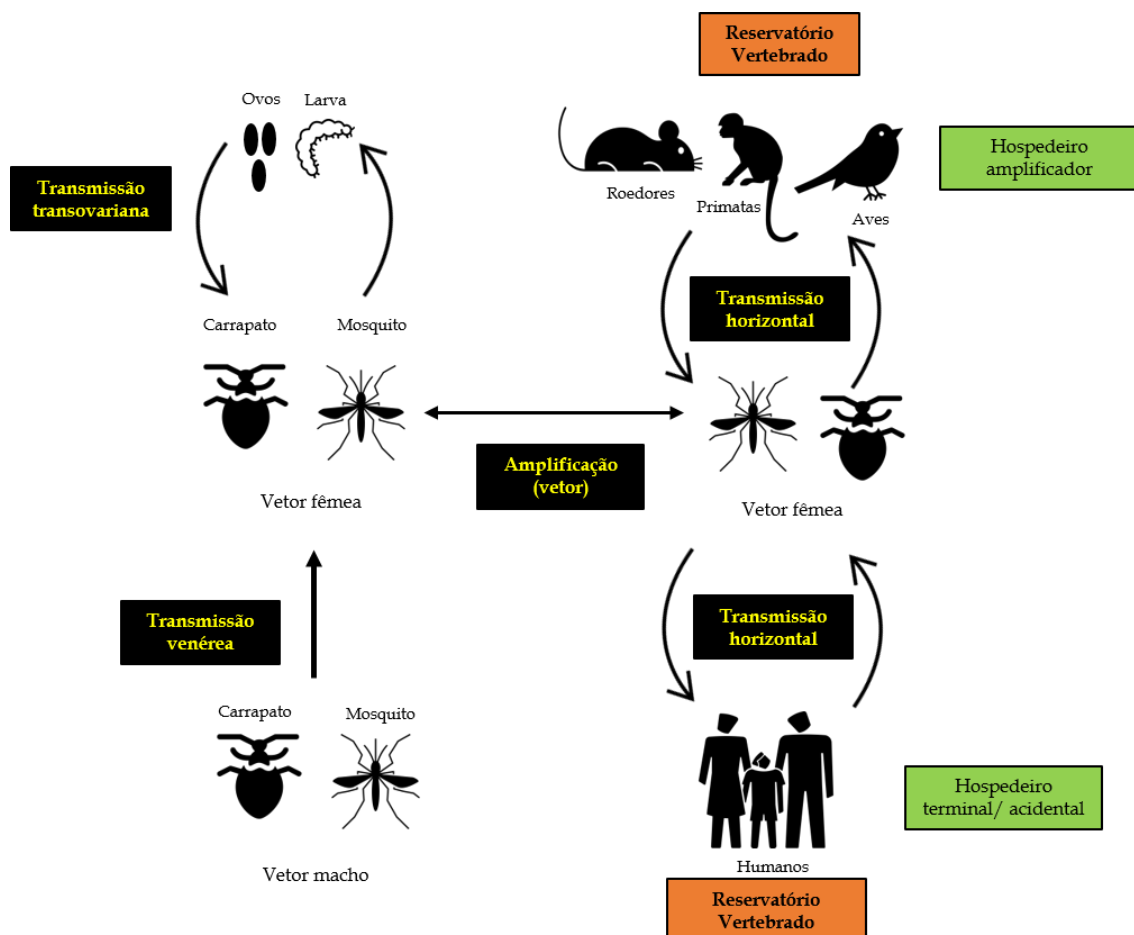
Desse modo, uma vez comprovado que a infecção do ZIKV está relacionada com alterações na homeostase oxidativa das células, nosso trabalho ascende perspectivas para o uso de substâncias antioxidantes como abordagem farmacológica com a finalidade de prevenir ou retardar possíveis danos oxidativos em pacientes acometidos por essa arbovirose.

## 2- REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1- Arbovírus

Os arbovírus (*arthropod-borne virus*) são vírus majoritariamente de genoma RNA com grande relevância médica, transmitidos aos hospedeiros vertebrados exclusivamente pela picada de um vetor artrópode (AGARWAL; PARIDA; DASH, 2017). Tal termo não é um indicador taxonômico, ele está relacionado com a necessidade da multiplicação do vírus no vetor artrópode durante seu ciclo de transmissão (LIANG; GAO; GOULD, 2015). Esses vírus são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos e carrapatos (Figura 1).

**Figura 1: Ciclo ecológico dos arbovírus.** Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados. Durante o ciclo de amplificação, as fêmeas infectadas transmitem os vírus para aves e mamíferos susceptíveis durante o repasto sanguíneo. Os seres humanos são considerados hospedeiros terminais ou acidentais, pois não são necessários para a manutenção do ciclo. Entre os vetores artrópodes, a transmissão pode ocorrer pelas vias transovariana e venérea.



Fonte: Adaptado de (AGARWAL; PARIDA; DASH, 2017)

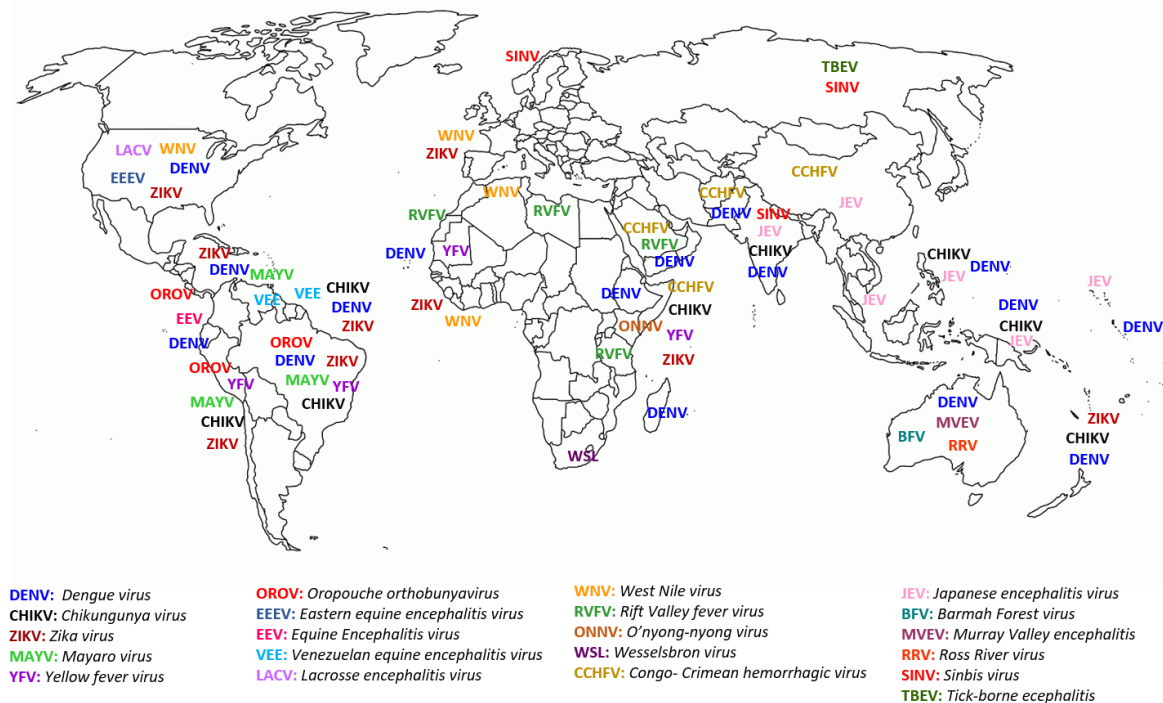
No ambiente silvestre, a transmissão horizontal normalmente ocorre durante a alimentação do sangue de um animal infectado. Certos hospedeiros vertebrados são de particular importância, pois quando infectados, apresentam viremia com título e duração suficientes para infectar novos vetores. Tais hospedeiros são chamados de amplificadores do ciclo e são representados principalmente pelas aves, mamíferos roedores e primatas. Normalmente, os seres humanos são considerados hospedeiros terminais ou acidentais, não sendo fundamentais para a manutenção do ciclo ecológico dos arbovírus. Ainda, entre os hospedeiros artrópodes, os arbovírus podem ser transmitidos pelas vias transovariana e venérea (AGARWAL; PARIDA; DASH, 2017).

Os padrões de interação entre os vetores, especialmente mosquitos, com os hospedeiros têm mudado no decorrer dos anos (GOULD et al., 2017). Os padrões de comportamento humano bem como fatores ambientais possuem papel importante na disseminação das arboviroses (YOUNG, 2018). O crescimento desordenado das cidades e da população favoreceu a transmissão dos vírus em áreas urbanas. O aumento no movimento internacional de pessoas facilita a propagação dos arbovírus pelo mundo em um curto período de tempo (BRAACK et al., 2018). Além disso, construção de barragens e de áreas extensas de irrigação e pastagem favorece o estabelecimento de novos ciclos de manutenção dos vetores contribuindo assim, para o aumento no número de casos de arboviroses em áreas que até então não haviam sido registrados (YOUNG, 2018).

Os arbovírus são mais prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, justamente naquelas regiões onde os vetores também são mais predominantes. Entretanto, as alterações climáticas possuem impacto significativo no aparecimento desses vírus nas demais regiões do globo (Figura 2) (GOULD et al., 2017).

A emergência e re-emergência das arboviroses estão associadas com fatores climáticos e antrópicos, além da capacidade de evolução e adaptação das espécies na natureza. Durante a infecção de múltiplos e distintos hospedeiros, os vírus podem ser selecionados culminando no aparecimento de cepas mais virulentas ou melhor adaptadas (FIGUEIREDO, 2007). Ainda, os arbovírus apresentam uma alta plasticidade genética, pois o genoma RNA é mais susceptível a erros durante o processo de replicação, o que aumenta as taxas de mutações, as quais permitem o aparecimento de novas populações virais, também conhecidas como *quasispecies* (DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; FIGUEIREDO, 2007).

**Figura 2: Distribuição geográfica dos principais arbovírus de importância médica.** Representação da circulação de alguns arbovírus de relevância médica no mundo. Esses vírus são mais prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais do globo. No entanto, alterações climáticas facilitam a disseminação desses vírus para regiões fora da zona tropical.



Fonte: adaptado de (KUDCHODKAR et al., 2018)

As doenças causadas pelos arbovírus, em sua maioria, têm duração de 1-2 semanas, com evolução benigna. Porém, alguns vírus podem causar graves quadros clínicos que podem culminar na morte ou incapacitação do paciente, desse modo, causando tanto prejuízos sociais quanto econômicos (LIANG; GAO; GOULD, 2015).

De maneira geral, as manifestações clínicas das arboviroses em humanos são divididas em quatro categorias: febre, febre exantemática, febre hemorrágica e encefalite. O que determina cada uma delas são fatores como inóculo viral, tempo de exposição, cepa do vírus e fatores específicos do hospedeiro (GUBLER, 2002). Com exceção dos vírus da febre amarela e da encefalite japonesa, praticamente não existem vacinas ou fármacos antivirais disponíveis no mercado contra os arbovírus (RAMÍREZ et al., 2018).

No Brasil, os arbovírus estão amplamente distribuídos ao longo de todo seu território. Por apresentar clima predominantemente tropical o país apresenta condições adequadas para o estabelecimento do subsistema ecológico necessário para a manutenção do ciclo desses vírus (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Além disso, apesar das elevadas taxas de desmatamento, grande parte do território brasileiro permanece recoberto por floresta úmida e outros ecossistemas naturais (LORENZ et al., 2017). Aproximadamente 200 arbovírus

diferentes já foram isolados no Brasil e desses, 40 espécies podem causar doenças em humanos (FIGUEIREDO, 2007; LORENZ et al., 2017). Dentre esses, destacam-se os vírus da Dengue (DENV), vírus Oropouche (OROV), vírus da Febre Amarela (YFV), vírus Mayaro (MAYV), vírus Chikungunya (CHIKV) e ZIKV (AGARWAL; PARIDA; DASH, 2017; DHANWANI et al., 2012; DONALISIO; FREITAS; ZUBEN, 2017; MOURÃO et al., 2015).

De acordo com o *Catalogue of Arbovirus and Certain other Viruses of Vertebrates*, mais de 500 espécies de arbovírus já foram registradas, das quais, pelo menos 140 causam doenças em humanos (CDC, 2020). Esses vírus são taxonomicamente diversos e estão distribuídos em 8 famílias e 14 gêneros. Com relação às infecções humanas, os arbovírus mais relevantes pertencem às famílias *Peribunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (YOUNG, 2018). Vale ressaltar que nem todos os vírus inseridos nessas famílias são necessariamente arbovírus. O alvo de estudo do presente trabalho, o ZIKV, está inserido na família *Flaviviridae*, assim como o DENV e YFV os quais, em conjunto, são muito importantes no contexto epidemiológico das arboviroses no Brasil.

## 2.2- Família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*

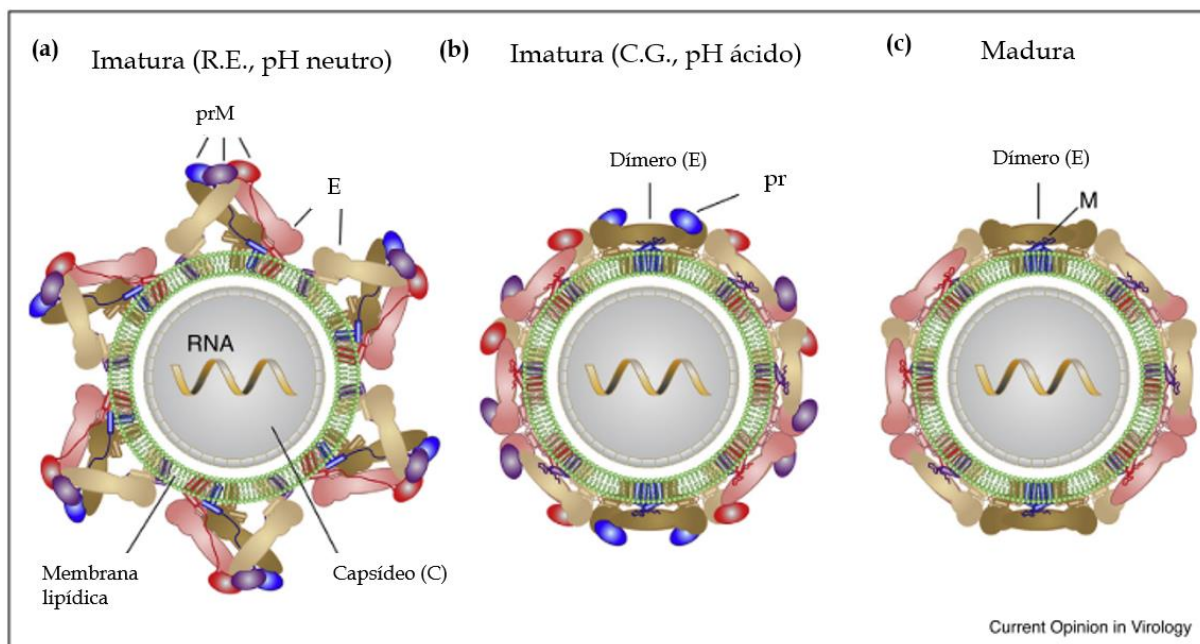
A família *Flaviviridae* é composta por 4 gêneros: *Flavivirus* com 53 espécies; *Hepacivirus* com 14 espécies; *Pegivirus* com 11 espécies; e *Pestivirus* com 11 espécies (ICTV, 2020). A maioria dos flavivírus é arbovírus e apresenta importância médica e veterinária, destacando-se o DENV, YFV, vírus do Oeste do Nilo (WNV) e ZIKV. Clinicamente, as infecções por esses vírus são caracterizadas por febre indiferenciada, acompanhada ou não de exantema, e nos casos mais graves, encefalite e febre hemorrágica (WONG; POON; WONG, 2016).

As partículas virais são pequenas e envelopadas, com aproximadamente 40-60nm de diâmetro e envelope composto basicamente por lipopolissacarídeos (SIMMONDS et al., 2018). No envelope estão inseridas duas (em flavivírus, hepacivírus e pegivírus) ou três (em pestivírus) glicoproteínas (NEUFELDT et al., 2018). A Figura 3 mostra uma representação esquemática dos vírions imaturos e maduros dos flavivírus. Os vírions maduros são caracterizados por uma estrutura formada por 90 dímeros da proteína E, os quais estão orientados paralelamente ao plano da membrana viral (REY; STIASNY; HEINZ, 2017; SIROHI et al., 2016).

O genoma dos membros da família *Flaviviridae* é formado por uma fita de RNA não segmentada com polaridade positiva (RNA<sup>+</sup>), medindo aproximadamente 9,4 ~ 13kb (SIMMONDS et al., 2018). Esse genoma é constituído por uma única janela de leitura (ORF)

que codifica uma poliproteína precursora a qual é clivada, tanto por proteínas virais quanto por proteases do hospedeiro, nas proteínas estruturais e não estruturais dos vírus (CHEN et al., 2017).

**Figura 3: Representação esquemática das partículas virais dos flavivírus.** (a) partícula imatura após o brotamento do retículo endoplasmático (R.E.) - pH neutro. (b) partícula imatura após exposição a pH ácido no complexo de golgi e rearranjo das proteínas do envelope. (c) partícula madura após liberação no ambiente extracelular.

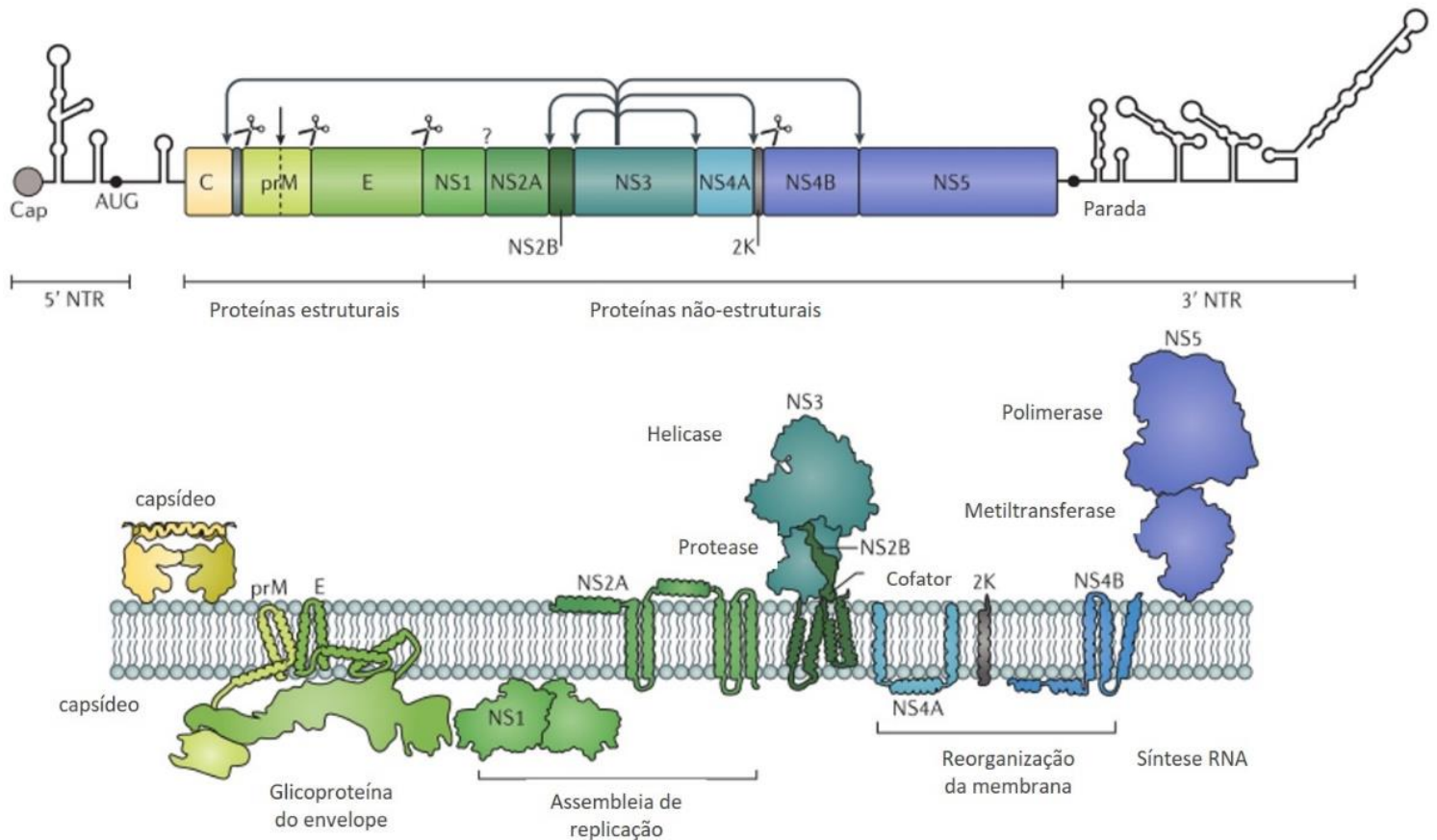


Fonte: adaptado de (REY; STIASNY; HEINZ, 2017).

Como mostrado na Figura 4, a porção amino terminal do genoma dos flavivírus codifica as proteínas estruturais dos vírions: capsídeo (C), pré-membrana/membrana (prM) e envelope (E). A porção restante do genoma codifica as proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B e NS5) as quais são fundamentais para a multiplicação e patogênese viral (MARTÍNEZ DE SALAZAR et al., 2016).

Dentre as proteínas não- estruturais, a NS1 é a mais conservada e se apresenta na forma de monômeros, dímeros (ligada à membrana do RE) ou hexâmeros (secretada) (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016). Glicosilação nessa proteína possui papel importante na multiplicação viral e virulência (SOMNUKE et al., 2011). Essa proteína está relacionada com inibição do sistema complemento do hospedeiro e é fundamental no processo de replicação do genoma viral no RE (RASTOGI; SHARMA; SINGH, 2016). Juntamente com a NS1, a proteína NS2A é essencial para a multiplicação e produção de novas partículas infecciosas (NEUFELDT et al., 2018).

**Figura 4: Genoma dos flavivírus.** O genoma RNA dos flavivírus apresenta apenas uma janela de leitura que codifica uma poliproteína precursora que após ser traduzida é clivada em 3 proteínas estruturais (C, prM e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B e NS5) as quais são fundamentais para estrutura, multiplicação e patogênese dos vírus.



Fonte: Adaptado de (NEUFELDT et al., 2018)

A subunidade serina protease da NS2B atua como cofator para serina protease da NS3, que por sua vez, é recrutada para as membranas do RE. A NS3 é uma proteína multifuncional atuando como protease, NTPase, RNA 5' trifosfatase e helicase. NS4A é uma proteína integral de membrana cuja atividade está relacionada com a reorganização da membrana. NS4B é uma proteína, aparentemente, sem atividade enzimática definida que interage com a NS3 e, essa associação é extremamente importante para a replicação viral. NS5 está envolvida com o CAP 5' do RNA, metilação do genoma e com a síntese do RNA viral. Por fim, a proteína 2k atua como um peptídeo sinal para a translocação e inserção da NS4B na membrana do RE (NEUFELDT et al., 2018).

