

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
PPGBIOTEC

Dissertação

**Avaliação da atividade
antioxidante do fullerol em
infecções por *Zika virus***

Samille Henriques Pereira

Ouro Preto
2020



UFOP



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



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FULEROL EM INFECÇÕES POR *Zika virus*

SAMILLE HENRIQUES PEREIRA

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 BIOTECNOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRORGANISMOS



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO FULEROL EM INFECÇÕES POR *Zika virus*

SAMILLE HENRIQUES PEREIRA

ORIENTADOR: PROF. BRENO DE MELLO SILA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia Aplicada a Saúde Humana e Animal.

OURO PRETO

2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

P436a Pereira, Samille Henriques.

Avaliação da atividade antioxidante do fullerol em infecções por Zika virus.
[manuscrito] / Samille Henriques Pereira. - 2020.
76 f.: il.: color., gráf., tab., mapa.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto.
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Biotecnologia.
Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal.

1. Vírus da Zika. 2. Agentes antivirais. 3. Nanocompósitos (Materiais) -
Nanocomposto de carbono. I. Silva, Breno de Mello. II. Universidade Federal de
Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.112/.115



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

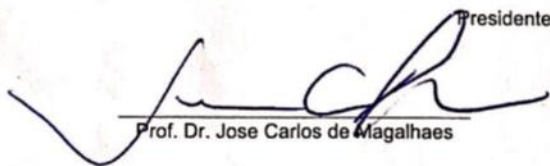


ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

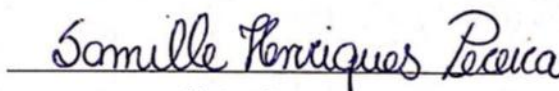
Aos 19 dias do mês de fevereiro do ano de 2020, às 13:30 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Samille Henriques Pereira, sendo a banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Breno de Mello Silva (Presidente - UFOP), pelo Prof. Dr. Jose Carlos de Magalhaes (Membro - Externo), pela Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, o presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda 40 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Avaliação da Atividade Antioxidante do Fulerol em Infecções Por Zika Virus", na área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde Humana e Animal. Terminada a exposição, o presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro Prof. Dr. Jose Carlos de Magalhaes; segundo Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes; terceiro Prof. Dr. Breno de Mello Silva. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, o presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 19 de fevereiro de 2020.


Prof. Dr. Breno de Mello Silva

Presidente


Prof. Dr. Jose Carlos de Magalhaes


Profa. Dra. Sílvia de Paula Gomes


Mestranda

"Persistence is the shortest path to success!"

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui, por ter iluminado meu caminho e ter me guiado em todos os momentos.

Aos meus pais, Ilson e Vânia, e ao meu irmão Leandro pelo auxílio, força e orações.

A Bárbara e a Maíra por terem feito do apê Rodopiô meu lar, pelos momentos de desabafos, boas risadas e pela ótima companhia.

Agradeço em especial meu orientador Breno, por ter me dado essa oportunidade, confiar no meu trabalho e por ter me permitido aprender tanto.

A Ariane e a Letícia por tudo que me ensinaram, sempre ajudando a cuidar das células, ensinando protocolos, dicas e a rir e chorar nos experimentos que davam errado, e claro, a comemorar comigo quando os experimentos brilhavam (risos). Além disso, se tornaram amigas fora do laboratório, assim também como a Bruna, e com certeza tornaram esses dois anos muito mais leves. Sempre vou me lembrar dos cafés, almoços, jantares, gordices e claro, trotes, esses sempre presentes no dia-a-dia. A Érica, que mesmo de longe sempre mandava energias positivas, o grupo das “Perfect Friends” bombava (risos). Aprendi muito com vocês, vou morrer de saudades!

As companhias diárias de almoço, Marília, Isabela, Raquel e Gabriel, por tantos momentos de descontrações e aprendizado.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia e Tecnologia de Microrganismos e as professoras Cíntia e Silvana pela troca de experiências e pela convivência.