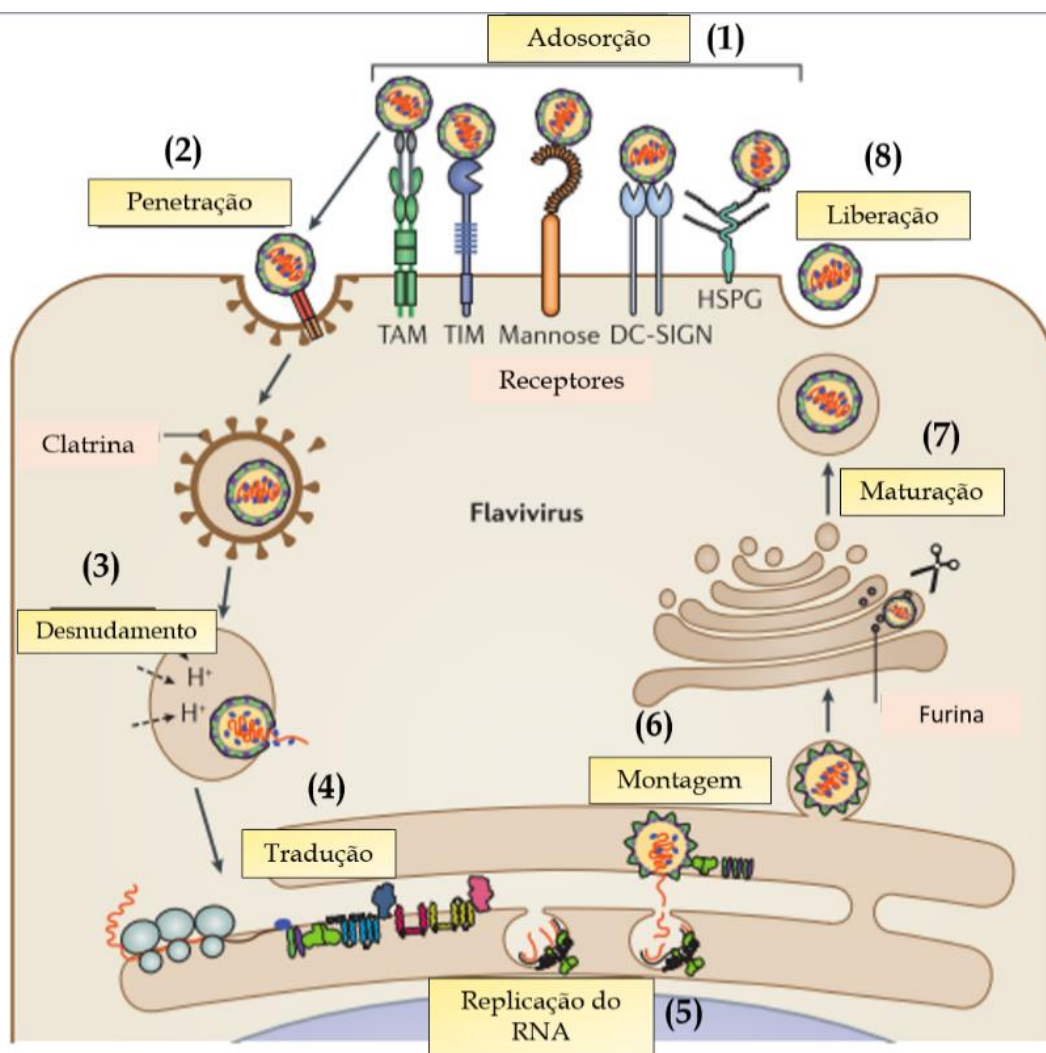
Os flavivírus infectam uma grande variedade de tipos celulares, como monócitos, células dendríticas, neurônios, macrófagos placentários, trofoblastos, células testiculares, dentre outras (NEUFELDT et al., 2018). A infecção inicia-se com a ligação das partículas



virais aos receptores presentes na superfície das células susceptíveis. Após a adosorção, os vírus penetram nas células por endocitose em uma via dependente de clatrina. Dentro do compartimento endossomal, o pH ácido induz alterações conformacionais nas glicoproteínas do envelope viral permitindo a fusão da membrana do vírus com a membrana da vesícula endossomal, resultando na liberação do RNA viral no citoplasma das células hospedeiras.

Uma vez no citoplasma, o genoma viral é reconhecido pelos ribossomos, iniciando assim, a tradução da poliproteína na membrana do retículo endoplasmático rugoso. As proteínas virais juntamente com as proteases celulares clivam a poliproteínas virais estruturais e não estruturais. A replicação do RNA viral ocorre por meio da formação de um RNA-intermediário, cuja transcrição é realizada pela viral RNA polimerase RNA dependente. Uma vez que todas as proteínas virais são formadas e o genoma replicado, ocorre a montagem e posterior maturação dos vírions. Esse último processo acontece no complexo de Golgi e é marcado pela clivagem da proteína prM e pelo rearranjo das glicoproteínas de superfície. Uma vez maduras, as novas partículas infecciosas são transportadas dentro de vesículas até a superfície da célula e são liberadas no ambiente extracelular por meio da fusão da membrana da vesícula com a membrana celular (Figura 5) (NEUFELDT et al., 2018).

**Figura 5: Ciclo de multiplicação dos flavivírus.** (1) Adsorção: ligação do vírus ao receptor da célula hospedeira. (2) Entrada do vírus por endocitose (penetração). (3) A acidificação do endossomo permite a fusão da membrana viral com a membrana endossômica permitindo a liberação do genoma viral no citoplasma (desnudamento). (4) Uma vez no citoplasma, o RNA viral é reconhecido pelos ribossomos e inicia a tradução das proteínas virais. (5) A replicação do RNA<sup>+</sup> viral ocorre por meio de um RNA<sup>-</sup> intermediário cuja transcrição é realizada pela polimerase viral. (6) Montagem das novas partículas virais ocorre associada às membranas do R.E. rugoso. (7) Maturação dos vírions é marcada pela clivagem da proteína prM e pelo rearranjo das glicoproteínas de superfície no complexo de Golgi. (8) Liberação dos vírions na superfície celular.



Fonte: Adaptado de (NEUFELDT et al., 2018)

### 2.3- Vírus Zika

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 no sangue de um macaco sentinela da espécie *Macaca mulatta* (macaco Rhesus), na floresta Zika, em Uganda, por uma rede de estudos que monitorava a febre amarela na região (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Um ano depois, esse vírus foi isolado também de um mosquito da espécie *Aedes africanus* na mesma

floresta (DICK, 1952 II). Em 1952, a partir da primeira evidência de infecção em humanos pelo ZIKV, casos esporádicos foram reportados, evidenciando assim, a circulação desse vírus em regiões específicas do mundo, principalmente na Ásia e na África (PAIXÃO et al., 2016).

A partir do seu isolamento e posterior caracterização, o ZIKV foi inserido no sorogrupo Spondweni (WOLFE; CALISHER; MCGUIRE, 1982), gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (ICTV, 2020). A primeira epidemia relevante de ZIKV fora do continente africano ocorreu em 2007 na ilha Yap (Oceania), onde pelo menos 75% da população foram infectadas (DUFFY et al., 2009). Em 2013, outra epidemia na Polinesia Francesa acometeu cerca de 11% da população (CAO-LORMEAU et al., 2014).

Um estudo de Faria e colaboradores (2017) apontou que o ZIKV já circulava pelo nordeste do Brasil desde fevereiro de 2014 (FARIA et al., 2017). Entretanto, apenas em maio de 2015 os primeiros casos de infecção humana pelo ZIKV no continente Americano foram reportados, com a confirmação de 17 casos em 3 estados do Brasil: 8 na Bahia, 8 no Rio Grande do Norte e 1 em São Paulo. A partir daí, o vírus se espalhou rapidamente para outros países da América do Sul e Central (MARTÍNEZ DE SALAZAR et al., 2016). Em 2016 quase 200.000 casos confirmados de infecção pelo ZIKV foram reportados em 49 países do continente Americano, incluindo o Brasil, Bolívia, Equador, Guiana Francesa, Paraguai e Venezuela (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2020). Mesmo com a confirmação de que o ZIKV esteja circulando em diferentes regiões do globo, até julho de 2019 os números de casos diminuíram em vários países ao redor do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019).

Estudos genéticos utilizando nucleotídeos presentes na sequência da proteína NS5 do ZIKV indicaram a presença de 2 linhagens: uma africana e uma asiática (WONG; POON; WONG, 2016). Sugere-se que o vírus originou em Uganda e espalhou para o oeste e para a região central da África. Essa linhagem alcançou as regiões da Micronesia e da Malásia, estabelecendo assim, a linhagem asiática. As epidemias na Ilha Yap, na Polinésia Francesa e na América Latina foram causadas por vírus oriundos, provavelmente, de uma linhagem do sudeste asiático. Apesar de tais diferenças, o ZIKV apresenta apenas um único sorotipo (KUDCHODKAR et al., 2018; WONG; POON; WONG, 2016).

Em humanos, o período de incubação varia entre 3-14 dias após o repasto sanguíneo. A viremia é detectada até 10 dias depois do aparecimento dos primeiros sintomas, desaparecendo rapidamente. Entretanto, RNAm viral já foi detectado no sangue total de pacientes até 81 dias após a doença (SHIRLEY; NATARO, 2017).

Dentre as manifestações clínicas relacionadas com a infecção pelo ZIKV (Figura 6) a mais clássica e conhecida é a “Febre Zika” a qual é caracterizada por sintomas que podem durar menos de uma semana, normalmente 3-7 dias, incluindo: febre, exantema, artralgia, mialgia, cefaleia e conjutivite (HAMEL et al., 2016). Entretanto, as epidemias mais contemporâneas de ZIKV revelaram aspectos que até então não haviam sido relacionados com essa arbovirose, como os casos de microcefalia em bebês, síndrome de Guillian-Barré em adultos (SGB), dentre outros (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019). O número de casos fatais decorrentes da infecção pelo ZIKV são raros, apenas 84 casos foram reportados nas Américas do Sul e Central entre os anos de 2015-2017 (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2020;RODRÍGUEZ-MORALES et al., 2019). Apesar da gravidade dessas doenças, é importante ressaltar que mais de 80% dos casos de infecção pelo ZIKV são assintomáticos (ROSSI et al., 2016).

Além da microcefalia, uma série de outras alterações neurológicas podem ser observadas em fetos e bebês infectados pelo ZIKV ainda durante o período gestacional. Dentre essas alterações destacam-se: redução do tecido cerebral, lesões oculares, convulsões e irribalidade. Em conjunto, essas manifestações são denominadas como Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (SHIRLEY; NATARO, 2017). Assim, a infecção pelo ZIKV, especialmente nos primeiros meses de gestação, pode causar danos irreversíveis nas crianças, os quais possuem implicações ao longo de suas vidas e de seus familiares (PARDY; RICHER, 2019).

Embora acometa uma pequena porcentagem dos pacientes adultos, a SGB é a manifestação clínica neurológica mais comum observada em adultos infectados com ZIKV (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; PARDY; RICHER, 2019). Tal síndrome é uma doença auto-imune associada à inflamação intensa nos nervos periféricos o que resulta em fraqueza muscular e paralisia (WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016). A possível relação entre a infecção pelo ZIKV e a SGB foi descrita pela primeira vez em 2013, durante a epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU et al., 2016). Diante disso, alguns trabalhos hipotetizaram que a produção de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV poderiam se ligar aos glicolipídios presentes nos nervos periféricos, danificando a bainha de mielina ou a membrana axial dos neurônios, o que pode resultar em processo inflamatório intenso e aparecimento dos sintomas característicos da síndrome (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019).

As “novas” manifestações clínicas observadas nos pacientes infectados com ZIKV podem estar relacionadas com a ampliação do tropismo celular bem como com a persistência em múltiplos órgãos (PIERSON; DIAMOND, 2018). O que ainda não está muito bem

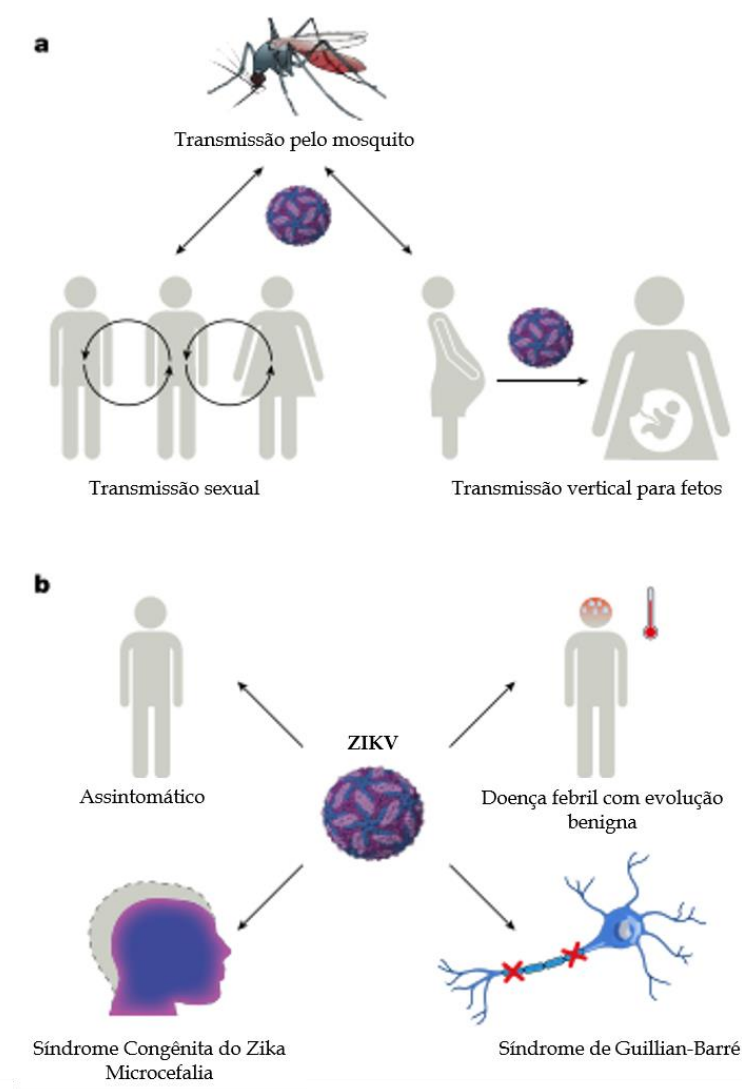
elucidado é se esses eventos ocorreram devido a uma mudança na virulência do vírus ou se eles começaram a ser observados devido ao aumento no número de casos diagnosticados (PIERSON; DIAMOND, 2018).

A rapidez com que a epidemia ocasionada pelo ZIKV se espalhou para vários países, associado ao fato da possível relação entre esse vírus e danos neurológicos significativos, tanto em crianças como em adultos, levaram a Organização Mundial da Saúde a declarar a “Febre Zika” como um problema de Saúde Pública emergencial e de interesse mundial em 1º de fevereiro de 2016 (ROSSI et al., 2016).

O ZIKV, por ser um arbovírus, é transmitido primariamente por mosquitos, sobretudo aqueles do gênero *Aedes*, destacando-se as espécies *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (GUTIÉRREZ-BUGALLO et al., 2019). Entretanto, existem outras formas de transmissão independentes do vetor, como mostrado na Figura 6. A transmissão vertical (de mãe para filho) do vírus pode acontecer em qualquer período gestacional através da placenta ou durante o parto visto que, RNA viral já foi detectado no líquido amniótico, na placenta e nos tecidos fetais (MLAKAR et al., 2016). Entretanto, a infecção das células placentárias pelo ZIKV é reduzida nos estágios mais avançados da gestação (PIERSON; DIAMOND, 2018). Dados da literatura sugerem que o desenvolvimento de um perfil imunológico caracterizado pela produção de interferon do tipo III pelos sinciciotrofoblastos pode contribuir para tal diminuição na infectividade do vírus depois do 2º trimestre de gestação (PIERSON; DIAMOND, 2018).

Há também a possibilidade de transmissão do ZIKV via relação sexual, visto que a persistência do genoma viral no sêmen de pacientes foi observada muitos dias após o início da infecção (FOY et al., 2011; MUSSO et al., 2015). Diante de tal possibilidade de transmissão, vários estudos estão sendo desenvolvidos com foco na persistência do RNA do ZIKV nos órgãos genitais (masculinos e femininos), a fim de compreender melhor qual é o real papel epidemiológico desse tipo de transmissão (PARDY; RICHER, 2019). Apesar de alguns trabalhos já terem sugerido que o ZIKV possa ser transmitido via transfusão sanguínea, saliva ou por meio da amamentação não existe comprovação de que essas formas realmente ocorrem naturalmente (PARDY; RICHER, 2019).

**Figura 6: Transmissão e manifestações clínicas do ZIKV.** (a) Mosquitos fêmeas do gênero *Aedes* são os principais vetores do ZIKV e transmitem o vírus ao homem durante o repasto sanguíneo. O ZIKV também pode ser transmitido sexualmente ou verticalmente da mãe infectada para o feto. (b) A maioria dos casos de infecção pelo ZIKV são assintomáticos. Durante as epidemias mais recentes do ZIKV manifestações clínicas tais como SGB e microcefalia foram observadas em pacientes infectados. O risco de danos neurológicos e comprometimento no desenvolvimento normal dos bebês aumenta significativamente quando a mãe é infectada pelo ZIKV durante o primeiro trimestre de gestação.



Fonte: adaptado de (PIERSON; DIAMOND, 2018)

Assim como para outras arboviroses, ainda não há um tratamento antiviral específico para as doenças ocasionadas pelo ZIKV. O tratamento geral para os pacientes inclui repouso, hidratação e administração de analgésicos para amenisar os sintomas (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019). Alguns compostos com potencial atividade anti-ZIKV já foram avaliados *in silico*, outros *in vitro* e/ou *in vivo*, mas a real eficácia desses fármacos ainda permanece desconhecida (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019).

Desde que os possíveis efeitos teratogênicos da infecção pelo ZIKV começaram a ser elucidados, diferentes tipos de vacinas passaram a ser desenvolvidas e avaliadas em ensaios clínicos e pré-clínicos (PIERSON; DIAMOND, 2018). Uma vez que o ZIKV possui apenas um sorotipo e que a primeira infecção pelo ZIKV induz resposta imunológica que protege o hospedeiro contra uma infecção secundária, a produção de vacinas utilizando um único antígeno é a estratégia mais utilizada (ALIOTA et al., 2016; DOWD et al., 2016). Diferentes configurações de vacinas de DNA estão sendo avaliadas e algumas delas já estão na fase de testes em humanos (PIERSON; DIAMOND, 2018). Vacinas utilizando o vírus vivo atenuado ou inativado também já foram desenvolvidas e pelo menos 4 delas já estão na fase de testes clínicos (PIERSON; DIAMOND, 2018).

Com relação aos testes diagnósticos, ensaios moleculares e sorológicos são os mais utilizados para confirmar uma suspeita de infecção pelo ZIKV. A detecção do RNA viral (por RT-PCR) é possível em soros de pacientes na fase aguda da doença (3-10 dias após o aparecimento dos sintomas). Por outro lado, imunoglobulinas específicas para o vírus (IgM) podem ser detectadas até 12 semanas após a manifestação dos sintomas (MARTÍNEZ DE SALAZAR et al., 2016; SHIRLEY; NATARO, 2017).

Apesar dos avanços científicos, muitas perguntas permanecem sem resposta com relação à patogênese do ZIKV. Além disso, a descrição completa do espectro clínico, o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico rápidas e eficientes, bem como estratégias eficientes de controle e prevenção da doença são necessários para amenizar os impactos da infecção por esse vírus no mundo e especialmente, no Brasil (SHIRLEY; NATARO, 2017).

#### **2.4- Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) e estresse oxidativo**

Os radicais livres compreendem um grupo de átomos e moléculas que apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica e por isso, são instáveis, altamente reativos e possuem grande capacidade de se ligar, de forma inespecífica, a várias outras moléculas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). Esses radicais geralmente são formados por absorção de radiação, reações de óxido-redução, ou por reações enzimáticas catalíticas (SLATER, 1984). De acordo com seu átomo central, tais radicais podem ser divididos em quatro categorias: oxigênio, nitrogênio, cloro e enxofre (HALLIWELL, 2007).

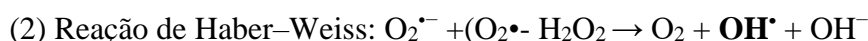
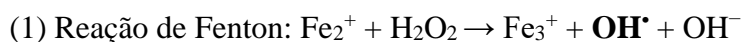
O termo “Espécies Reativas de Oxigênio” (ERO) refere-se a uma gama de produtos derivados do oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), sejam eles radicais livres ou não (HALLIWELL;

GUTTERIDGE, 2015). As ERO são produzidas no metabolismo normal dos organismos. O radical ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) é o principal produto formado da redução do  $O_2$  por meio da transferência de um único elétron. Cerca de 1 a 2% do oxigênio utilizado na respiração mitocondrial é convertido nessas espécies, durante a fosforilação oxidativa (cadeia transportadora de elétrons), que ocorre na membrana interna das mitocôndrias (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999).

Nas células de mamíferos, as ERO podem ser produzidas como resultado da atividade de diferentes enzimas como NADPH oxidases (NOX), ciclo-oxigenase, xantina oxidase, lipoxigenases, dentre outras (PILLAI et al., 2019).

A geração regulada das ERO tem papel importante em várias funções vitais, como por exemplo, na resposta imune do hospedeiro frente à infecções virais e bacterianas, nos mecanismos de sinalização celular, regulação de citocinas e fatores de crescimento (AGUIRRE; LAMBETH, 2010; GEISZT; LETO, 2004). Entretanto, quando são produzidas em excesso, as ERO causam danos em constituintes importantes das células, como por exemplo, danos às proteínas, aos lipídios das membranas celulares, e até mesmo ao DNA. Entre esses efeitos deletérios destacam-se o envelhecimento, apoptose e necrose. Além disso, as ERO estão relacionadas com uma ampla gama de doenças infecciosas e não infecciosas (HALLIWELL; CROSS, 1994).

O radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) é considerado a ERO mais potente e, conseqüentemente, mais danosa nos sistemas biológicos. Esse radical é extremamente reativo, ou seja, uma vez formado, reage rapidamente com alvos inespecíficos dentro das células podendo lesar o DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (GARCEZ et.al., 2004). Além disso, o  $OH^{\bullet}$  possui maior capacidade de lesionar as células que as demais ERO, pois não há um sistema de defesa enzimático específico contra esse radical (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000). As reações de Fenton (I) e de Haber Weiss (II) são as principais fontes de geração do  $OH^{\bullet}$  (SUTTON; WINTERBOURN, 1989).



Outra ERO muito relevante nos sistemas biológicos é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Embora não possua elétrons desemparelhados, apresenta alta reatividade e como mostrado nas reações I e II, o  $H_2O_2$  ao reagir com  $Fe^{2+}$  ou  $O_2^{\bullet-}$  produz  $OH^{\bullet}$ . O  $H_2O_2$  é formado



principalmente na matriz mitocondrial durante o processo de respiração celular (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999).

As ERO são extremamente relevantes e importantes em vários sistemas biológicos e dependendo da quantidade disponível podem ora desempenhar funções benéficas ora prejudicar os organismos (JONES, 2006). Assim, os organismos aeróbios desenvolveram ao longo do processo evolutivo mecanismos antioxidantes para detoxificar e/ou controlar a oxidação de biomoléculas pelas ERO, evitando assim, o acúmulo de danos oxidativos e descontrole no sistema de sinalização redox (COSTANTINI, 2019).

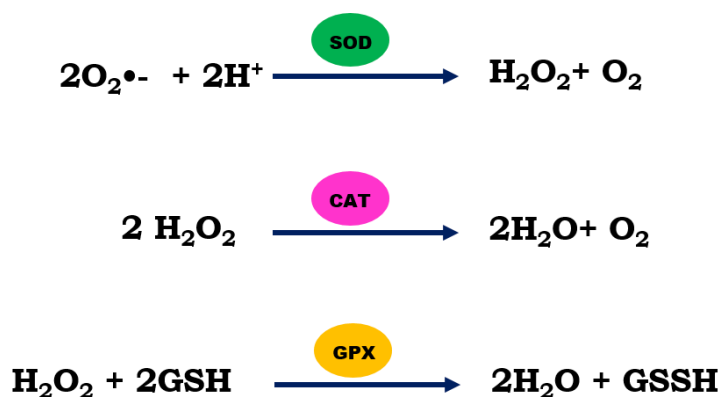
Nesse sentido, em indivíduos saudáveis, os níveis das ERO são controlados pela ação dos sistemas antioxidantes enzimáticos e/ou não enzimáticos. Define-se como antioxidante “qualquer mecanismo, estrutura e/ou substância que previna, atrase ou remova o dano oxidativo de uma molécula alvo” (PAMPLONA; COSTANTINI, 2011).

A grande maioria dos antioxidantes não enzimáticos é obtida na dieta e podem ser classificados em várias classes como polifenóis, carotenóides, minerais, vitaminas (C e E) e cofatores, os quais desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana (COSTANTINI, 2019; RATNAM et al., 2006).

O sistema antioxidante enzimático é formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (COSTANTINI, 2019). A primeira ERO produzida é o  $O_2^{\cdot-}$ , o qual é metabolizado a  $H_2O_2$  pelas enzimas SOD 1,2 ou 3, dependendo do sítio primário de produção do  $O_2^{\cdot-}$ . As enzimas CAT e GPx, por sua vez, detoxificam o  $H_2O_2$  formando água e oxigênio molecular como produtos das reações catalisadas por tais enzimas (Figura 7) (HALLIWELL, 2007).

As enzimas SOD são as mais importantes do sistema antioxidante enzimático. Essas metaloenzimas são as responsáveis por combater os efeitos oxidantes do  $O_2^{\cdot-}$  e estão presentes em todas as células do corpo humano. As três isoformas: citoplasmática (Cu/ZnSOD), mitocondrial (MnSOD) e extracelular (Cu/ZnSOD) atuam na dismutação do ânion superóxido, produzindo como produto final, peróxido de hidrogênio (PERRY et al., 2010).

**Figura 7: Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.** A enzima superóxido dismutase (SOD) converte o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Enquanto as enzimas catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) detoxificam  $H_2O_2$  em água e oxigênio molecular.



Fonte: adaptado de (KAYAMA et al., 2015)

Outra enzima antioxidante importante é a CAT, a qual é uma proteína homotetramérica (240kDa) e está presente tanto em indivíduos eucariotos como plantas e animais como em alguns procariotos (MASTERS; PEGG; CRANE, 1986). Essa enzima está presente principalmente nos peroxissomos, visto que essa organanela é uma importante fonte de produção de  $H_2O_2$  (VALKO et al., 2006). A reação catalisada pela CAT é de extrema importância, já que impede a formação do  $OH^{\bullet}$ , o qual é altamente prejudicial as células, como citado anteriormente. Segundo Valko e colaboradores, uma molécula de CAT é capaz de metabolizar aproximadamente 6 milhões de moléculas de  $H_2O_2$  por minuto (VALKO et al., 2006).

Além da CAT, o sistema glutaciona é outro componente fundamental do sistema de defesa antioxidante das células. A glutaciona é um tripeptídeo linear ( $\gamma$ -glutamil-cisteinil-glicina), o qual é encontrado em concentrações elevadas nas células de praticamente todos os eucariotos como também em muitos procariotos (OESTREICHER; MORGAN, 2019). Mais de 98% da glutaciona total se apresenta na forma de glutaciona reduzida (GSH) e o restante na forma de glutaciona oxidada (GSSG). A conversão da GSH em GSSG é catalisada pela enzima GPx (MEISTER; ANDERSON, 1983). Essa reação está acoplada à redução do  $H_2O_2$  em água. A reciclagem das moléculas de glutaciona é realizada pela enzima glutaciona redutase (GR) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Essa enzima não atua diretamente no sistema antioxidante, mas é fundamental na manutenção do ciclo metabólico da glutaciona (HALLIWELL, 2007).

A primeira definição de estresse oxidativo foi proposta por Sies e colaboradores na década de 1980. De acordo com esses pesquisadores, o estresse oxidativo pode ser compreendido como um “desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, em favorecimento das espécies oxidantes” (SIES et al., 1985). Entretanto, nesse conceito, está implícita uma situação de equilíbrio na qual oxidantes e antioxidantes se encontram em um estado estacionário e que nenhum dano oxidativo ocorra (COSTANTINI, 2019). Na realidade, devido à presença de lipídios insaturados nas membranas e pela abundância de reações oxidativas que ocorrem no metabolismo normal, os sistemas biológicos oferecem condições adequadas para a ocorrência de reações de caráter pró-oxidante (JORDAO et al., 1998). Diante disso, mais recentemente, Jones (2006) propôs uma definição mais atual e abrangente de estresse oxidativo, a qual foi descrita como “uma ruptura/desregulação da sinalização e controle redox” (JONES, 2006).

É importante ressaltar que o termo “estresse” imbuí um significado negativo às alterações no status redox dos organismos, o que não é totalmente verdade. Como citado anteriormente, as ERO possuem funções importantes nas células e não devem ser somente relacionadas com efeitos deletérios aos organismos. Aumento na produção de ERO bem como a regulação positiva/negativa dos componentes antioxidantes refletem uma perturbação no status oxidativo celular e cada uma delas pode ter consequências, benéficas ou não, significativas para o organismo (COSTANTINI, 2019).

## **2.5- Estresse oxidativo e infecções virais**

As ERO são elementos importantes da defesa antimicrobiana das células (FANG, 2011). Normalmente, as infecções microbianas estimulam a produção de espécies reativas e inibem a produção de antioxidantes (DERAMAUDT; DILL; BONAY, 2013). Com relação às infecções virais, uma vez dentro do hospedeiro, os vírions são detectados e fagocitados por células do sistema de defesa como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, ativando vias que aumentam a produção de ERO a fim de eliminar o patógeno (DERAMAUDT; DILL; BONAY, 2013).

De forma geral, as espécies reativas são cruciais para o estabelecimento das infecções virais, influenciando tanto a multiplicação viral quanto o metabolismo celular (CAMINI et al., 2017a). Como parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus dependem de toda maquinaria de síntese da célula hospedeira para sua multiplicação. Segundo Peterhans, baixas concentrações

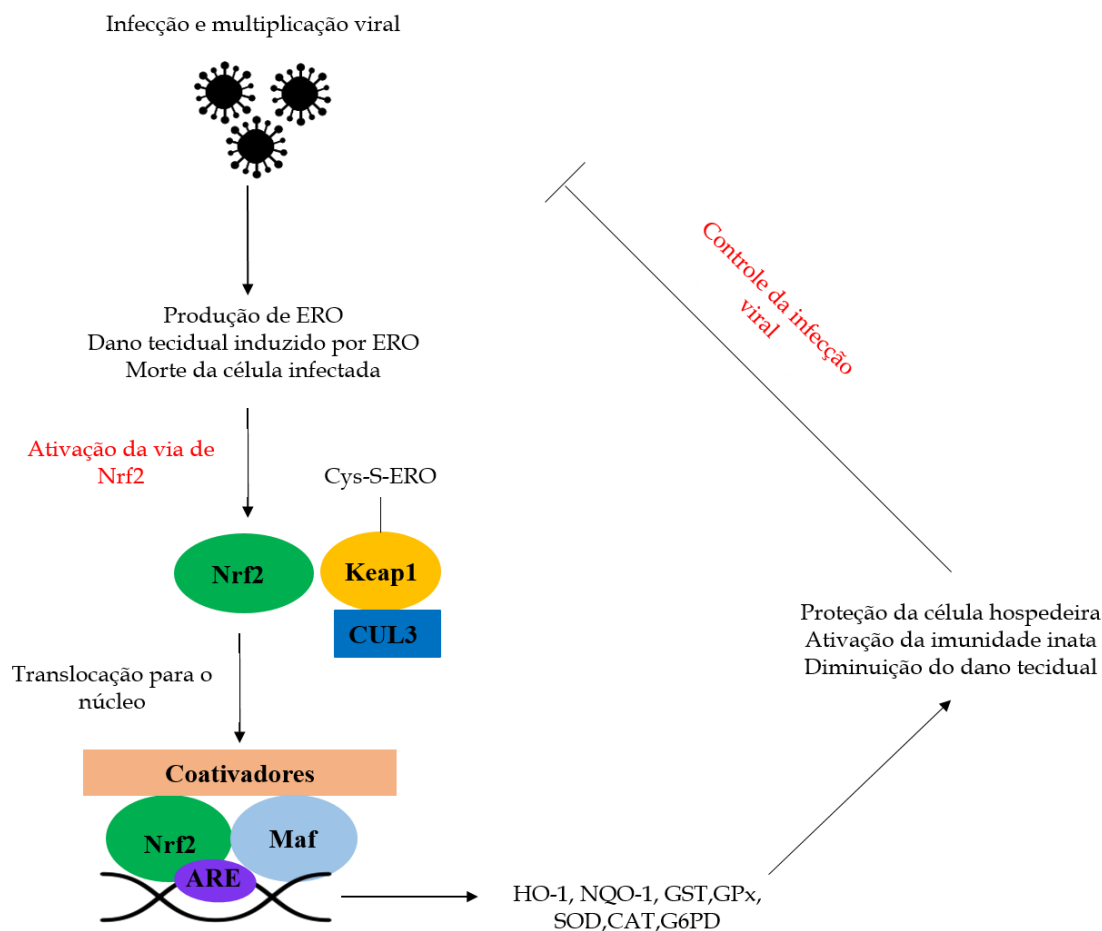
de ERO induzem a proliferação celular e a maioria dos vírus multiplica melhor em células que estão em divisão. No entanto, com o progresso da infecção mais ERO são formadas a fim de conter a multiplicação viral. Assim, esse aumento exacerbado das ERO pode levar ao estresse oxidativo e seus efeitos tóxicos para o hospedeiro (PETERHANS, 1997). A intensidade da produção de ERO frente a uma infecção viral depende tanto da célula infectada quanto do vírus (CAMINI et al., 2017a).

Durante uma infecção viral o estabelecimento do estresse oxidativo modula a ativação de diversos mediadores celulares o que resulta em diferentes tipos de danos celulares como apoptose, necrose, inflamação, vasculite, dentre outros (PILLAI et al., 2019). Além disso, alterações no *status* redox das células hospedeiras podem induzir mutações no genoma viral, o que pode favorecer a seleção de populações virais mais virulentas contribuindo para o aumento na patogênese dos vírus (SCHWARZ, 1996).

O controle dos níveis de ERO e consequentemente do estresse oxidativo é fundamental para a multiplicação dos vírus dentro das células hospedeiras. Assim, muitos vírus desenvolveram mecanismos para manipular vias reguladoras do sistema de defesa antioxidante como a via do fator de transcrição (eritróide-2)- fator 2 (Nrf2) (LEE, 2018).

O fator de transcrição Nrf2 foi caracterizado em 1994 e está presente em todos os tecidos do corpo humano (MOI et al., 1994). Tal fator de transcrição é um dos principais reguladores do sistema antioxidante celular, pois interage com os elementos de resposta antioxidantes (ARE) e com genes citoprotetores no núcleo das células (DERAMAUDT; DILL; BONAY, 2013). Em condições fisiológicas normais, o Nrf2 está presente no citoplasma associado com a proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (Keap1), desse modo, Keap1 regula a via de Nrf2 negativamente, pois bloqueia a translocação do fator transcricional para o núcleo (CULLINAN et al., 2004). Em resposta ao estresse oxidativo desencadeado por um vírus ou por outro patógeno, o complexo Nrf2/Keap1 se dissocia e o Nrf2 se transloca para o núcleo onde ativa a transcrição de vários genes envolvidos na homeostase redox (Figura 8) (RAMEZANI; NAHAD; FAGHIHLOO, 2018)

**Figura 8: Ativação da via de Nrf2 decorrente de uma infecção viral.** Em resposta ao estresse oxidativo desencadeado por um vírus ou por outro patógeno, o complexo Nrf2/Keap1 se dissocia e o Nrf2 se transloca para o núcleo onde ativa a transcrição de vários genes envolvidos na homeostase redox. CUL3 medeia a ubiquitinação e degradação do complexo Nrf2/Keap1. Uma vez ativado, o sistema de defesa antioxidante protege a célula e consequentemente os tecidos do hospedeiro dos danos ocasionados pelo excesso de ERO, além de controlar a infecção viral. Nrf2: fator de transcrição (eritróide-2)- fator 2; Keap1: proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch; CUL3: cullin-3; ARE: elementos de resposta antioxidante; HO-1: heme oxigenase 1; NQO-1: NADPH quinona oxidoreductase-1; GST: glutatona; GPx: glutatona peroxidase; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; G6PD: glicose 6 fosfato desidrogenase.



Fonte: adaptado de (LEE, 2018)

Dados da literatura já demonstraram que a ativação da via de Nrf2/ARE está relacionada com a patogênese bem como progressão da infecção por muitos vírus. Nesse caso, a ativação dos genes citoprotetores e antioxidantes permitem a manutenção da homeostase celular garantindo assim, a sobrevivência das células e a multiplicação viral (RAMEZANI; NAHAD; FAGHIHLOO, 2018).

Em alguns casos, os vírus podem modular a via Nrf2/ARE negativamente. Em células infectadas com o vírus da hepatite C (HCV), por exemplo, a inibição dessa via faz com que os níveis de ERO permaneçam elevados. Altas concentrações de ERO são potenciais ativadoras

da via de autofagia, o que pode favorecer a liberação das partículas virais da célula infectada, favorecendo assim, a disseminação do vírus no hospedeiro (RAMEZANI; NAHAD; FAGHIHLOO, 2018).

Associado a isso, diversos trabalhos da literatura apontam o estresse oxidativo como um fator relevante na patogênese de vários vírus como os vírus da hepatite C e B, vírus influenza, vírus da encefalite japonesa, vírus da dengue, vírus da imunodeficiência humana, vírus respiratório sincicial, vírus chigungunya e mayaro (AKAIKE et al., 1996; CAI et al., 2015; CAMINI et al., 2017b; DHANWANI et al., 2012; HOSAKOTE et al., 2009; KHADEM ANSARI; OMRANI; KHERADMAND, 2015; OLAGNIER et al., 2014; PAL et al., 2009; SCHWARZ, 1996; SOLDAN; GONZÁLEZ-SCARANO, 2005; ZHANG et al., 2014).

A interação das glicoproteínas de superfície dos vírus Influenza e Paramyxovírus com a membrana plasmática estimula a produção de ânion superóxido em fagócitos infectados (PETERHANS, 1997).

Nas hepatites virais, o estresse oxidativo contribui para o agravamento do quadro clínico dos pacientes infectados. A produção de ERO está relacionada com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular, um tumor característico observado em pacientes após anos de inflamação crônica no fígado (ABEL et al., 2009).

Pacientes infectados com o HIV estão sob efeito constante do estresse oxidativo. Além de modulações no sistema de defesa antioxidante, especialmente nas enzimas SOD e GPx, esses pacientes apresentam níveis elevados de hidroperóxidos e MDA no soro (DRÖGE; ECK; MIHM, 1994).

A infecção pelo DENV em humanos está relacionada com alterações no estado redox sugerindo assim, que o estresse oxidativo tem papel importante na patogênese desse vírus. Alguns estudos apontam que durante as fases febril e convalescente da infecção, alguns marcadores do dano oxidativo apresentam-se alterados diferencialmente podendo assim, funcionar como marcadores da progressão da doença (GIL et al., 2004; KLASSEN et al., 2004; SEET et al., 2009).

O estresse oxidativo também tem papel relevante na inflamação pulmonar decorrente da infecção pelo vírus respiratório sincicial (RSV). Durante a multiplicação viral em células epiteliais das vias aéreas ocorre intensa produção de ERO, as quais estão associadas com um processo inflamatório intenso, que pode contribuir para o agravamento do quadro dos pacientes infectados com esse vírus (CASOLA et al., 2001). Ainda, Hosakote e colaboradores demonstraram que em células humanas epiteliais das vias aéreas infectadas com o RSV há um

aumento nos produtos de peroxidação lipídica e diminuição da expressão das enzimas antioxidantes SOD1, SOD3, CAT e glutathione S-transferase (GST). Além disso, esses pesquisadores verificaram redução na atividade de SOD total e redução nas atividades de CAT, GPx e GST (HOSAKOTE et al., 2009). Esses dados mostram que o RSV é capaz de induzir dano oxidativo celular como resultado do desbalanço entre produção de ERO e as defesas antioxidantes celulares.

A infecção pelo vírus Sindbis (SINDV) ativa vias de sinalização por meio de proteínas quinases ativadas em condições de estresse como JNK e p38 MAPK, sugerindo que a infecção viral induz respostas de estresse na célula hospedeira e que isso pode afetar a multiplicação viral e a morte celular, sugerindo que para esse alphavírus, o estresse oxidativo está envolvido com apoptose (NAKATSUE et al., 1998).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou se a infecção pelo MAYV, um arbovírus da família *Togaviridae*, poderia causar estresse oxidativo e modular as defesas antioxidantes em células hepáticas (HepG2) e em macrófagos (J774). A infecção celular pelo MAYV levou a um aumento na produção de ERO e dos biomarcadores de estresse oxidativo, MDA e proteína carbonilada, bem como diminuição na razão glutathione reduzida e oxidada (GSH/GSSG). De maneira geral, a infecção causou um aumento nas defesas antioxidantes e também um aumento no conteúdo celular de Glutathione (CAMINI et al., 2017b).

Em outro trabalho do nosso grupo, a infecção de camundongos BALB/c com o MAYV causou doença auto-resolutiva, com redução significativa de ganho de peso, viremia, produção de anticorpos neutralizantes e alteração das transaminases hepáticas. Partículas infecciosas foram isoladas no fígado dos animais e um aumento no número de células inflamatórias foi observado no fígado dos animais infectados após análise histológica. A infecção aumentou os níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e alterou as enzimas antioxidantes, reforçando a hipótese que o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese viral (DA SILVA CAETANO et al., 2019).

Assim, diante das evidências que o estresse oxidativo desempenha papel importante na patogênese de diversos agentes etiológicos virais, dentre eles alguns arbovírus (DENV, SINDV, CHIKV e MAYV), o presente trabalho teve como objetivo avaliar alterações na homeostase oxidativa relacionadas com a infecção pelo ZIKV tanto em modelo celular como em modelo murino.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1- Geral

Avaliar o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes durante a infecção pelo ZIKV *in vitro* e *in vivo*.

#### 3.2- Específicos

3.2.1- Em células humanas de linhagem neuronal (U87-MG) e hepática (HepG2) infectadas com ZIKV avaliar:

- 3.2.1.1. A cinética da curva de ciclo único;
- 3.2.1.2. A produção de ERO;
- 3.2.1.3. Os níveis de malondialdeído e proteína carbonilada;
- 3.2.1.3. A atividade das enzimas SOD e CAT;
- 3.2.1.4. A atividade Nrf2/ARE.

3.2.2-Em camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV avaliar:

- 3.2.2.1. Sobrevida e sinais clínicos.

3.2.3-No soro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV verificar:

- 3.2.1.1. A atividade das transaminases hepáticas aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT);
- 3.2.1.2. A presença de anticorpos neutralizantes.

3.2.4- No fígado e no cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV avaliar:

- 3.2.4.1. A presença do vírus;
- 3.2.4.2. Alterações histopatológicas;
- 3.2.4.3. Os níveis de malondialdeído e proteína carbonilada;
- 3.2.4.4. A atividade das enzimas SOD e CAT.



## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Células e vírus

Para a execução deste trabalho, foram utilizadas células C6/36 (*Aedes albopictus* clone) e células Vero (rim de macaco verde africano), para a propagação e titulação da amostra viral, respectivamente. Para os demais experimentos, foram utilizadas células humanas de glioblastoma (U87-MG) e de hepatocarcinoma (HepG2). As células Vero, C6/36 e HepG2 foram gentilmente cedidas pela professora Erna Geeisen Kroon, do Laboratório de Vírus, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A célula U87-MG (0241) foi obtida comercialmente do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ-FOR.GQ.006.3).

As células C6/36 foram mantidas em meio L-15 Leibovitz (*Cultilab*, Brasil) e as demais (Vero, HepG2 e U87-MG) em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Cultilab*, Brasil). Todos os meios foram suplementados com 10% Soro Fetal Bovino (SFB, *Cultilab*, Brasil), penicilina/estreptomicina (200U/mL) e anfotericina B (2,5µg/mL) (*Sigma- Aldrich*, EUA). As células C6/36 foram mantidas em estufa tipo demanda bioquímica de oxigênio (BOD), a 28°C, enquanto as demais em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os repiques foram realizados quando a monocamada celular atingiu 90-100% de confluência.

A amostra do ZIKV (*ZIKA/H.sapiens/Brazil/PE-243/215/GenBank:KX197192.1*), originalmente obtida de um morador do Estado de Pernambuco (Brasil) apresentando a febre Zika sem complicação, foi gentilmente cedida pela professora Erna Geeisen Kroon, do Laboratório de Vírus da UFMG. A amostra foi levada para a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e armazenada em freezer -80°C até o momento o uso.

### 4.2- Multiplicação e titulação do vírus

Para a produção dos estoques virais, o ZIKV foi multiplicado em garrafas médias (75cm<sup>2</sup>) contendo monocamada de C6/36. A adsorção foi realizada em estufa tipo BOD, a 28°C com homogeneização constante durante 1h. Após essa etapa, foram adicionados 15mL de meio L-15 Leibovitz com 10% SFB. A garrafa foi incubada por 7 dias. O sobrenadante da infecção celular foi transferido para um tubo cônico tipo falcon e centrifugado a 5000rpm por 10min a 4°C em centrífuga modelo 5804R (*Eppendorf*, Brasil). O sobrenadante clarificado foi

aliquotado em microtubos e armazenado em freezer -80°C (Acesso SisGen AF85085) para posterior titulação.

Para a realização da titulação, células Vero foram cultivadas em placas de 6 poços (1/10<sup>6</sup> células/poço) e, após 90% de confluência, foram adicionados 200µL de diluições seriadas do ZIKV em 5 poços, deixando 1 poço como controle negativo, no qual foram adicionados 200µL de meio DMEM 0% SFB. Para a adsorção viral, as placas foram mantidas a 37°C na presença de CO<sub>2</sub>, por uma hora, e homogeneizadas em intervalos regulares de 10min. Após esse período, o meio contendo as partículas que não adsorveram foi removido, as células foram lavadas com solução salina PBS (*phosphate buffered saline*) e em cada poço foram adicionados 2mL de DMEM 2% de SFB acrescido de carboximetilcelulose (CMC) a 1,5%, seguindo de nova incubação a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Após 3 dias as células foram fixadas em solução 10% de formol por 2h. Após o descarte e lavagem do formol, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta por 15min. O título foi expresso pelo número de unidades formadoras de placa (UFP) obtido nos poços cujas diluições apresentaram entre 30 e 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição e convertido para UFP/mL. O título encontrado foi de 10<sup>9</sup> UFP/mL.