Aos laboratórios do ICEB e NUPEB pela ajuda em diversos momentos.

A todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos órgãos de fomento por terem permitido que esse trabalho fosse desenvolvido, Capes, Cnpq e Fapemig.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e ao Josino por toda assistência.

A Universidade Federal de Ouro Preto e a todos os funcionários, meu muito obrigada!

RESUMO

O *Zika virus* é um arbovírus de grande importância na saúde pública. O aumento de casos de febre Zika nos últimos anos levou a uma preocupação mundial, devido à facilidade de disseminação, dificuldade no combate dos vetores e associação a doenças graves. A febre Zika é caracterizada por sintomas semelhantes à de outras arboviroses como febre, cefaleia, dores no corpo, erupção cutânea, conjuntivite, dores musculares e nas articulações. A preocupação em torno dessa doença é sua associação com doenças importantes, como síndromes congênitas e a síndrome de Guillain-Barré. Até o momento não existem vacinas e medicamentos antivirais contra o Zika e o desenvolvimento de terapias alternativas torna-se necessária. Já foi descrito que durante infecções virais ocorre o aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO), esse aumento leva a um desequilíbrio na homeostase redox, fazendo com que a célula entre em estresse oxidativo, que causa danos biológicos e está envolvido na patogênese viral. Além disso, estudos sugerem que alguns vírus se multiplicam melhor em estado de estresse oxidativo. Assim, controlar as ERO pode ser uma estratégia para combater a infecção. O fulerol, um nanomaterial à base de carbono, possui atividade antioxidante devido a sua alta capacidade de sequestrar ERO. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do fulerol em infecções celulares causadas pelo vírus da Zika. Para isso, foi avaliada a citotoxicidade do fulerol em células Vero e U-87MG. A capacidade antioxidante do fulerol foi testada pelo índice ORAC, utilizando-se uma curva padrão de trolox e o potencial antioxidante foi medido por ensaio de ERO após infecção pelo vírus. Foi investigada a modulação da principal via de antioxidante (NRF-2/ARE) pelo vírus da Zika e o efeito do tratamento com fulerol, além da avaliação de seu potencial efeito antiviral. Os resultados demonstraram que para todas as concentrações de fulerol testadas não foi observado efeito citotóxico apresentado citotoxicidade e uma capacidade antioxidante em baixas concentrações 50, 20, 10 e 5 nM, como já esperado, visto que em maiores concentrações ocorre formação de cristais, que prejudica sua ação. A redução da produção de ERO foi observada nas concentrações de 50 a 6,25 nM. O fulerol foi capaz de normalizar a modulação negativa de NRF-2/ARE nas concentrações de 12,5 e 6,25 nM após infecção pelo vírus e, além disso, resultados mostraram uma redução de até 90% na multiplicação do vírus em células tratadas. Dessa forma, o conjunto dos resultados sugere que o fulerol possui um grande potencial em auxiliar o tratamento contra o *Zika virus*, ou na redução dos efeitos causados pela infecção.