#### **4.3- Curva de ciclo único em células HepG2 e U87-MG**

Para construção da curva de ciclo único do ZIKV nas células U87-MG e HepG2, essas foram implantadas em placas de 6 poços e infectadas com o ZIKV numa multiplicidade de infecção (MOI) de 5. Após 1h de adsorção, com homogeneização constante a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, a monocamada foi lavada duas vezes com PBS 1X e foram adicionados 2mL de meio DMEM 10% SFB. Nos tempos de 6, 15 e 24 horas pós-infecção (hpi) o sobrenadante das células foi coletado e aliquotado para posterior titulação em células Vero, assim como descrito no item 4.2. Com os resultados obtidos foram traçadas as curvas de ciclo único para ambas linhagens celulares.

#### **4.4- Dosagem das ERO**

A produção de ERO intracelular foi mensurada por meio do Kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (*Invitrogen*®, EUA), o qual permite a detecção de ERO por fluorescência. A técnica utiliza um marcador flurogênico(5-ou-6)-carboxy-2',7'

dichlorodihydrofluoresceindiacetate (carboxy-H2DCFDA), que quando quebrado por esterases intracelulares não específicas gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as ERO tornando-se fluorescente.

Os ensaios foram realizados em placas brancas de poliestireno de 96 poços, nas quais foram adicionadas  $2,5 \times 10^4$  células (U87-MG ou HepG2) em cada cavidade e incubadas por cerca de 45min em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> para aderência. Após esse tempo, as células foram lavadas com solução salina equilibrada de Hanks (HBSS) pH 7,4 e infectadas com ZIKV numa MOI de 5. Nos poços controles negativos foram adicionados meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 sem vermelho de fenol (*Sigma- Aldrich*, EUA).

Após 15 e 24hpi as células foram lavadas novamente com HBSS e incubadas com 100µL/poço da sonda (25µM) por 30min a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, no escuro. Após a incubação, foram feitas leituras da intensidade de fluorescência à 485/535nm (excitação/transmissão) utilizando o leitor de microplaca tipo VICTOR™ X3 Multilabel (*Perkin Elmer*, EUA), com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes com seis replicatas cada.

#### **4.5- Dosagem dos biomarcadores de estresse oxidativo**

##### 4.5.1- Preparo da amostra biológica

As células U87-MG ou HepG2 foram semeadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas ou não com ZIKV (MOI 5). Após 15 e 24hpi, os sobrenadantes das células foram descartados, os poços lavados com PBS 1X e as células “descoladas” com espalhadores tipo *scrapers*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000rpm por 3min em temperatura ambiente em centrífuga modelo MicroCen 16 (*Herolab*, Brasil). Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado em PBS 1X. As amostras foram congeladas e descongeladas 3x em freezer -20°C para lise celular. Em seguida, os lisados celulares foram centrifugados a 10000rpm por 15min em temperatura ambiente em centrífuga modelo MicroCen 16 (*Herolab*, Brasil). Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer -80°C até o momento da realização das dosagens.

#### 4.5.2- Dosagem de MDA

A peroxidação lipídica foi mensurada utilizando os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme descrito por Buege e Aust (BUEGE; AUST, 1978). Para a realização da dosagem, foi feita uma mistura contendo os lisados celulares, dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1%, ácido acético 2,5M e ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa mistura foi incubada, em banho-maria, a 95°C por 90min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 5000rpm por 5min na centrífuga MicroCen 16 (*Herolab*, Brasil). Após a centrifugação, as amostras foram pipetadas, em triplicata, em uma placa de 96 poços.

As leituras foram realizadas em modo fotométrico a 532nm no leitor de microplaca tipo VICTOR™ X3 Multilabel (*Perkin Elmer*, EUA), com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5. Os níveis de TBARS foram calculados como a concentração equivalente de MDA participante da reação em micromolar( $\mu\text{M}$ ). Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes com nove replicatas cada.

#### 4.5.3- Dosagem de proteína carbonilada

Os níveis de proteína carbonilada foram determinados de acordo com o método descrito por Levine e colaboradores (LEVINE; WILLIAMS; STADTMAN, 1994). Para a dosagem, foi adicionado ao lisado celular ácido tricloroacético (TCA 10%) e essa mistura foi centrifugada a 5000rpm, 4°C por 10min em centrífuga modelo 5804R (*Eppendorf*, Brasil). Após esse processo, os sobrenadantes foram descartados e foi adicionado aos tubos a solução contendo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH 10mM). Em seguida, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 60min no escuro com vigorosa agitação a cada 15min. Após o período de incubação, TCA 10% foi adicionado em cada amostra e a mistura foi centrifugada a 5000rpm, 4°C por 10min em centrífuga modelo 5804R (*Eppendorf*, Brasil) e os sobrenadantes descartados. No passo seguinte, os precipitados foram lavados com solução de etanol/acetato de etila (1:1), agitados, novamente centrifugados (como relatado na etapa anterior) e o sobrenadante descartado. Essa etapa foi repetida por duas vezes. Por fim, foi adicionada uma solução de SDS (6%) seguida de agitação vigorosa e centrifugação a 10000rpm, 4°C por 10min em centrífuga modelo 5804R (*Eppendorf*, Brasil).

O conteúdo de proteína carbonilada foi medido pela derivatização da proteína carbonilada com DNPH que resulta na geração do produto dinitrofenilhidrazona (DNP). A

absorbância das amostras foi determinada em cubeta de quartzo a 370nm em espectrofotômetro (*UV-1800, Shimadzu, EUA*). A concentração das proteínas derivatizadas com DNPH foi calculada utilizando um coeficiente de absorção molar de  $22.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Os resultados foram expressos em nmol de DNPH incorporado/mg de proteína. Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes com nove replicatas cada.

#### 4.6- Atividade das enzimas antioxidantes

##### 4.6.1- Preparo da amostra biológica

As células U87-MG ou HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1 \times 10^6$  células/poço) e infectadas ou não com ZIKV (MOI 5). Nos tempos de 15 e 24hpi as células foram lavadas com PBS1X e “descoladas” da monocamada com a utilização de espalhadores tipo *scrapers*. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5000rpm por 15min em temperatura ambiente em centrífugamodeloMicroCen 16 (*Herolab, Brasil*). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS 1X, e as amostras foram congeladas e descongeladas 3x para lise celular em freezer  $-20^\circ\text{C}$ . No passo seguinte, os lisados celulares foram centrifugados a 10000rpm por 15min em temperatura ambiente em centrífuga modeloMicroCen 16 (*Herolab, Brasil*). Os sobrenadantes foram então coletados e armazenados em freezer  $-80^\circ\text{C}$  para a realização das dosagens.

##### 4.6.2- Atividade total de SOD

A atividade total da enzima SOD foi determinada pelo método proposto por Marklund (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Esse método leva em consideração a inibição da auto-oxidação do pirogalol, que se auto-oxida rapidamente em solução aquosa, produzindo uma coloração amarelada cuja intensidade de cor pode ser determinada. Tal processo é dependente da presença de ânions superóxidos, já que a SOD inibe a auto-oxidação do pirogalol quando catalisa a dismutação desse ânion. Dessa forma, uma unidade da enzima SOD (U SOD) foi definida como a quantidade de enzima que reduz a taxa de auto-oxidação do pirogalol em 50%.

Para o procedimento, as amostras foram misturadas com tampão fosfato (50mM pH7), pirogalol (15mM) e brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólico) (MTT)

(1,25mM) em uma placa de 96 poços. Essa mistura foi incubada por 5min a 37°C. Em seguida, a reação foi interrompida com dimetilsulfóxido (DMSO). As leituras foram feitas a 570nm no leitor de Elisa monocromador EPOCH com software Gen5 análise de dados. A atividade da SOD foi expressa em U/mg proteína. Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes com nove replicatas cada.

#### 4.6.3- Atividade de CAT

A atividade da enzima CAT foi determinada pela taxa de degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conforme proposto por Aebi(AEBI, 1984). A decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela CAT foi mensurada em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, EUA) a 240 nm durante um período de 60 segundos. O decaimento da absorvância decorrente da degradação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é proporcional à atividade da enzima seguindo o princípio da Lei de Lambert Beer, na qual 1U de CAT corresponde a 1µmolde hidrólise do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto, por mL. Para o cálculo da atividade da CAT foi utilizado o coeficiente de extinção molar em unidades de 39,4 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. A atividade da CAT foi expressa em U/mg de proteína. Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes com nove replicatas cada.

#### 4.7 - Dosagem de proteínas totais

O conteúdo de proteínas totais foi determinado com DyeConcentrateReagent (Bio-RadProteinAssay, Bio-Rad, EUA). Foi construída uma curva de calibração utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. A absorvância foi medida no leitor demicroplaca tipo VICTOR™ X3 Multilabel (Perkin Elmer, EUA), com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5., a 595nm. O cálculo da concentração de proteínas nas amostras foi realizado de acordo com a equação da reta obtida na curva padrão.

#### 4.8- Ensaio de luciferase

Para realização do ensaio de luciferase, primeiramente, as células U87-MG ou HepG2 foram cultivadas em meio optiMEM (Gibco, EUA) e semeadas em placas de 24 poços (2,5x10<sup>5</sup> células/poço). Após a adesão celular, as células foram transfectadas com os plasmídeos

pGL4.37 e pRL-TK (Anexo I e II) utilizando o kit lipofectamine 3000 (*Invitrogen*, EUA), conforme as recomendações do fabricante, e mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h de incubação, ambas as linhagens celulares foram infectadas com ZIKV (MOI 5). Nos tempos de 15 e 24hpi foi avaliada a atividade do fator de transcrição Nrf2/ARE utilizando o kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (*Promega*, EUA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

A intensidade de luminescência foi mensurada em luminômetro (*Sirius-Tiertek Berthold*, EUA). Foram realizadas duas leituras, com intervalo de 10 segundos entre elas. Na primeira leitura foi adicionada a solução LARII, a qual fornece o substrato da enzima luciferase do vagalume (luciferina). Já na segunda leitura foi utilizado o reagente StopGlo que inativa a luciferase do vagalume e contém o substrato da enzima luciferase de *Renilla sp.* Os resultados foram normalizados pela divisão dos valores obtidos na primeira leitura pelos valores obtidos na segunda leitura e expressos em intensidade relativa de luz. Os ensaios de luciferase foram realizados em duas replicatas independentes para as duas linhagens celulares.

#### **4.9- Infecção experimental de camundongos C57BL/6**

Para realização dos experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6 (tipo selvagem) com 10 dias de vida. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. Todos os procedimentos realizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP (Protocolo nº 7393091018-Anexo III).

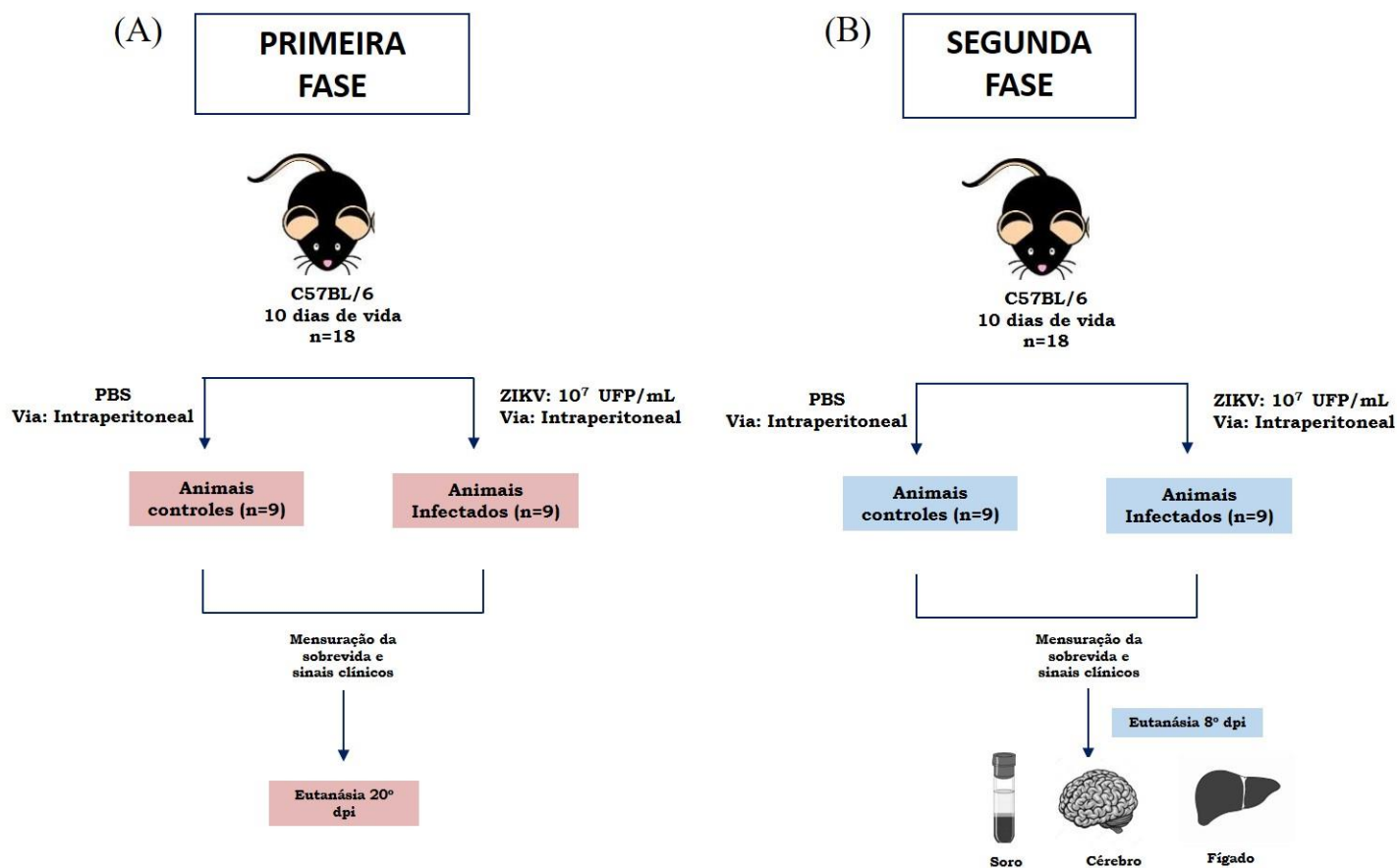
Os animais foram acondicionados em caixas de prolipropileno em sistema de microisolador e mantidos em ambiente com controle de temperatura, luz e umidade. Além disso, os filhotes permaneceram com as mães (não-infectadas) durante todo o período de experimentação, visto que esses animais ainda estavam no período de amamentação.

Inicialmente, dois grupos experimentais contendo ao todo 18 animais (9 animais infectados e 9 animais controles) foram infectados com 50µL de solução contendo 10<sup>7</sup> UFP do ZIKV via intraperitoneal (ip) (grupo infectado) ou inoculados, também via ip, com 50µL de PBS 1X (grupo controle). As injeções foram realizadas com seringas de tuberculina (*BD Plastipak*, 0,38 x 13-27,5 G1/2, EUA). Após a infecção, os camundongos foram observados diariamente com relação à sobrevivência e desenvolvimento de sinais clínicos, por um período de 20 dias. Passado esse período, os animais que sobreviveram foram anestesiados com solução

de cloridrato de cetamina (*Ketamina*<sup>®</sup> 10%, *Agener União*, Brasil) e cloridrato de xilazina (*Kensol*<sup>®</sup> Cloridrato de xilazina 2%, *Konig*, Brasil) e eutanasiados por exanguinação. Todo procedimento foi realizado com auxílio de material cirúrgico estéril (figura 9A).

Mais dois grupos experimentais contendo um total de 18 animais (9 animais infectados e 9 animais controles) foram infectados ou não com ZIKV (conforme descrito acima) e eutanasiados no 8º dia pós-infecção (dpi). O processo de eutanásia foi executado conforme descrito acima. Após a exanguinação, foi realizada perfusão cardíaca com solução de PBS 1X. Amostras de sangue total foram retiradas e centrifugadas a 5.000rpm por 10min a 4°C (centrífuga 5804 R, *Eppendorf*, Brasil) para obtenção do soro. O fígado e o cérebro de cada animal foram coletados e armazenados em freezer -80º até o momento das dosagens (figura 9B).

**Figura 9: Desenho experimental da etapa *in vivo*.** Na primeira fase da etapa *in vivo*, dois grupos experimentais contendo ao todo 18 animais (9 animais infectados e 9 animais controles) foram infectados com  $10^7$  UFP do ZIKV via ip (grupo infectado) ou inoculados, também via ip, com PBS 1X (grupo controle). Os camundongos foram observados diariamente com relação à sobrevida e desenvolvimento de sinais clínicos, por um período de 20 dias (A). Na segunda etapa mais dois grupos experimentais contendo um total de 18 animais (9 animais infectados e 9 animais controles) foram infectados ou não com ZIKV e eutanasiados no 8º dia pós-infecção (dpi) para obtenção do soro, cérebro e fígado (B).





#### 4.10- Histopatologia e imunohistoquímica

Após a eutanásia, fragmentos do cérebro e fígado de cada animal foram coletados, fixados em solução 10% de formol tamponado, desidratadas em soluções de etanol (70%, 90% e 100%), lavadas com xilol e embebidas em parafina. Os blocos contendo os tecidos foram cortados em sessões de 4-5µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina & Eosina (H&E) (*Reagen*, Rio de Janeiro, Brasil) e analisadas via microscopia óptica.

Para as análises imunohistoquímicas, os cortes foram desparafinados em xilol, reidratados em soluções de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) e lavados com PBS 1X. A etapa de reativação gênica foi realizada em tampão citrato 10mM (pH6,0) a 95°C por 15min. Em seguida, as amostras foram incubadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 30min para o bloqueio da peroxidase endógena. Para bloqueio de ligações em sítios inespecíficos, as amostras foram embebidas em solução de leite em pó Molico 3% (*Nestlé*, Brasil) por 10min. Posteriormente, as amostras foram incubadas com diferentes diluições (1:100, 1:500, 1:1000) do anticorpo primário anti-flavivírus, clone D1-4G2-4-15 (*Milipore*, #MAB10216, EUA) por 18h a 4°C em câmara úmida. As diluições do anticorpo foram feitas em solução de BSA (0,1%). Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com PBS 1X e incubadas com o anticorpo secundário biotilado (*Dako*, NIH) por 90min, em temperatura ambiente e câmara úmida, e novamente lavadas com PBS 1X. Em seguida, foi adicionado o anticorpo terciário contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (*Dako*, NIH, EUA) por 60min, temperatura ambiente em câmara úmida. Por fim, as amostras foram lavadas com PBS 1X contendo 3',3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride (*Sigma- Aldrich*, EUA) (0,05%) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,03%) e coradas com H&E. A verificação de marcação foi realizada em microscópio óptico.

#### 4.11- Titulação ZIKV fígado e cérebro

A quantificação das partículas virais viáveis presentes nas amostras de fígado e cérebro foi realizada por titulação. Para tanto, aproximadamente 20mg de cada tecido dos animais infectados foram homogeneizados em 200µL de PBS 1X a 4°C (gelo). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 5min a 4°C (centrífuga 5804 R, *Eppendorf*, Brasil). Os sobrenadantes foram aliquotados e armazenados em freezer -80°C até o momento do ensaio. A titulação foi realizada conforme descrito no item 4.2.

#### 4.12- Detecção do genoma do ZIKV no fígado e cérebro por PCR em tempo real

A carga viral no fígado e no cérebro foi determinada por PCR em tempo real. Cerca de 20mg de cada tecido dos animais infectados foram utilizados para extração do RNA total, utilizando o Kit Total RNA Isolation System (*RNAagents*<sup>®</sup>, Promega, EUA), conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante. Em seguida, o RNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro Nano Vue (*GE Healthcare*, Reino Unido) e estocado no freezer -80°C até o momento do uso. Para síntese do cDNA, 2µg do RNA total foram utilizados e as reações feitas em um volume final de 20µL, utilizando a enzima MultiScribe<sup>™</sup> (50U/µL) e oligos randômicos (*GeneAmpR RNA PCR*, Applied Biosystems, EUA), nas concentrações indicadas pelo fabricante.

O RNA extraído de uma amostra de ZIKV do estoque de vírus do LBTM foi utilizado como controle positivo da reação e o RNA extraído do fígado e do cérebro de um animal não infectado foi utilizado como controle negativo da reação.

O cDNA resultante das reações de RT-PCR foi utilizado como molde para as reações de PCR em tempo real. As amplificações foram feitas com o Kit SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*, EUA), conforme as recomendações do fabricante. As reações foram feitas a 95°C 15seg e 60°C 1min por 40 vezes. O termociclador ABI 7500 Real Time PCR Instrument (*Applied Biosystems*, EUA) foi utilizado e os valores de  $\Delta C_t$  foram corrigidos pelo valor do gene normalizador GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). O valor de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  foi calculado para a determinação dos resultados.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados são mostradas abaixo. Os iniciadores para o genoma do ZIKV foram desenhados conforme descrito na literatura (LANCIOTTI et al., 2008) e tem como alvo a porção do genoma do vírus codificadora da proteína prM. Já os iniciadores para o GAPDH foram desenhadas com base nas sequências de nucleotídeos do organismo *Mus musculus*, disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As construções foram feitas com o auxílio do programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

**Tabela I.** Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado do amplificado e número de acesso no GenBank

Gene	Foward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Amplicon	GenBank
ZIKV	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC	76pb	AY_632535
GAPDH	TGCCAGCCTCGTCCCGTAGA	ACTGTGCCGTTGAATTGCCGT	197pb	BC_145810

#### 4.13- Ensaio de soroneutralização

A primeira etapa do ensaio de soroneutralização consistiu em inativar o sistema complemento. Para isso, as amostras de soro foram mantidas a 56°C por 30min em banho-maria. Em seguida, essas amostras foram diluídas em meio DMEM 0% SFB nas proporções 1:10, 1:50 e 1:100. Cada uma dessas diluições foi misturada com 150 UFP do ZIKV e a mistura incubada a 37°C por 60min. Posteriormente, a mistura vírus mais soro foi utilizada para infectar monocamada de células Vero, as quais foram previamente implantadas em placas de 24 poços. Após o período de adsorção (1h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e agitação constante) foi adicionado nos poços 1mL de meio DMEM 2% SFB acrescido de CMC 1,5%. As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por um período de 3 dias. Após esse tempo, as células foram fixadas com solução de formol 10% por 120min e coradas com solução de cristal violeta 1% por 15min. O título de anticorpos neutralizantes presentes nas amostras foi expresso como unidades neutralizantes por mL de soro (NU/mL). O cálculo desse título foi realizado de acordo com a seguinte equação: (1mL/volume da mistura vírus e soro utilizado para infectar as células em mL) x inverso da diluição onde houve redução de 90% das UFP.

#### 4.14- Dosagem da atividade das transaminases hepáticas

Níveis séricos das transaminases hepáticas aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT) foram determinados utilizando os kits #52 e 53 da Labtest (*Labtest*, Brasil), conforme as recomendações do fabricante.

#### 4.15- Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e no cérebro

Para a realização da dosagem de MDA foram utilizados 20mg de cada tecido, os quais foram homogeneizados em 200µL de tampão fosfato (pH7,4) e centrifugados a 10.000rpm por 10min a 4°C (centrífuga 5804R, *Eppendorf*, Brasil). O sobrenatante coletado foi utilizado como amostra biológica.

Níveis de proteína carbonilada foram mensurados a partir de 60mg de fígado e de cérebro que foram homogeneizados em 600µL tampão fosfato (50mM, pH6,7 e EDTA 1mM).

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000rpm por 10min a 4°C (centrífuga 5804R, *Eppendorf*, Brasil). O sobrenadante obtido foi utilizado como amostra biológica.

Os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo foram determinados conforme descrito anteriormente nos itens 4.5.2 e 4.5.3.

#### **4.16- Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes no fígado e no cérebro**

Fragmentos de 20mg de fígado e cérebro foram homogeneizados em 200μL de tampão fosfato (0,1M e pH7,2) e centrifugados a 10.000rpm por 10min a 4°C (centrífuga 5804R, *Eppendorf*, Brasil). O sobrenadante foi utilizado como amostra biológica para a determinação da atividade das enzimas SOD e CAT de acordo com os métodos descritos acima nos itens 4.6.2 e 4.6.3.

#### **4.17- Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6.0 software. De acordo com o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov as diferenças entre os grupos infectados e controles foram consideradas significantes quando o valor de *P* foi menor ou igual a 0,05 por meio do teste t-student. \**P*<0.05, \*\**P*<0.01 and \*\*\**P*<0.001. Os resultados foram expressos como média ± SD (desvio padrão).

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Curva de ciclo único do ZIKV em células U87-MG e HepG2

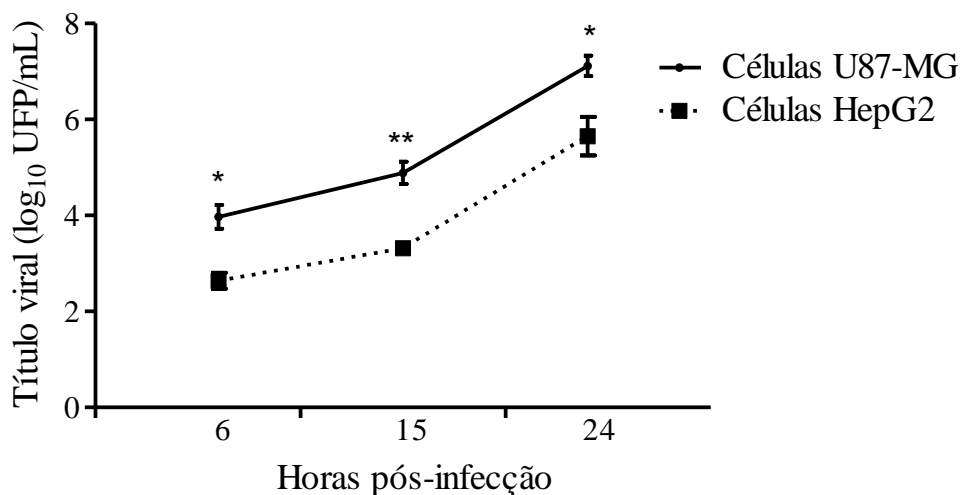
Uma vez que já é bem descrito na literatura que o ZIKV possui tropismo por tecidos neuronais e que linhagens celulares derivadas de fígado são permissivas a infecção pelo vírus, as células U87-MG e HepG2 foram selecionadas para a execução dos experimentos *in vitro* no presente trabalho.

A fim de confirmar que o ZIKV é capaz de infectar e multiplicar em tais células, bem como elucidar a eficiência da produção de partículas virais viáveis, foi construída uma curva de ciclo único para cada linhagem celular.

As células U87-MG e HepG2 foram infectadas com ZIKV (MOI 5) e amostras do sobrenadante foram coletadas em diferentes tempos pós-infecção para posterior titulação em células Vero. Como mostrado na Figura 9, ambas as linhagens celulares foram permissivas a infecção pelo ZIKV visto que quantidades significativas de vírus foram detectadas a partir de 6hpi. Entretanto, títulos virais mais altos foram encontrados nas células U87-MG. Nessas células, o título viral foi aproximadamente  $10^8$  UFP/mL 24hpi ( $7,11 \pm 0,36 \log_{10}$  UFP/mL), ao passo que nas células HepG2 o título foi cerca de duas unidades logarítmicas menor 24hpi ( $5,65 \pm 0,69$  UFP/mL).

Assim, esses resultados demonstram que células U87-MG e HepG2 são susceptíveis e permissivas a infecção pelo ZIKV e que esse vírus é capaz de multiplicar de forma eficiente nessas células atingindo títulos satisfatórios.

**Figura 10: Curva de ciclo único do ZIKV nas células U87-MG e HepG2.** Células U87-MG e HepG2 foram infectadas com ZIKV (MOI 5). Alíquotas do sobrenadante foram coletadas em diferentes tempos pós-infecção e tituladas em células Vero por contagem das UFP. Valores de *P* representam diferenças significativas entre os títulos virais encontrados nas duas linhagens celulares, onde \**P*<0.05 e \*\**P*<0.01 (teste t-Student). Os dados estão representados como média ± SD e incluem resultados de três experimentos independentes.

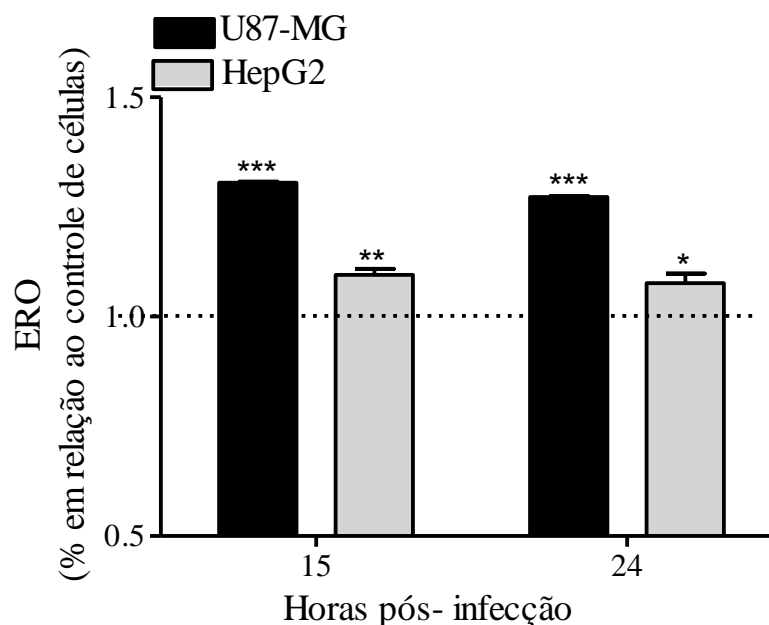


## 5.2- Produção de ERO em células U87-MG e HepG2

O estímulo para produção de ERO é um fenômeno comum em infecções virais e tem como finalidade conter a infecção. Nesse sentido, para verificar se a infecção pelo ZIKV induz aumento na formação de ERO nas células infectadas, a produção dessas espécies foi mensurada em diferentes tempos.

As células U87-MG e HepG2 foram infectadas com ZIKV (MOI 5) e os níveis de ERO foram dosados utilizando uma sonda que, ao reagir com essas espécies, emite fluorescência verde. A Figura 10 mostra que, nos tempos de 15 e 24hpi houve um aumento na produção de ERO nas células infectadas quando comparadas com as células controles.

**Figura 11: Produção de ERO nas células U87-MG e HepG2 infectadas com ZIKV.** Células U87-MG e HepG2 foram infectadas ou não com ZIKV (MOI 5). Nos tempos de 15 e 24hpi as células foram carregadas com 25 $\mu$ M da sonda carboxi-H<sub>2</sub>DCFDA e a quantidade de ERO produzida foi representada como % da intensidade média de fluorescência em relação às células controles (indicado pela linha tracejada como 100%). Os resultados incluem dados de três experimentos independentes com seis replicadas cada e estão representados como média  $\pm$ SD. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ < 0.01 e \*\*\* $P$ < 0.001, em relação às células controles (teste t-Student).



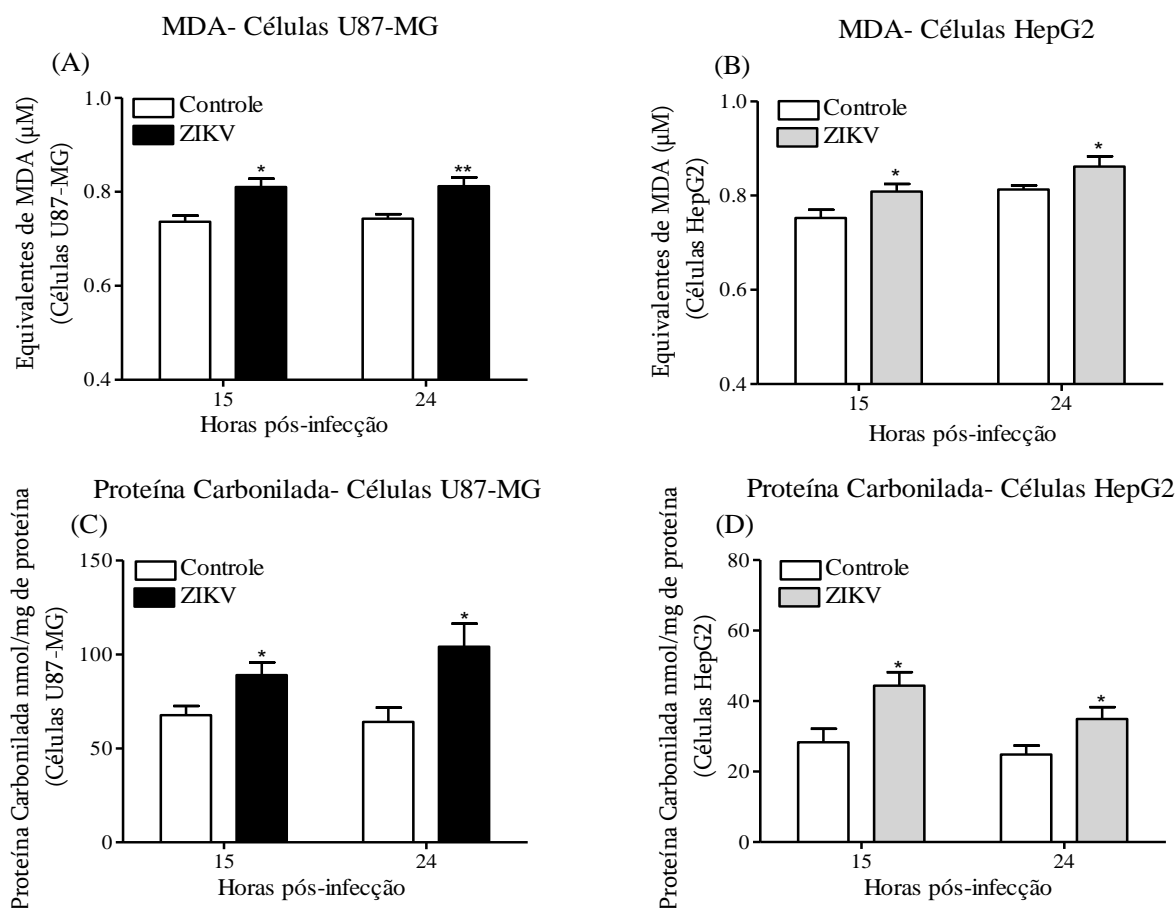
### 5.3- Avaliação do estresse oxidativo em células U87-MG e HepG2

Uma vez que a infecção pelo ZIKV induziu uma maior produção de ERO em células U87-MG e HepG2, nosso próximo passo foi verificar se esse evento poderia estar relacionado com estresse oxidativo celular. Para tal, foram avaliados os níveis do biomarcador de peroxidação lipídica (MDA) e de oxidação proteica (proteína carbonilada) nas células infectadas e controles, nos tempos de 15 e 24hpi.

A infecção pelo ZIKV resultou em um aumento significativo nos níveis de MDA nas células U87-MG (Figura 11A) e HepG2 (Figura 11B) em todos os tempos analisados. De forma semelhante, os níveis de proteína carbonilada aumentaram nas células neuronais e hepáticas infectadas 15 e 24hpi (Figura 11C e D).

Desse modo, com os dados apresentados até aqui, podemos inferir que a infecção pelo ZIKV induz estresse oxidativo *in vitro*.

**Figura 12: Estresse oxidativo em células U87-MG e HepG2 infectadas com ZIKV.** Células U87-MG e HepG2 foram infectadas ou não com ZIKV (MOI 5). Os lisados celulares coletados 15 e 24hpi foram utilizados para realização das dosagens dos biomarcadores de estresse oxidativo MDA (A e B) e proteína carbonilada (C e D). Os resultados incluem dados de dois experimentos independentes (média  $\pm$  SD, n=9), onde \* $P$ < 0.05 e \*\* $P$ < 0.01 em comparação com as células controles (teste t- Student).



#### 5.4- Avaliação da atividade de SOD e CAT em células U87-MG e HepG2

Dado que foi observado que a infecção pelo ZIKV induz maior produção de ERO e estresse oxidativo em células U87-MG e HepG2, nosso próximo objetivo foi investigar se a infecção poderia modular as defesas antioxidantes celulares. Assim, avaliamos a atividade das enzimas SOD e CAT nas células U87-MG e HepG2 infectadas ou não com ZIKV.

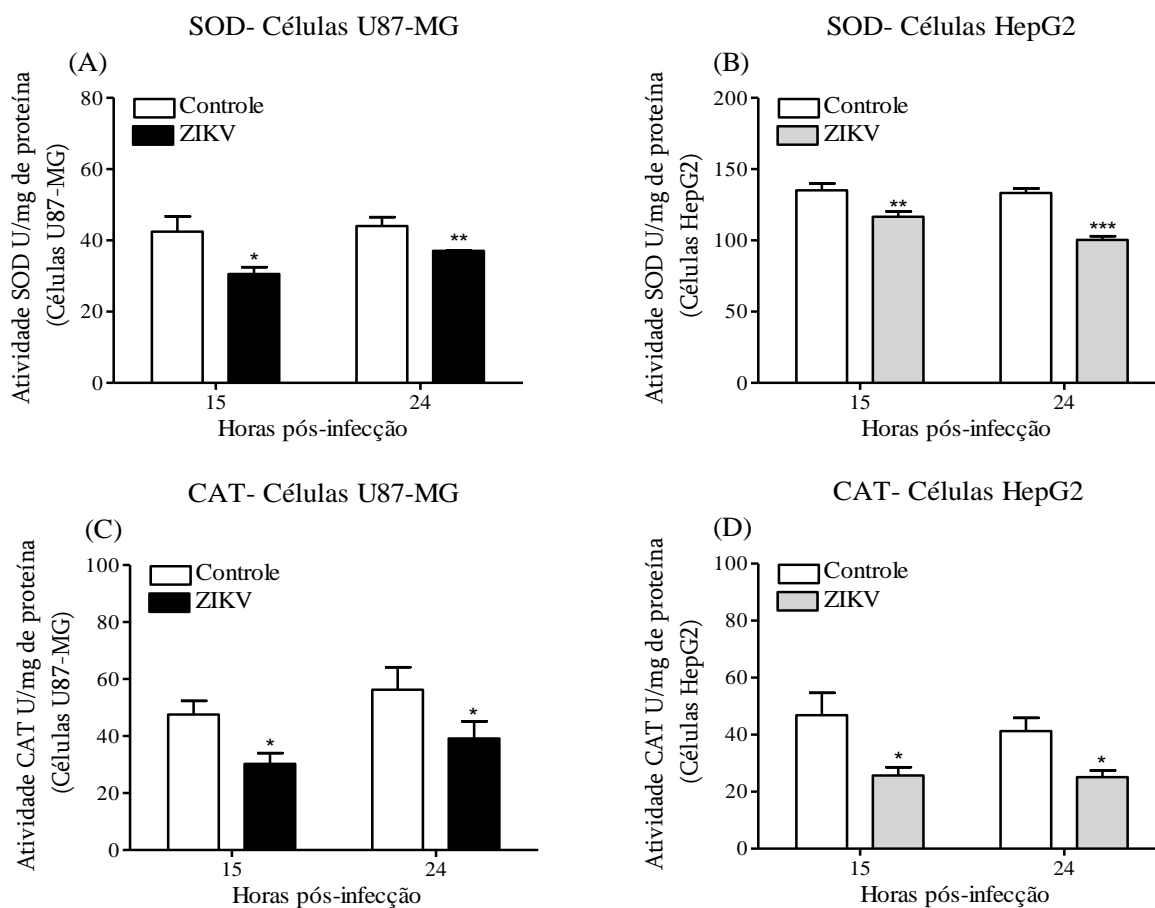
As enzimas SOD são a primeira linha do sistema defesa antioxidante enzimático, já que protegem os alvos celulares do ataque do  $O_2^{\cdot-}$ . Os resultados mostram que nos tempos de 15 e 24hpi houve uma diminuição na atividade total de SOD nas células infectadas em relação às células controles (Figura 12 A e B).



Após atuação das enzimas SOD ocorre dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  e formação de  $H_2O_2$ . Esse, por sua vez, é convertido em água e oxigênio molecular pela enzima CAT. Como observado na Figura 12C e D, a atividade dessa enzima diminuiu de forma significativa nas células U87-MG e HepG2 em todos os tempos analisados.

Assim, esses resultados sugerem que o estresse oxidativo está relacionado com uma depleção no sistema enzimático antioxidante nas células infectadas com ZIKV.

**Figura 13: Depleção no sistema antioxidante enzimático em células U87-MG e HepG2 infectadas com ZIKV.** Células U87-MG e HepG2 foram infectadas ou não com ZIKV (MOI 5). Nos tempos de 15 e 24hpi os lisados celulares foram coletados e utilizados para realização das dosagens das atividades das enzimas SOD (A e B) e CAT (C e D). Os resultados estão representados como média  $\pm$  SD (n=9) e incluem dados de dois experimentos independentes, onde \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$  em comparação com as células controles (teste t-Student).

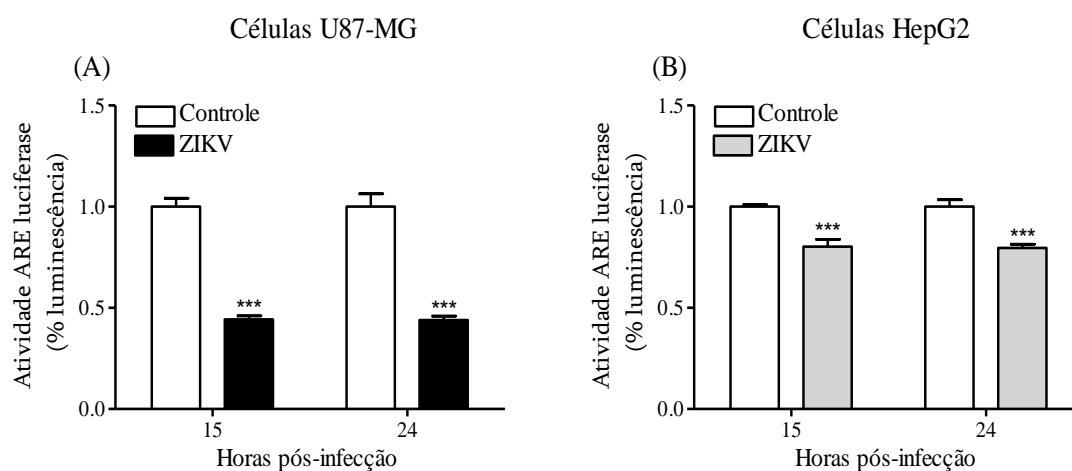


### 5.5- Avaliação da regulação da via Nrf2 pelo ZIKV em células U87-MG e HepG2

A via de Nrf2 é fundamental na regulação da expressão dos genes relacionados com as defesas antioxidantes. Uma vez que foi observada diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT nas células infectadas com ZIKV, o próximo passo foi investigar se a infecção poderia alterar a via de Nrf2. Como pode ser observado na Figura 13, houve uma significativa inibição da via de Nrf2 nas células U87-MG (Figura 13A) e HepG2 (Figura 13B) nas células infectadas em comparação com as células não infectadas, nos tempos 15 e 24hpi.

Dessa forma, esses resultados indicam que a depleção das enzimas SOD e CAT pode estar relacionada com a regulação negativa da via de Nrf2 após a infecção pelo ZIKV.

**Figura 14: Inibição da ativação da via de Nrf2 em células U87-MG e HepG2 infectadas com ZIKV.** As células U87-MG e HepG2 foram transfectadas com o plasmídeo pGL4.37 que contém o gene reporter da luciferase do vagalume. Após 24h, as células foram infectadas com ZIKV (MOI 5). As diferenças na intensidade de luminescência entre as células controles e infectadas foram mensuradas 15 e 24hpi. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  SD e foram obtidos a partir da realização de três experimentos independentes com nove replicatas cada, onde\*\*\* $P < 0.001$  (teste t-Student).



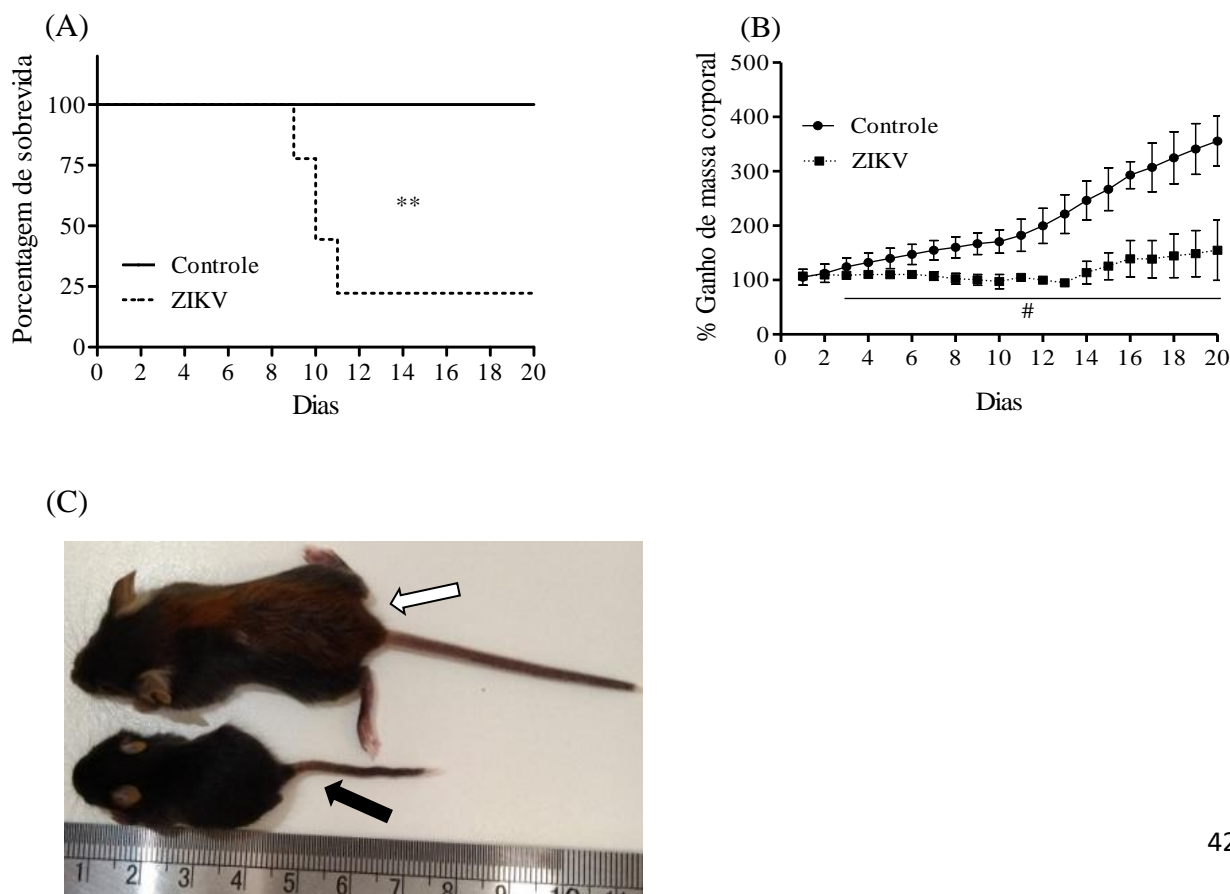
### 5.6 - Sobrevida e sinais clínicos em camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV

Uma vez que verificamos que a infecção *in vitro* pelo ZIKV causa aumento dos níveis de ERO, dos biomarcadores de estresse oxidativo e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, nosso próximo passo foi verificar se essas alterações também poderiam ocorrer *in vivo*. Para tal, utilizamos como modelo animal camundongos C57BL/6 de 10 dias de vida, infectados via ip. Primeiramente avaliamos a susceptibilidade desses animais à infecção. Para isso, os camundongos foram infectados com  $10^7$  UFP do vírus e monitorados diariamente para observação dos sinais clínicos e sobrevida, por um período de 20 dias.

A maioria dos animais infectados morreram até o 11º dpi e 2 animais sobreviveram até último dia de experimentação (Figura 14A). Todos os animais infectados apresentaram sinais clínicos a partir do 5º dpi, caracterizados por piloereção, prostração, conjutivite, tremores e arqueamento de dorso. Além disso, houve uma significativa diferença na porcentagem de ganho de massa corporal entre o grupo de animais controles e infectados (Figura 14B). Os animais infectados ganharam menos massa corporal que os animais controles e essa diferença foi evidenciada a partir do 3º dpi. Vale ressaltar ainda que, os animais infectados que sobreviveram até o 20º dia de experimentação não apresentaram 100% de recuperação (Figura 14C).

Esses resultados mostram que camundongos C57BL/6 de 10 dias de vida (tipo selvagem) são susceptíveis à infecção pelo ZIKV, portanto podem ser considerados um bom modelo para estudos pautando a patogênese do ZIKV.

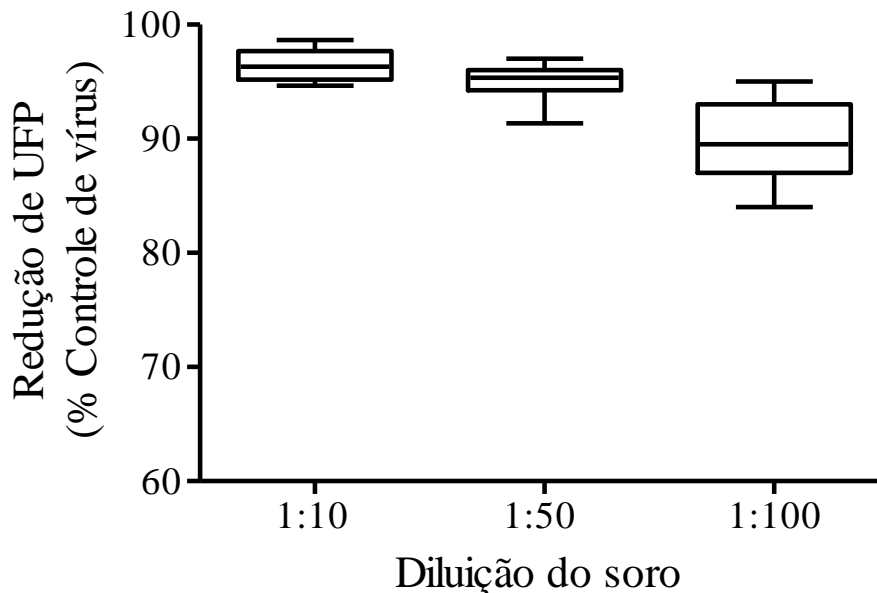
**Figura 15: Taxa de sobrevivência, porcentagem de ganho de massa corporal e sinais clínicos em camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.** (A) Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $10^7$  UFP do ZIKV via ip e monitorados por 20 dias para notação das taxas de sobrevivência. \*\* Representa diferenças significativas entre a sobrevivência dos animais controles e infectados (\*\* $P < 0.005$ , teste Mantel-cox) (B) O ganho de massa corporal dos animais controles e infectados foram registrados por 20 dias e os resultados estão expressos como a porcentagem de ganho de massa média em relação ao peso inicial dos animais. (C) Imagem representativa do estado clínico de animal controle (seta branca) e animal infectado com ZIKV (seta preta). Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  SD ( $n=9$  por grupo). # representa diferenças significativas entre o ganho de peso corporal dos animais controles e infectados ( $*P < 0.05$ , teste t-Student).



### 5.7 –Avaliação da produção de anticorpos neutralizantes no soro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV

Com a finalidade de avaliar a resposta imune humoral desenvolvida contra o ZIKV o soro dos animais infectados foi coletado no 8º dia p.i. e utilizado para mensurar a produção de anticorpos neutralizantes. Como mostrado na figura 15, a média das porcentagens de redução de placa foram 96,4% ( $\pm 1,4$ ), 95% ( $\pm 1,7$ ) e 90,4% ( $\pm 3,0$ ) nas diluições de 1:10, 1:50 e 1:100 do soro dos animais infectados, respectivamente. Além disso, foram encontrados títulos médios de 1000 UN/mL de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV, demonstrando que houve o desenvolvimento de resposta humoral contra o vírus, confirmando assim, a infecção desses animais.

**Figura 16: Porcentagem de redução de unidades formadoras de placa em amostras de soro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.** Diluições diferentes de amostras de soro obtidas de camundongos C57BL/6 no 8º dpi. foram incubadas com 150 UFP do ZIKV e utilizadas para infectar uma monocamada confluyente de células Vero. Após um período de 3 dias de incubação, as células foram fixadas com formol e coradas com cristal violeta. As porcentagens de redução de UFP foram determinadas após a contagem e comparação do número de placas com o controle de vírus.



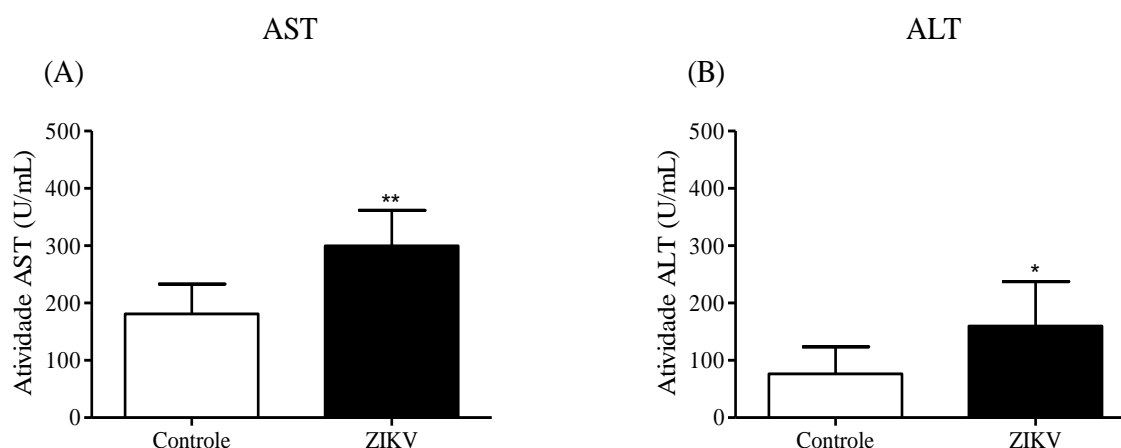
### 5.8- Avaliação da presença do vírus no fígado e cérebro dos animais infectados

Como demonstrado no item 5.6, os animais infectados ficaram doentes apresentando sinais clínicos compatíveis com a doença ocasionada pelo ZIKV em modelo murino. Entretanto, não foi possível detectar a presença de partículas virais viáveis, nem o genoma e antígeno viral por meio dos ensaios de titulação, PCR em tempo real e imunohistoquímica, respectivamente (dados não mostrados). Provavelmente, o tempo escolhido para eutanásia (8 dpi) foi tardio para que partículas infecciosas, genoma ou antígenos virais fossem detectados

### 5.9- Avaliação de dano hepático e neuronal provocado pela infecção pelo ZIKV

Uma vez que o fígado pode funcionar como importante sítio de multiplicação viral e que encontramos resultados significativos nas células de linhagem hepática (HepG2), nós decidimos investigar os efeitos da infecção pelo ZIKV no fígado dos camundongos C57BL/6. Foram avaliados os níveis séricos das transaminases hepáticas AST e ALT nos animais controles e infectados. Como mostrado na Figura 15, um aumento significativo na atividade de AST (Figura 15A) e ALT (Figura 15B) foi encontrado no soro dos animais infectados, sugerindo que a infecção pelo ZIKV pode estar relacionada com alguma injúria hepática. Porém, as análises histopatológicas não mostram nenhum dado significativo tanto no parênquima hepático quanto no cerebral (dados não mostrados).

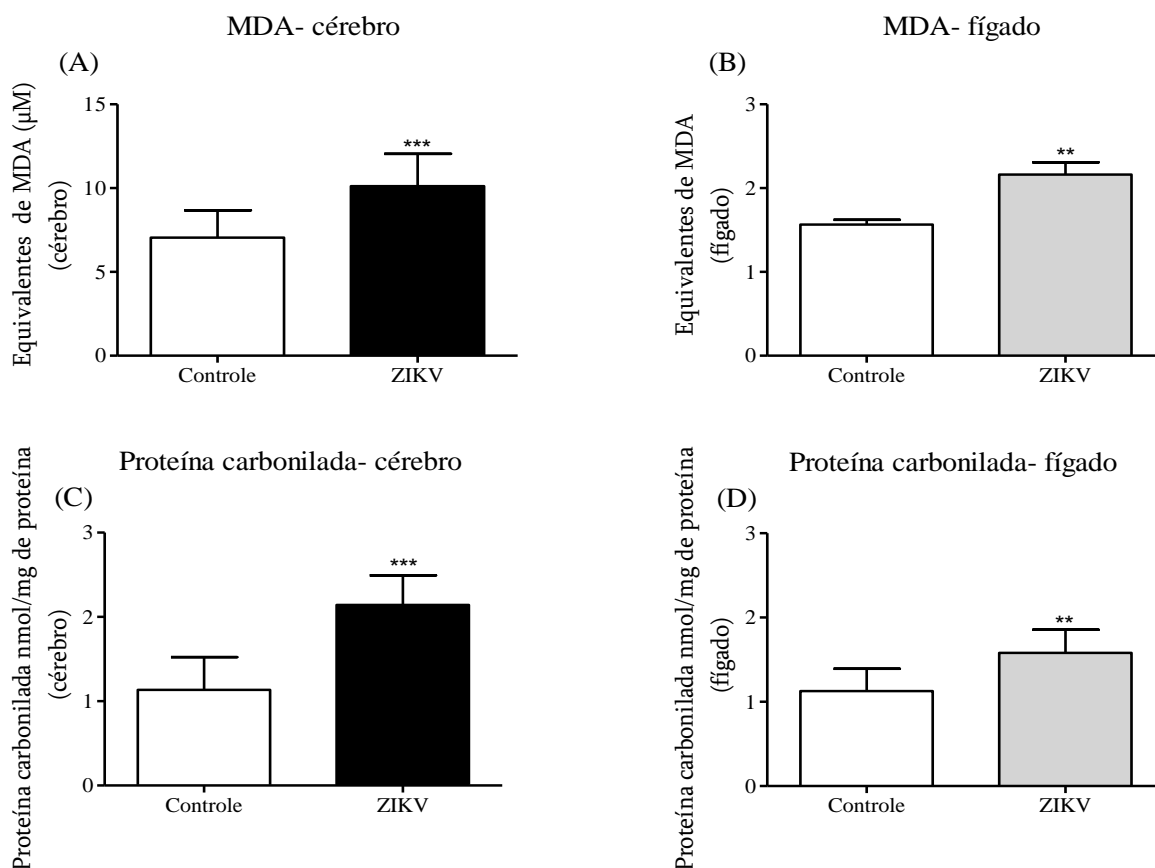
**Figura 17: Níveis séricos das transaminases hepáticas AST e ALT em camundongos C57BL/6.** Atividade de AST (A) e ALT (B). Soro dos animais controles e infectados foram utilizados para determinar os níveis de ambas transaminases. Os resultados incluem dados de dois experimentos independentes com nove replicatas cada e estão representados como média  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  e \*\* $P < 0.01$  representam diferenças significativas entre os animais controles e infectados (teste t- Student).



### 5.10- Avaliação dos biomarcadores de estresse oxidativo no fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV

Nossos resultados obtidos em culturas de células mostraram que a infecção pelo ZIKV aumenta os níveis dos biomarcadores de estresse oxidativo MDA e proteína carbonilada. Diante disso, o próximo passo foi verificar se esses marcadores poderiam também estar alterados no cérebro e fígado dos animais infectados. Assim como o observado *in vitro*, houve um aumento nos níveis de MDA e proteína carbonilada no cérebro (Figura 16 A e C) e no fígado (Figura 16 B e D) dos animais infectados quando comparados com os animais controles no 8º dpi. Esses dados reforçam que o estresse oxidativo é um evento conspícuo na infecção pelo ZIKV e pode contribuir para a patogênese do vírus.

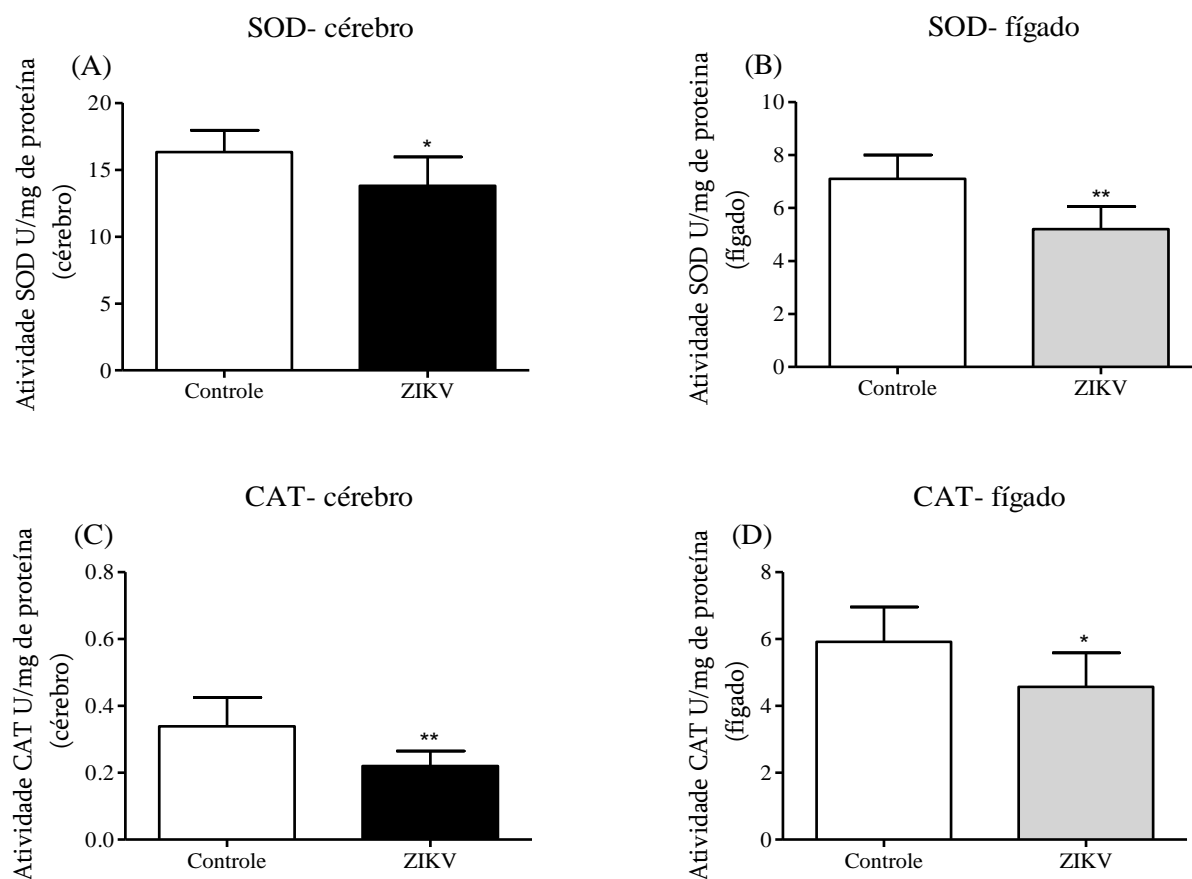
**Figura 18: Estresse oxidativo no fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $10^7$  UFP do ZIKV e eutanasiados 8 dpi. Homogenatos do fígado e do cérebro foram utilizados para as dosagens de MDA (A e B) e proteína carbonilada (C e D). Os resultados incluem dados de dois experimentos independentes e estão representados como média  $\pm$  SD (n=9/ por experimento). \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$  em comparação aos animais controles (teste t-student).



### 5.11- Avaliação da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV

A fim de verificar se a infecção *in vivo* pelo ZIKV poderia também causar diminuição no sistema de defesa antioxidante, homogenatos de fígado e cérebro de animais infectados e controles foram utilizados para mensurar a atividade das enzimas SOD e CAT. Corroborando com nossos achados *in vitro*, também ocorreu diminuição na atividade dessas enzimas no cérebro (Figura 17A e C) e no fígado (Figura 17B e D) dos animais infectados quando comparados com os animais controles. Esses dados sugerem que a deficiência no sistema antioxidante pode estar relacionada com o estabelecimento do estresse oxidativo durante a infecção pelo ZIKV.

**Figura 19: Diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT no fígado e cérebro de camundongos C57BL/6 infectados com ZIKV.** Camundongos C57BL/6 foram infectados com  $10^7$  UFP do ZIKV e eutanasiados 8 dpi. Homogenatos do fígado e do cérebro foram utilizados para as dosagens de SOD (A e B) e CAT (C e D). Os resultados incluem dados de dois experimentos independentes e estão representados como média  $\pm$  SD (n=9/ por experimento). \*\* $P < 0.01$  e \*\*\* $P < 0.001$  em comparação aos animais controles (teste t-student).



## 6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O ZIKV é um flavivírus emergente que infectou e causou doença em um grande número de pessoas, especialmente entre os anos de 2015 e 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). A epidemia de ZIKV em países do continente Americano revelou manifestações clínicas que não haviam sido observadas em surtos anteriores. Dentre essas manifestações, destacam-se danos neurológicos graves como: microcefalia, encefalite, meningoencefalite e síndrome de Guillain-Barré (FIGUEIREDO et al., 2019). Além disso, a infecção por muitos flavivírus, incluindo o ZIKV, também está relacionada com injúria hepática e em alguns casos, hepatite (SHERMAN et al., 2019). Apesar de toda sua importância, ainda sim, muitos aspectos sobre a patogênese do ZIKV permanecem desconhecidos.

Dessa forma, diante das evidências que o estresse oxidativo desempenha papel importante na patogênese de diversos agentes etiológicos virais, incluindo alguns flavivírus, (CAMINI et al., 2017a; PILLAI et al., 2019; ZHANG; RONG; LI, 2019) e que muitos mecanismos que operam na resposta do hospedeiro frente à infecção pelo ZIKV precisam ainda ser esclarecidos, no presente trabalho, parâmetros da homeostase redox foram avaliados durante a infecção pelo ZIKV, utilizando modelo *in vitro* e *in vivo*.

Para a realização dos experimentos *in vitro* foram utilizadas células humanas de linhagem neuronal (U87-MG) e hepática (HepG2), nas quais, primeiramente, foi caracterizada a curva de ciclo único viral. Tal ensaio foi realizado com a finalidade de verificar a eficiência na produção de partículas virais viáveis ao final do ciclo de multiplicação do ZIKV dentro das células hospedeiras. Partículas virais infectivas foram encontradas no sobrenadante das células infectadas, indicando que ambas as linhagens celulares são susceptíveis e permissivas à infecção pelo ZIKV (Figura 9). Todavia, títulos virais mais altos foram encontrados nas células U87-MG em comparação com as HepG2.

Um trabalho recente mostrou que células hepáticas possuem uma eficiente via antiviral, induzindo uma resposta robusta via interferon do tipo I (IFN-1) quando infectadas por vírus de genoma RNA, incluindo ZIKV (YAMANE et al., 2019). Esse mecanismo de resistência à infecção viral pode explicar a menor produção de partículas virais nas células HepG2, mostrada nesse trabalho. Além disso, células U87-MG possuem uma deleção nos genes *IFN $\alpha$ /IFN $\omega$*  e *IFN $\beta$*  que codificam IFN-1 (SGORBISSA et al., 2011). Uma vez que a via de IFN-1 é uma das respostas antivirais mais relevantes produzidas pelas células de mamíferos, a ausência dessa citocina nas células de glioblastoma pode favorecer a



multiplicação do ZIKV. Ainda, sabe-se que amostras brasileiras do ZIKV multiplicam e induzem efeito citopático em várias linhagens de células oriundas de tecido neuronal (ALPUCHE-LAZCANO et al., 2018; CUGOLA et al., 2016).

Uma vez comprovada a eficiência da multiplicação do ZIKV nas células U87-MG e HepG2, o primeiro parâmetro da homeostase redox avaliado foi a produção de ERO após a infecção. Nossos resultados mostraram que a infecção pelo ZIKV induziu um aumento na produção de ERO em ambas às linhagens de células, 15 e 24 hpi, comparando com as células controles (Figura 10).

Já é descrito na literatura que a maior produção de ERO é um evento comum decorrente da infecção por alguns flavivírus (FERNANDEZ-GARCIA et al., 2009). Sabe-se que as ERO são elementos importantes de defesa antimicrobiana das células (RESHI; SU; HONG, 2014). A primeira evidência que infecções virais poderiam estar associadas a um aumento na produção de ERO foi proposta por Peterhans em 1979 (PETERHANS, 1979). Desde então, trabalhos mostraram que diversos vírus de DNA e RNA podem induzir uma geração exacerbada dessas espécies causando assim, dano e consequente morte celular (LAI; CHANG; SHIH, 2019; RESHI; SU; HONG, 2014).

Wang e colaboradores mostraram que em células HepG2 infectadas com DENV-2 houve aumento na geração de ERO 24hpi (WANG et al., 2013). Outro estudo realizado por Liao e colaboradores demonstrou que o vírus da encefalite japonesa (JEV), ao infectar células da glia de ratos, estimulou a produção de  $O_2^{\cdot-}$  também 24hpi (LIAO; RAUNG; CHEN, 2002). Níveis elevados de ERO também foram observados em infecções causadas por vírus de diferentes famílias como vírus do Papiloma Humano, Influenza e Mayaro (CAMINI et al., 2017b; SULIMAN et al., 2001; WILLIAMS et al., 2014).

Para o HCV, um flavivírus do gênero *Hepacivirus*, a replicação do genoma viral no retículo endoplasmático induz a liberação de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) para o citoplasma, o que estimula a produção de ERO. Além disso, as mitocôndrias podem absorver esse  $Ca^{2+}$ , estimulando uma produção exacerbada de tais espécies nesse compartimento (MEDVEDEV; PLOEN; HILDT, 2016). Esse aumento na captação de  $Ca^{2+}$  pela mitocôndria induz uma alteração no potencial de membrana dessa organela, alterando o fluxo normal de elétrons, especialmente no complexo I (PICCOLI et al., 2007). Provavelmente, os elétrons que “escapam” da cadeia transportadora de elétrons favorecem a produção de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  (LINDSAY et al., 2015). Assim, o HCV e outros flavivírus podem estimular produção de ERO sem a necessidade de

contato direto das proteínas virais com componentes celulares que estão envolvidos em tal produção (MEDVEDEV; PLOEN; HILDT, 2016).

Recentemente, Ledur e colaboradores (2020) mostraram que a infecção pelo ZIKV em astrócitos humanos induz a produção de ERO, dano mitocondrial além de quebras nas fitas de DNA. Essas alterações possivelmente estão relacionadas com os distúrbios neurológicos observados em pacientes infectados por esse vírus (LEDUR et al., 2020).

A indução de ERO por agentes virais pode beneficiar a infecção, pois é sabido que baixos níveis de ERO podem favorecer a multiplicação viral nas células hospedeiras (PILLAI et al., 2019). Porém, o que muitas vezes acontece é que, com o progresso da infecção, mais ERO são formadas, ocasionando assim um desbalanço no *status* redox intracelular. Esse desbalanço redox culmina com a oxidação de diferentes alvos celulares pelo excesso de ERO, causando danos as proteínas, aos lipídeos, ao material genético e aos aminoácidos livres, o que resulta no estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015; PETERHANS, 1997). Aqui nós observamos que o aumento de ERO após a infecção pelo ZIKV nas células U87-MG e HepG2 culminou com o estresse oxidativo, visto que houve um aumento nos níveis de MDA e proteína carbonilada nas células infectadas (Figura 11). O MDA é um subproduto da peroxidação dos lipídios presentes nas membranas celulares, enquanto a proteína carbonilada é um marcador da oxidação não enzimática ou carbonilação irreversível em proteínas (FRIJHOFF et al., 2015).

Um estudo conduzido por Anticoli e colaboradores mostrou que a multiplicação do HCV em células hepáticas (Huh-7.5) estava relacionada com o estabelecimento da condição de estresse oxidativo (ANTICOLI et al., 2019). Ainda, já foi demonstrado que as proteínas estruturais e não estruturais do HCV estão envolvidas na indução do estresse oxidativo nas células infectadas (ZHANG; RONG; LI, 2019). Para outro flavivírus, o DENV, propõe-se que a gravidade da doença é determinada pelo estresse oxidativo e pela resposta imune inata, entretanto, mais estudos precisam ser realizados para compreender melhor tal relação (PILLAI et al., 2019). Ainda, existem evidências que flavivírus e alfavírus utilizam da condição de estresse oxidativo para regular, temporariamente, o capeamento e replicação do genoma viral (GULLBERG et al., 2015).

Para evitar que as ERO em excesso levem aos danos oxidativos, as células contam com um sistema antioxidante endógeno muitas vezes eficiente. E os vírus, por sua vez, podem manipular esse sistema. O efeito das infecções virais nas defesas antioxidantes depende do vírus, do tipo de célula infectada e do tempo da infecção, dentre outros fatores. Vários estudos

mostram diferentes tipos de alterações na atividade das enzimas SOD e CAT após infecções por diferentes vírus, no entanto, o que mais se observa são um excesso na produção de ERO e uma depleção das defesas antioxidantes, culminando com o estresse oxidativo (DERAMAUDT; DILL; BONAY, 2013).

Assim, desde que as enzimas SOD e CAT são as principais defesas contra as ERO produzidas, nós avaliamos a atividade dessas duas enzimas nas células U87-MG e HepG2 infectadas com ZIKV. Nossos resultados mostraram uma diminuição significativa na atividade de SOD e CAT 15 e 24hpi, em ambas as linhagens celulares, comprando às células controles (Figura 12).

Já foi demonstrado que células A549 infectadas com DENV e com o vírus West Nile (WNV) apresentaram redução na atividade de CAT (YOU et al., 2015). Por outro lado, o trabalho de Liao e colaboradores mostrou que houve aumento na atividade da SOD em culturas primárias de células de rato infectadas com JEV (LIAO; RAUNG; CHEN, 2002) e Basu e colaboradores demonstraram que o WNV promoveu aumento nos níveis de alguns antioxidantes, incluindo a SOD, em células BHK-21 (BASU; COURTNEY; BRINTON, 2017). Assim, a infecção por diferentes flavivírus, em diferentes modelos, pode acarretar um aumento ou diminuição das enzimas antioxidantes celulares.

Aqui, nós observamos que a infecção *in vitro* pelo ZIKV causou uma diminuição na atividade das enzimas SOD e CAT, sugerindo que, com a menor atuação do sistema de defesa antioxidante, as ERO formadas durante a infecção pelo ZIKV não foram eficientemente detoxificadas, permanecendo assim disponíveis para oxidar componentes celulares importantes, culminando com o estresse oxidativo.

O próximo passo foi tentar compreender melhor como o ZIKV estaria manipulando ou interagindo com o sistema de defesa antioxidante celular. Sabe-se que *status* redox da célula é muito importante no contexto das infecções virais, podendo ora beneficiar, ora prejudicar, a multiplicação dos vírus dentro das células hospedeiras (CAMINI et al., 2017a). Assim, esses microorganismos desenvolveram diversos mecanismos para manipular as vias oxidativas das células em seu favor. Dentre esses mecanismos, a manipulação da via de Nrf2 é uma das maneiras dos vírus se beneficiarem da manutenção de um ambiente redox "ótimo" dentro das células hospedeiras. Alguns agentes virais podem inibir a translocação de Nrf2 para o núcleo, outros podem estimular esse evento. Em células RAW264.7 infectadas com DENV ocorre ativação da via de Nrf2, que induz um aumento na produção de TNF- $\alpha$ , a qual está relacionada com a gravidade da doença causada por esse vírus (RAMEZANI; NAHAD;

FAGHIHLOO, 2018). Por outro lado, Yepes e colaboradores mostraram que durante a infecção pelo HCV, proteínas do core e a proteína NS3 recrutam sMafs para o citoplasma, onde se ligam ao Nrf2, impedindo assim sua translocação para o núcleo das células. Como resultado, os genes de resposta antioxidante, regulados por esse fator transcricional, não são expressos. Desse modo, os níveis de ERO permanecem elevados o que pode induzir autofagia nas células infectadas, facilitando assim, a disseminação viral para demais células do hospedeiro (CARVAJAL-YEPES et al., 2011).

No presente trabalho, observamos uma modulação negativa da via de Nrf2 nas células U87-MG e HepG2 infectadas (Figura 13) nos mesmos tempos em que foi observada diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT. Então, desde que Nrf2 é um dos principais reguladores do sistema antioxidante celular, pois interage com os elementos de resposta antioxidantes (ARE) e com genes citoprotetores no núcleo das células (DERAMAUDT; DILL; BONAY, 2013), podemos sugerir que essa modulação negativa de Nrf2 foi responsável pela menor atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT observada após a infecção pelo ZIKV, nesse modelo experimental.

Portanto, no modelo *in vitro*, observamos que a infecção de células de linhagem neuronal e hepática pelo ZIKV culmina com aumento na produção de ERO, aumentos dos biomarcadores de estresse oxidativo MDA e proteína carbonilada e diminuição das enzimas antioxidantes SOD e CAT via modulação negativa de Nrf2, levando ao desequilíbrio redox e consequente estresse oxidativo. Assim, para dar prosseguimento a esse estudo, o próximo passo foi checar se essas mesmas alterações encontradas após a infecção *in vitro* com o ZIKV também poderiam ocorrer após a infecção *in vivo*. Pra isso optamos pelo modelo murino, já que dados da literatura mostram que tais modelos têm contribuído para o esclarecimento de diversos aspectos relacionados à patogênese do ZIKV (LI et al., 2018; MORRISON; DIAMOND, 2017; PENA et al., 2018).

Sabe-se que camundongos adultos tipo selvagem são resistentes à infecção pelo ZIKV e não apresentam nenhuma das manifestações clínicas características da doença em humanos (PENA et al., 2018). No homem, o vírus evade a resposta antiviral por meio da degradação de um importante componente da via de IFN-1, a proteína STAT-2. O mesmo não acontece em camundongos adultos, e por isso, esses animais não são susceptíveis à infecção pelo ZIKV (GRANT et al., 2016; PIERSON; DIAMOND, 2018).

Por outro lado, camundongos neonatos ou jovens, por não apresentarem um sistema imune bem desenvolvido, sucumbem à infecção pelo ZIKV e apresentam manifestações

clínicas evidentes. Li e colaboradores mostraram que camundongos neonatos das linhagens ICR, Kunming e C57BL/6 são fatalmente susceptíveis à infecção pelo ZIKV. Em C57BL/6, a fatalidade é determinada pela dose viral bem como pela idade dos animais (LI et al., 2018). Assim, para a realização da etapa *in vivo* desse trabalho, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 com 10 dias de vida nos quais foram inoculados com  $10^7$  UFP do ZIKV via ip.

Todos os animais infectados desenvolveram sinais clínicos compatíveis com a doença e a taxa de mortalidade encontrada foi de 77% até o 11º dpi (Figura 14). Um trabalho recente mostrou que camundongos C57BL/6 com 7 dias de vida infectados via ip com  $10^4$  UFF (Unidades Formadoras de Foco) da amostra Dakar41519 do ZIKV também foram susceptíveis a infecção e a taxa de mortalidade foi de 33% (LAZEAR et al., 2016). O trabalho de Li e colaboradores também mostrou que animais C57BL/6 com 5 e 7 dias de vida infectados com o ZIKV apresentam taxa de mortalidade de 90,9% e 55,6%, respectivamente. Por outro lado, animais mais velhos com 14 e 21 dias de vida sobrevivem à infecção (LI et al., 2018). Todos esses resultados confirmam que a susceptibilidade à infecção pelo ZIKV em modelo murino tipo selvagem é idade e dose dependente.

Dados da literatura também mostraram que em animais C57BL/6 neonatos o ZIKV pode infectar o sistema nervoso central e multiplicar em diferentes órgãos, dentre eles o fígado (LI et al., 2018; MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016). No nosso estudo, as atividades de AST e ALT foram mensuradas para avaliar um possível dano hepático decorrente da infecção pelo ZIKV. Foram encontrados níveis elevados de ambas as enzimas no soro dos animais infectados (Figura 15) confirmando assim nossa hipótese de que o ZIKV poderia causar alguma injúria hepática.

No entanto, aqui, não foi possível detectar a presença do vírus, seu genoma ou antígenos virais no cérebro ou fígado dos animais infectados, pelas metodologias aplicadas. Infecções por flavivírus, normalmente, não apresentam caráter persistente (LAZEAR et al., 2016). Dowall e colaboradores mostraram que em camundongos 129Sv/Ev (tipo selvagem) o genoma do ZIKV não foi detectado em diversos órgãos, incluindo o fígado e o cérebro, no 7º dpi (DOWALL et al., 2016). De forma semelhante, em um estudo conduzido por Lazear e colaboradores, não foram encontradas partículas infecciosas, nem o RNA viral, no fígado e no cérebro de camundongos C57BL/6 tipo selvagem no 6º dpi pelo ZIKV (LAZEAR et al., 2016). Conjuntamente, esses resultados sugerem que, apesar de doença evidente, o vírus é eliminado pelo sistema imune dos animais rapidamente, corroborando nossos achados.

Ainda, não observamos nenhuma alteração histopatológica no fígado e no cérebro dos animais infectados. Corroborando com nossos achados, Dawall e colaboradores também não observaram nenhum dano tecidual decorrente da infecção pelo ZIKV no fígado e no cérebro de camundongos 129Sv/Ev no 3º e no 7º dpi (DOWALL et al., 2016). No entanto, apesar de não termos evidenciado nenhuma alteração histopatológica no parênquima hepático dos animais infectados, um aumento da atividade das transaminases ALT/AST foi observado no soro dos animais infectados. Nossa hipótese é que um dano hepático possa ter ocorrido anterior ao 8º dpi, elevando os níveis séricos de ALT/AST, que se mantiveram elevados até o 8º dpi. Para a realização do ensaio de imunohistoquímica utilizamos um anticorpo generalista para a proteína E dos flavivírus, desse modo, a não detecção de antígenos virais nos tecidos analisados pode ser explicada pela possível baixa sensibilidade do anticorpo 4G2 para ZIKV.

De forma geral, hipotetizamos que a infecção pelo ZIKV tenha causado algum dano tecidual tanto no fígado quanto no cérebro nas fases iniciais da infecção, porém como realizamos a eutanásia dos animais tardiamente, não foi possível a observação de qualquer injúria no parênquima de ambos órgãos. Assim, com a finalidade compreender e complementar os resultados negativos encontrados no presente trabalho, estudos adicionais estão sendo realizados por nosso grupo de pesquisa a fim de melhor entender a viremia e disseminação do ZIKV nesse modelo experimental.

O próximo passo, para confirmar nossos resultados encontrados *in vitro*, foi investigar se o ZIKV seria capaz de causar estresse oxidativo e depleção nas defesas antioxidantes no fígado e no cérebro dos animais infectados. Níveis aumentados dos biomarcadores de estresse oxidativo, MDA e proteína carbonilada (Figura 16), e diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, SOD e CAT (Figura 17), foram observados em ambos os órgãos dos animais infectados, quando comparados com os animais controles. Dessa forma, esses resultados estão de acordo com nossos achados *in vitro* e chamam atenção para o caráter conspícuo do estresse oxidativo com depleção das defesas antioxidantes na infecção pelo ZIKV, reforçando a hipótese de que o estresse oxidativo possa ser importante na patogênese viral.

Para outros membros representativos da família *Flaviviridae* a relevância do estresse oxidativo e das defesas antioxidantes na infecção já foi bem explicitada (ZHANG; RONG; LI, 2019). Corroborando com nossos resultados, Wang e colaboradores mostraram que camundongos da linhagem HepG2-SCID infectados com DENV-2 apresentaram redução na atividade de SOD e CAT no fígado e aumento nos níveis de MDA no fígado e no cérebro (WANG et al., 2013). Outro trabalho utilizando como modelo ratos Wistar com 12 dias de

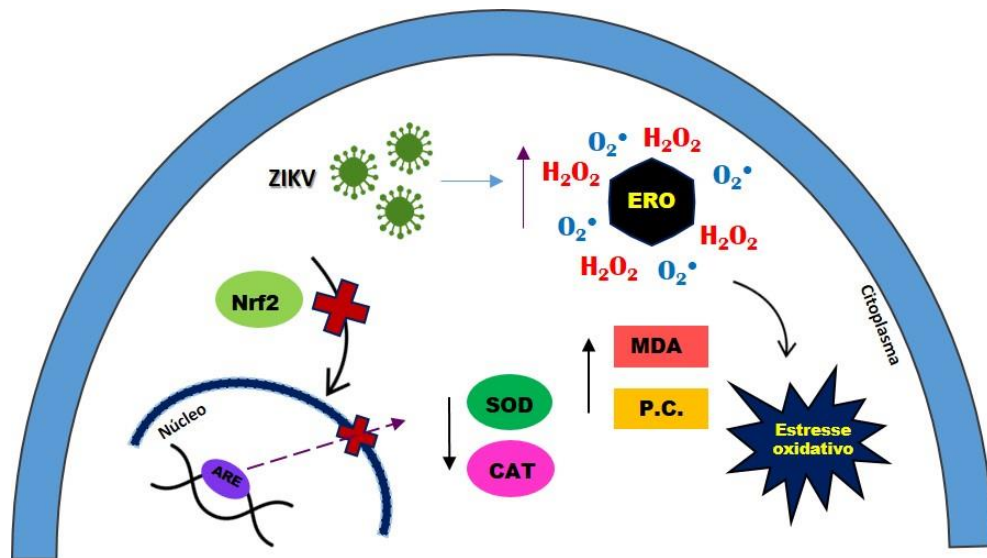
vida mostrou que a infecção com JEV causou estresse oxidativo e modulação no sistema antioxidante em diferentes partes do cérebro dos animais infectados e que esse desbalanço oxidativo estava relacionado com o tropismo viral e com dano tecidual (KUMAR et al., 2009). Já foi documentado que o estresse oxidativo e diminuição nas defesas antioxidantes estão relacionados com o desenvolvimento de hepatocarcinoma celular, cirrose, esteatose, dentre outras manifestações clínicas da forma grave da doença ocasionada pelo HCV (LOZANO-SEPULVEDA et al., 2015).

Por fim, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, propusemos uma representação esquemática simplificada mostrando algumas respostas do hospedeiro relacionadas à homeostase redox após a infecção *in vitro* e *in vivo* pelo ZIKV (Figura 18). Após a infecção, as células respondem com um aumento produção de ERO e, concomitante, ocorre uma modulação negativa da via Nrf2, culminando na menor expressão dos genes relacionados com as respostas antioxidantes celulares e resultando, portanto, na menor atividade das enzimas SOD e CAT. Assim, o excesso de ERO não devidamente detoxificado permanece disponível para oxidar os lipídios e proteínas celulares, resultando no estresse oxidativo.

Coletivamente, nossos resultados ampliaram o conhecimento de importantes aspectos relacionados à infecção pelo ZIKV e garantem estudos futuros que visam abordagens terapêuticas alternativas para o tratamento da febre Zika, especificamente àquelas baseadas em compostos antioxidantes capazes de reverter o dano oxidativo. No entanto, mais estudos são necessários para melhor compreender a relação entre a modulação das vias oxidativas celulares com a patogênese do vírus.

O artigo contendo os resultados aqui obtidos foi publicado no periódico *Virus Research* (qualis A3) (data da publicação 02/07/2020 – link de acesso: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198084>- ANEXO IV).

**Figura 20: Representação esquemática dos possíveis fatores que contribuíram para o estabelecimento do estresse oxidativo após a infecção pelo ZIKV.** A multiplicação do ZIKV nas células hospedeiras aumenta a produção de ERO e inibe a via de Nrf2, resultando na menor expressão dos genes relacionados com as respostas antioxidantes celulares. Assim, a diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT faz com que as ERO produzidas em excesso permaneçam disponíveis para oxidar componentes importantes das células como as proteínas e os lipídios, o que resulta no estresse oxidativo.





## 7- REFERÊNCIAS

ABEL, S. et al. Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 81, n. 5–6, p. 391–9, 11 jan. 2009.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Oxygen Radicals in Biological Systems**, v. 13, n. 1947, p. 121–126, 1984.

AGARWAL, A.; PARIDA, M.; DASH, P. K. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. **Reviews in Medical Virology**, v. 27, n. 5, p. 1–12, 2017.

AGUIRRE, J.; LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 9, p. 1342–53, 15 nov. 2010.

AKAIKE, T. et al. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2448–2453, 1996.

ALIOTA, M. T. et al. Heterologous Protection against Asian Zika Virus Challenge in Rhesus Macaques. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–22, 2016.

ALPUCHE-LAZCANO, S. P. et al. Higher cytopathic effects of a zika virus brazilian isolate from bahia compared to a Canadian-imported thai strain. **Viruses**, v. 10, n. 2, 2018.

ANTICOLI, S. et al. Erratum to “Counteraction of HCV-Induced Oxidative Stress Concurrs to Establish Chronic Infection in Liver Cell Cultures”. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 3712969, 2019.

ARBOVIRUS CATALOG. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>. Acesso em: 10/01/2020

BASU, M.; COURTNEY, S. C.; BRINTON, M. A. **Arsenite-induced stress granule formation is inhibited by elevated levels of reduced glutathione in West Nile virus-infected cells.** [s.l: s.n.]. v. 13, 2017.

BRAACK, L. et al. Mosquito-borne arboviruses of African origin: Review of key viruses and vectors. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, 2018.

BUEGE, J. . AND; AUST, S. . Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52, n. 1979, p. 302–310, 1978.

- CAI, J. et al. Biomarkers of oxidation stress, inflammation, necrosis and apoptosis are associated with hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, 2015.
- CAMINI, F. C. et al. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. **Archives of Virology**, v. 162, n. 4, p. 907–917, 2017a.
- CAMINI, F. C. et al. Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus Research**, v. 236, n. November 2016, p. 1–8, 2017b.
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, p. 1960, 2014.
- CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.
- CARVAJAL-YEPES, M. et al. Hepatitis C virus impairs the induction of cytoprotective Nrf2 target genes by delocalization of small maf proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 11, p. 8941–8951, 2011.
- CASOLA, A et al. Oxidant tone regulates RANTES gene expression in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. Role in viral-induced interferon regulatory factor activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19715–22, 2001.
- CHEN, S. et al. Innate immune evasion mediated by flaviviridae non-structural proteins. **Viruses**, v. 9, n. 10, p. 1–19, 2017.
- COSTANTINI, D. Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. **The Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 13, p. jeb194688, 2019.
- CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.
- CULLINAN, S. B. et al. The Keap1-BTB Protein Is an Adaptor That Bridges Nrf2 to a Cul3-Based E3 Ligase: Oxidative Stress Sensing by a Cul3-Keap1 Ligase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 19, p. 8477–8486, 2004.
- DA SILVA CAETANO, C. C. et al. Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress is Associated With Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.
- DERAMAUDT, T. B.; DILL, C.; BONAY, M. Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 43, n. 3, p. 100–107, 2013.

- DHANWANI, R. et al. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus Research**, v. 163, n. 2, p. 563–572, 2012.
- DICK, G. W. A. Zika virus II. Pathogenecity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 521–534, 1952.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. ZIKA VIRUS (I). ISOLATIONS AND SEROLOGICAL SPECIFICITY. v. 46, n. 5, 1952.
- DONALISIO, M. R.; FREITAS, A. R. R.; ZUBEN, A. P. B. VON. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, p. 10–15, 2017.
- DOWALL, S. D. et al. A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2016.
- DOWD, K. A. et al. Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. **Cell Reports**, v. 16, n. 6, p. 1485–1491, 2016.
- DRÖGE, W.; ECK, H.-P.; MIHM, S. **Oxidant-antioxidant status in human immunodeficiency virus infection**. [s.l.] Elsevier, 1994. v. 233
- DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.
- FANG, F. C. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. **mBio**, v. 2, n. 5, p. 1–6, 2011.
- FARIA, N. R. et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 406–410, 2017.
- FERNANDEZ-GARCIA, M. D. et al. Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell Host and Microbe**, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009.
- FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Zika virus infection: an update. **Microbes and Infection**, 2019.
- FIGUEIREDO, C. P. et al. Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. **Nature Communications**, 2019.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.
- FOY, B. D. et al. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011.

- FRIJHOFF, J. et al. Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, p. 1–118, 2015.
- GARCEZ, M; BORDIN, D; PERES, W.; SALVADOR, M. Radicais livres e espécies reativas. In SALVADOR, M. HENRIQUE, J.A.P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**.Ulbra, Canoas, p.13-33, 2004.
- GEISZT, M.; LETO, T. L. The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51715–51718, 2004.
- GIL, L. et al. Oxidative stress in adult dengue patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 652–657, 2004.
- GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, n. April, p. 1–13, 2017.
- GRANT, A. et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.
- GUBLER, D. J. The Global Emergence / Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 330–342, 2002.
- GULLBERG, R. C. et al. Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. **Virology**, v. 475, n. 0, p. 219–229, 2015.
- GUTIÉRREZ-BUGALLO, G. et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 561–569, 2019.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of Oxidative Stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058–1071, 2007.
- HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ.Health.Perspect.**, v. 102 Suppl, n. 2, p. 5–12, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. . Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 899, n. 1, p. 136–147, 2000.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology & Medicine**. [s.l: s.n.]. v. FIFTH EDIT, 2015.
- HAMEL, R. et al. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 7–8, p. 441–449, 2016.
- HOSAKOTE, Y. M. et al. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 41, n. 3, p.

348–57, 2009.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. Acesso 06/01/2020.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING Volume 8, Numbers**, v. 8, p. 1–16, 2006.

JORDAO, A. A. et al. Peroxidacao lipidica e etanol: Papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, n. 3, p. 434–449, 1998.

KAYAMA, Y. et al. Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25234–25263, 2015.

KHADEM ANSARI, M. H.; OMRANI, M.-D.; KHERADMAND, F. Oxidative Stress Response in Patients Infected by Diverse Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatitis Monthly**, v. 15, n. 2, p. 1–5, 2015.

KLASSEN, P. et al. Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. **Nutrition**, v. 20, n. 6, p. 542–547, 6 jun. 2004.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3–4, p. 463–471, fev. 1999.

KUDCHODKAR, S. B. et al. Rapid response to an emerging infectious disease - Lessons learned from development of a synthetic DNA vaccine targeting Zika virus. **Microbes and Infection**, 2018.

KUMAR, S. et al. Imbalance in oxidant/antioxidant system in different brain regions of rat after the infection of Japanese encephalitis virus. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 7, p. 648–654, 2009.

LAI, I.-H.; CHANG, C.-D.; SHIH, W.-L. Apoptosis Induction by Pseudorabies Virus via Oxidative Stress and Subsequent DNA Damage Signaling. **Intervirology**, p. 1–8, 2019.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LAZEAR, H. M. et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 720–730, 2016.

LEDUR, P. F. et al. Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. **Scientific Reports 2020 10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2020.

LEE, C. Therapeutic modulation of virus-induced oxidative stress via the Nrf2-dependent antioxidative pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.

- LEVINE, B. R. L.; WILLIAMS, J. O. Y. A.; STADTMAN, E. R. Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. v. 186, 1994.
- LI, S. et al. Zika virus fatally infects wild type neonatal mice and replicates in central nervous system. **Viruses**, v. 10, n. 1, 2018.
- LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 3, p. e18, 2015.
- LIAO, S. L.; RAUNG, S. L.; CHEN, C. J. Japanese encephalitis virus stimulates superoxide dismutase activity in rat glial cultures. **Neuroscience Letters**, v. 324, n. 2, p. 133–136, 2002.
- LINDSAY, D. P. et al. Differential effects of buffer pH on Ca<sup>2+</sup>-induced ROS emission with inhibited mitochondrial complexes I and III. **Frontiers in Physiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–10, 2015.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64, 2014.
- LORENZ, C. et al. Impact of environmental factors on neglected emerging arboviral diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 9, p. 1–19, 2017.
- LOZANO-SEPULVEDA, S. A. et al. Oxidative stress modulation in hepatitis C virus infected cells. **World Journal of Hepatology**, v. 7, n. 29, p. 2880–2889, 2015.
- MANANGEESWARAN, M.; IRELAND, D. D. C.; VERTHELYI, D. Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 11, p. 1–20, 2016.
- MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.
- MARTÍNEZ DE SALAZAR, P. et al. Zika fever. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, n. xx, p. 1–6, 2016.
- MASTERS, C.; PEGG, M.; CRANE, D. On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 113–120, 1986.
- MEDVEDEV, R.; PLOEN, D.; HILDT, E. HCV and Oxidative Stress: Implications for HCV Life Cycle and HCV-Associated Pathogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of biochemistry**, v. 52, p. 711–760,

1983.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The New England journal of medicine**, 10 fev. 2016.

MOI, P. et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the  $\beta$ -globin locus control region. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 9926–9930, 1994.

MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **Journal of Virology**, v. 91, n. 8, 2017.

MOURÃO, M. P. G. et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48 Suppl 1, n. August 2013, p. 20–26, 2015.

MUSSO, D. et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, 2015.

NAKATSUE, T. et al. Acute infection of Sindbis virus induces phosphorylation and intracellular translocation of small heat shock protein HSP27 and activation of p38 MAP kinase signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, n. 1, p. 59–64, 1998.

NEUFELDT, C. J. et al. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 125–142, 2018.

OESTREICHER, J.; MORGAN, B. Glutathione: Subcellular distribution and membrane transport. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 97, n. 3, p. 270–289, 2019.

OLAGNIER, D. et al. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 12, p. e1004566, 2014.

PAIXÃO, E. S. et al. History, epidemiology, and clinical manifestations of Zika: A systematic review. **American Journal of Public Health**, v. 106, n. 4, p. 606–612, 2016.

PAL, S. et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 25, n. 3, p. 627–634, 2009.

PAMPLONA, R.; COSTANTINI, D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 4, 2011.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. CUMULATIVE ZIKA CONFIRMED AND

SUSPECTED CASES REPORTED BY COUNTRIES AND TERRITORIES IN THE AMERICAS, 2015 and 2016. Disponível em: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=en](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=en). Acesso em: 15/01/2020

PARDY, R. D.; RICHER, M. J. Zika virus pathogenesis: From early case reports to epidemics. **Viruses**, v. 11, n. 10, p. 1–9, 2019.

PENA, L. J. et al. In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 12, p. 1529–1550, 2018.

PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1804, n. 2, p. 245–62, fev. 2010.

PETERHANS, E. Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 91, n. 1, p. 383–392, 1979.

PETERHANS, E. Symposium : Newly Emerging Viral Diseases : What Role for Nutrition ? Nutrition and Newly Emerging Viral Diseases : An Overview 1. **The Journal of nutrition**, v. 127, p. 962–965, 1997.

PICCOLI, C. et al. Hepatitis C virus protein expression causes calcium-mediated mitochondrial bioenergetic dysfunction and nitro-oxidative stress. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 58–65, 2007.

PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, v. 560, n. 7720, p. 573–581, 2018.

PILLAI, A. B. et al. Oxidative stress response in the pathogenesis of dengue virus virulence , disease prognosis and therapeutics : an update. **Archives of Virology**, n. 0123456789, 2019.

RAMEZANI, A.; NAHAD, M. P.; FAGHIHLOO, E. The role of Nrf2 transcription factor in viral infection. **Journal of cellular Biochemistry**, v. 22, n. March, p. 1–17, 2018.

RAMÍREZ, A. L. et al. Searching for the proverbial needle in a haystack: Advances in mosquito-borne arbovirus surveillance. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.

RASTOGI, M.; SHARMA, N.; SINGH, S. K. Flavivirus NS1: A multifaceted enigmatic viral protein. **Virology Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2016.

RATNAM, D. V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, n. 3, p. 189–207, 2006.

RESHI, M. L.; SU, Y. C.; HONG, J. R. RNA viruses: ROS-mediated cell death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2014, 2014.

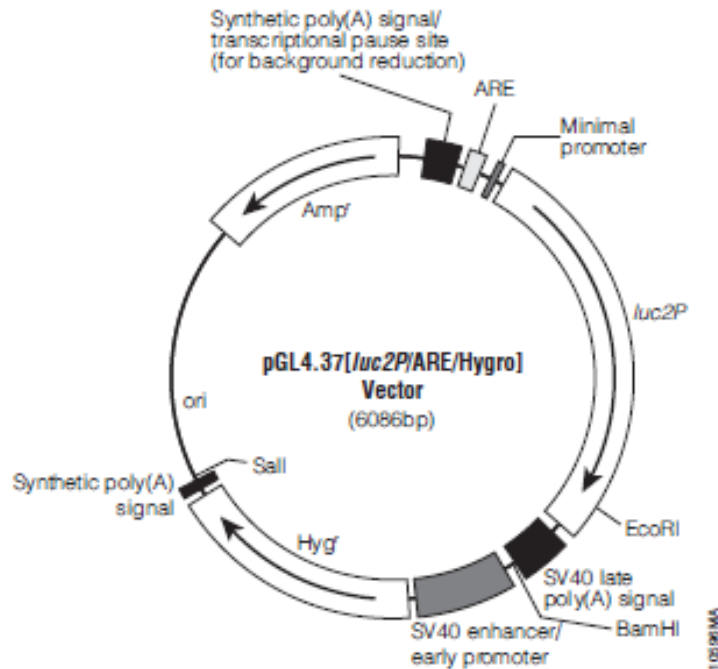


- REY, F. A.; STIASNY, K.; HEINZ, F. X. Flavivirus structural heterogeneity: implications for cell entry. **Current Opinion in Virology**, v. 24, p. 132–139, 2017.
- RODRÍGUEZ-MORALES, A. J. et al. Fatal Zika virus disease in adults: A critical reappraisal of an under-recognized clinical entity. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 83, p. 160–162, 2019.
- ROSSI, S. L. et al. Characterization of a Novel Murine Model to Study Zika Virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, p. ajtmh.16-0111-, 2016.
- SCHWARZ, K. B. Oxidative stress during viral infection: a review. v. 21, n. 5, p. 641–649, 1996.
- SEET, R. C. S. et al. Oxidative damage in dengue fever. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 375–380, ago. 2009.
- SGORBISSA, A. et al. Type i IFNs signaling and apoptosis resistance in glioblastoma cells. **Apoptosis**, v. 16, n. 12, p. 1229–1244, 2011.
- SHERMAN, K. E. et al. Zika virus replication and cytopathic effects in liver cells. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, p. 1–11, 2019.
- SHIRLEY, D. A. T.; NATARO, J. P. Zika Virus Infection. **Pediatric Clinics of North America**, v. 64, n. 4, p. 937–951, 2017.
- SIES, H. et al. Oxidative Stress: Damage to Intact Cells and Organs [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 311, n. 1152, p. 617–631, 1985.
- SIMMONDS, P. et al. ICTV ICTV Virus Taxonomy Profile : Flaviviridae. p. 2–3, 2018.
- SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science (New York, N.Y.)**, v. 352, n. 6284, p. 467–70, 2016.
- SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochemical Journal**, v. 222, n. 1, p. 1–15, 1984.
- SOLDAN, S. S.; GONZÁLEZ-SCARANO, F. Emerging infectious diseases: The *Bunyaviridae*. **Journal of Neurovirology**, v. 11, n. 5, p. 412–423, 2005.
- SOMNUKE, P. et al. N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cell-surface expression, hexamer stability, and interactions with human complement. **Virology**, v. 413, n. 2, p. 253–264, 2011.
- SULIMAN, H. B. et al. Prevention of influenza-induced lung injury in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 280, n. 1 24-1, p. 69–78, 2001.

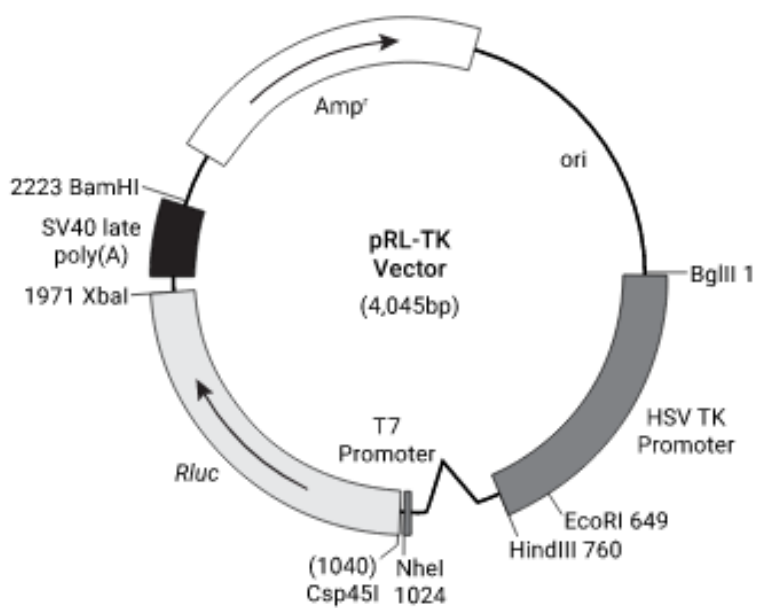
- SUTTON, H. C.; WINTERBOURN, C. C. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in fenton reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 6, n. 1, p. 53–60, 1989.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 10 mar. 2006.
- WANG, J. et al. Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55407, 2013.
- WILLIAMS, V. M. et al. Human Papillomavirus Type 16 E6\* Induces Oxidative Stress and DNA Damage. **Journal of Virology**, v. 88, n. 12, p. 6751–6761, 2014.
- WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. **The Lancet**, v. 388, n. 10045, p. 717–727, 2016.
- WOLFE, M. S.; CALISHER, C. H.; MCGUIRE, K. Spondweni Virus Infection in a Foreign Resident of Upper Volta. **The Lancet**, v. 320, n. 8311, p. 1306–1308, 1982.
- WONG, S. S. Y.; POON, R. W. S.; WONG, S. C. Y. Zika virus infection-the next wave after dengue? **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 115, n. 4, p. 226–242, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. ZIKA EPIDEMIOLOGY UPDATE July 2019. n. JULY, p. 1–14, 2019.
- YAMANE, D. et al. Basal expression of interferon regulatory factor 1 drives intrinsic hepatocyte resistance to multiple RNA viruses. **Nature Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1096–1104, 2019.
- YOU, J. et al. Flavivirus Infection Impairs Peroxisome Biogenesis and Early Antiviral Signaling. **Journal of Virology**, v. 89, n. 24, p. 12349–12361, 2015.
- YOUNG, P. R. Arboviruses: A family on the move. **Springer Nature Singapore Pte Ltd**, p. 1–8, 2018.
- ZHANG, Y. et al. Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 24, p. 30–36, 2014.
- ZHANG, Z.; RONG, L.; LI, Y. Review Article Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress : Implications for Viral Pathogenesis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1–17, 2019.

## 8- ANEXOS

### ANEXO I: Mapa genético do vetor pGL4.37 (Repórter da via de Nrf2/ARE)



### ANEXO II: Mapa genético do vetor pRL-TK



**ANEXO III: Protocolo Aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFOP****Comissão de Ética  
no Uso de Animais****CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do estresse oxidativo, defesas antioxidantes e atividade antiviral, antioxidante e hepatoprotetora da Silimarina em camundongos C57BL/6 infectados com Zika virus", protocolada sob o CEUA nº 7393091018 (ID 000118), sob a responsabilidade de **Cintia Lopes de Brito Magalhães e equipe; Ariane Coelho Ferraz; Letícia Trindade Almeida** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 23/11/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of oxidative stress, antioxidant defenses and antiviral, antioxidant and hepatoprotective activity of Silymarin in C57BL / 6 mice infected with Zika virus", utilizing 110 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 7393091018 (ID 000118), under the responsibility of **Cintia Lopes de Brito Magalhães and team; Ariane Coelho Ferraz; Letícia Trindade Almeida** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 11/23/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [12/2018](#) a [02/2022](#)

Área: [Ciências Biológicas](#)

Origem: [Centro de Ciência Animal](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 2 dias](#) N: [110](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [5 a 20g](#)

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no CCA/UFOP e no Laboratório de Biologia e Tecnologia de Micro-organismos do Departamento de Ciências Biológicas da UFOP.

Ouro Preto, 26 de novembro de 2018

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira  
Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Ouro Preto

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso e Animais

## ANEXO IV: Artigos publicados (2014 - 2020)

a) Artigo original publicado no ano de 2020 (autora)



### Zika virus induces oxidative stress and decreases antioxidant enzyme activities *in vitro* and *in vivo*

Leticia Trindade Almeida<sup>a</sup>, Ariane Coelho Ferraz<sup>a</sup>, Camila Carla da Silva Caetano<sup>a</sup>, Marflia Bueno da Silva Menegatto<sup>a</sup>, Ana Cláudia dos Santos Pereira Andrade<sup>a</sup>, Rafaela Lameira Souza Lima<sup>a</sup>, Fernanda Caetano Camini<sup>a</sup>, Samille Henriques Pereira<sup>b</sup>, Karla Yanca da Silva Pereira<sup>c</sup>, Breno de Mello Silva<sup>a,b,c</sup>, Luiza Oliveira Perucci<sup>a,b,d</sup>, André Talvani<sup>c,d</sup>, José Carlos de Magalhães<sup>e</sup>, Cintia Lopes de Brito Magalhães<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup> Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós Graduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>e</sup> Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João del-Rei, Ouro Branco, Minas Gerais, Brazil

b) Artigo original publicado no ano de 2019 (co-autora)

[www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)

**SCIENTIFIC  
REPORTS**  
nature research

## OPEN Mayaro Virus Induction of Oxidative Stress is Associated With Liver Pathology in a Non-Lethal Mouse Model

Camila Carla da Silva Caetano<sup>1</sup>, Fernanda Caetano Camini<sup>1</sup>, Leticia Trindade Almeida<sup>1</sup>, Ariane Coelho Ferraz<sup>1</sup>, Tales Fernando da Silva<sup>1</sup>, Rafaela Lameira Souza Lima<sup>2</sup>, Mayara Medeiros de Freitas Carvalho<sup>1</sup>, Thalles de Freitas Castro<sup>1</sup>, Cláudia Martins Carneiro<sup>1,3,4</sup>, Breno de Mello Silva<sup>1,2,4</sup>, Silvana de Queiroz Silva<sup>2,4</sup>, José Carlos de Magalhães<sup>5</sup> & Cintia Lopes de Brito Magalhães<sup>1,2\*</sup>

c) Artigo original publicado no ano de 2019 (co-autora)

www.nature.com/scientificreports

# SCIENTIFIC REPORTS

**OPEN** Effects of açai on oxidative stress, ER stress, and inflammation-related parameters in mice with high fat diet-fed induced NAFLD

Received: 7 September 2018  
Accepted: 2 November 2018  
Published online: 30 May 2019

Mayara Medeiros de Freitas Carvalho<sup>1</sup>, Nara Nunes Lage<sup>1</sup>, Alice Helena de Souza Paulino<sup>1</sup>, Renata Rebeca Pereira<sup>1,2</sup>, Leticia Trindade de Almeida<sup>1</sup>, Tales Fernando da Silva<sup>1</sup>, Cintia Lopes de Brito Magalhães<sup>1,2</sup>, Wanderson Geraldo de Lima<sup>1,2</sup>, Marcelo Eustáquio Silva<sup>1,3</sup>, Maria Lucia Pedrosa<sup>1,2</sup> & Joyce Ferreira da Costa Guerra<sup>4</sup>

d) *Short Communication* publicado no ano de 2018 (co-autora)

Antiviral Research 158 (2018) 8–12



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

## Antiviral Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/antiviral](http://www.elsevier.com/locate/antiviral)



Short Communication

Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress


Fernanda Caetano Camini<sup>a</sup>, Tales Fernando da Silva<sup>a</sup>, Camila Carla da Silva Caetano<sup>a</sup>, Leticia Trindade Almeida<sup>a</sup>, Ariane Coelho Ferraz<sup>a</sup>, Verônica Maria Alves Vitoreti<sup>b</sup>, Breno de Mello Silva<sup>a,b</sup>, Silvana de Queiroz Silva<sup>a,b</sup>, José Carlos de Magalhães<sup>c</sup>, Cintia Lopes de Brito Magalhães<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, NUPCB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil  
<sup>b</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil  
<sup>c</sup> Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João del-Rei, Ouro Branco, Minas Gerais, Brazil

e) Artigo original publicado no ano de 2017 (co-autora)

Virus Research 236 (2017) 1–8

---




ELSEVIER


Contents lists available at ScienceDirect

**Virus Research**

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/virusres](http://www.elsevier.com/locate/virusres)



---

 CrossMark

**Oxidative stress in *Mayaro virus* infection**

Fernanda Caetano Camini<sup>a</sup>, Camila Carla da Silva Caetano<sup>a</sup>, Letícia Trindade Almeida<sup>a</sup>,  
Joyce Ferreira da Costa Guerra<sup>b</sup>, Breno de Mello Silva<sup>a,c</sup>, Silvana de Queiroz Silva<sup>a,c</sup>,  
José Carlos de Magalhães<sup>d</sup>, Cintia Lopes de Brito Magalhães<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> *Médico de Pesquisas em Ciências Biológicas, NUPPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil*  
<sup>b</sup> *Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição, Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Brazil*  
<sup>c</sup> *Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil*  
<sup>d</sup> *Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal de São João del-Rei, Ouro Branco, Minas Gerais, Brazil*

---

**ARTICLE INFO**

**Keywords:**  
 Mayaro virus  
 ROS  
 Oxidative stress  
 Antioxidant defences

**ABSTRACT**

*Mayaro virus* (MAYV) is a neglected tropical arbovirus that causes a febrile syndrome that is sometimes accompanied by incapacitating arthritis/arthralgia. The pathogenesis of MAYV has not been completely defined and oxidative stress mediated by an increase in reactive oxygen species (ROS) and/or depletion of antioxidant defences has been found to contribute to several aspects of viral disease. To investigate whether MAYV induced oxidative stress in host cells, we monitored ROS production, oxidative stress markers and antioxidant defences at different time points after infection. Our results show that MAYV induced significant oxidative stress in infected HepG2 cells, as indicated by the increase of malondialdehyde (MDA) and protein carbonyl levels, and by a significant decrease of the reduced versus oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio. Generally, MAYV-infected HepG2 cells also showed an increase in antioxidant defences. We observed an increase in the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and the total glutathione content. To determine whether similar effects occurred in other cell types, we evaluated the ROS, MDA and SOD activity levels in J774 cells after MAYV infection. Similar to our observations in HepG2 cells, the J774 cells showed an increase in ROS, MDA and total SOD activity following MAYV infection. Thus, since the cellular redox environment is influenced by the production and removal of ROS, we hypothesize that the overproduction of ROS was responsible for the oxidative stress in response to the MAYV infection despite the increase in the antioxidant status. This study is the first report on the involvement of oxidative stress during MAYV infection. Collectively, our data shed light on some mechanisms that are operational in host cells following exposure to MAYV.

f) Artigo de revisão publicado no ano de 2016 (co-autora)

Arch Virol  
 DOI 10.1007/s00705-016-3187-y

 CrossMark

---

REVIEW

---

**Implications of oxidative stress on viral pathogenesis**

Fernanda Caetano Camini<sup>1</sup> · Camila Carla da Silva Caetano<sup>1</sup> · Letícia Trindade Almeida<sup>1</sup> ·  
 Cintia Lopes de Brito Magalhães<sup>1,2</sup>

---

Received: 23 June 2016 / Accepted: 8 December 2016  
 © Springer-Verlag Wien 2016

g) Artigo original publicado no ano de 2014 (co-autora)

Arch Virol (2014) 159:2621–2632  
DOI 10.1007/s00705-014-2123-2

ORIGINAL ARTICLE

## **Caraparu virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection**

Fernanda Caetano Camini · Leticia Trindade Almeida · Carolina Silva Bernardes ·  
Maísa Silva · Maria Lúcia Pedrosa · Daniela Caldeira Costa · Wanderson Geraldo de Lima ·  
Carla do Amaral Pinto · Paulo César Peregrino Ferreira · José Carlos de Magalhães ·  
Cintia Lopes de Brito Magalhães

Received: 18 September 2013 / Accepted: 14 May 2014 / Published online: 27 May 2014  
© Springer-Verlag Wien 2014