ABSTRACT

The *Zika virus* is an arbovirus of great importance in public health. The increase in cases of Zika fever in recent years has led to worldwide concern, due to the ease of dissemination, difficulty in combating vectors and association with serious diseases. Zika fever is characterized by symptoms similar to those of other arboviruses such as fever, headache, body pain, rash, conjunctivitis, muscle and joint pain. The concern around this disease is its association with important diseases, such as congenital syndromes and Guillain-Barré syndrome. So far there are no vaccines and antiviral drugs against Zika and the development of alternative therapies is necessary. It has already been described that during viral infections there is an increase in reactive oxygen species (ROS), this increase leads to an imbalance in redox homeostasis, causing the cell to enter oxidative stress, which causes biological damage and is involved in viral pathogenesis. In addition, studies suggest that some viruses multiply better in a state of oxidative stress. Thus, controlling ROS can be a strategy to fight infection. Fullerol, a carbon-based nanomaterial, has antioxidant activity due to its high ability to sequester ROS. In this context, this work aimed to evaluate the antioxidant activity of fullerol in cellular infections caused by the Zika virus. For this, the cytotoxicity of fullerol in Vero and U-87MG cells was evaluated. The antioxidant capacity of fullerol was tested by the ORAC index, using a standard trolox curve and the antioxidant potential was measured by ROS assay after infection by the virus. The modulation of the main antioxidant pathway (NRF-2 / ARE) by the Zika virus and the effect of treatment with fullerol were investigated, in addition to the evaluation of its potential antiviral effect. The results showed that for all concentrations of fullerol tested no cytotoxic effect was observed, with cytotoxicity and an antioxidant capacity in low concentrations 50, 20, 10 and 5 nM, as expected, since in higher concentrations there is formation of crystals, which impairs your action. The reduction in ROS production was observed in concentrations of 50 to 6.25 nM. Fullerol was able to normalize negative NRF-2 / ARE modulation at concentrations of 12.5 and 6.25 nM after infection by the virus and, in addition, results showed a reduction of up to 90% in virus multiplication in treated cells. Thus, the set of results suggests that fullerol has a great potential in helping treatment against the *Zika virus*, or in reducing the effects caused by the infection.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

- AAPH - dicloreto de 2,2-azobis (2-amidinopropano)
- ARE – Elemento de Resposta Antioxidante
- ATPase – Adenosinatrifosfatases
- cAMP – Monofosfato cíclico de adenosina
- CAT - Catalase
- CBN- Nanomateriais baseados em carbono
- CC – Controle de células
- CCL5 – Ligante 5 da quimiocina (motivo C-C)
- CNC – Cap ‘n’ Cooler
- Cu - Cobre
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- DENV – Vírus da dengue (*Dengue virus*)
- ERO – Espécie reativa de oxigênio
- ESPII – Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional
- EUA – Estados Unidos da América
- Fe – Ferro
- G6PD – Glicose-6-fosfatodesidrogenase
- GPx – Glutaciona peroxidase
- GSH – Glutaciona reduzida
- GSSG – Glutaciona oxidada
- GST – Glutaciona S transferase
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
- HCV – Vírus da hepatite C (*Hepatitis C virus*)
- HO-1 – Heme oxigenase
- HOH· – Íon peroxil
- HOCl – Ácido Hipocloroso
- INF – Interferon
- IRF – Fator regulatório do interferon
- IgM – Imunoglobulina M
- JEV – Vírus da encefalite Japonesa (*Japanese encephalitis virus*)
- Keap1 - *Kelch-like* ECH associado a proteína 1
- MOI – Multiplicidade de infecção
- MTT – Metil tiazol tetrazolium

Neh – Homologia de NRF-2
NFκB – Fator nuclear kappa B
NO – Óxido nítrico
NOX – Número de oxidação
NQO1 – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina quinona oxigenase 1
NRF-2 – Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2
O₂ – Oxigênio molecular
OH· – Íon hidroxila
OH⁻²· – Ânion superóxido
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORAC – Capacidade de absorção de radicais oxigenados
ORF – *open reading frame* (janela aberta de leitura)
qRT-PCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa com transcriptase reversa
RNA – Ácido ribonucleico
RSV – Vírus sincicial respiratório (*Respiratory syncytial virus*)
RVFV – Vírus da febre Rift Valley (*Rift Valley fever virus*)
SFB – Soro fetal bovino
sfRNA – Ácido ribonucleico subgenômico não codificador
SOD – Superóxido dismutase
TBEV – Vírus da encefalite do carrapato (*Tick-borne encephalitis virus*)
Trolox - ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UbcM2 – enzima conjugadora de ubiquitina
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UDPGT – Uridinadifosfato glucuronosiltransferase
UV – ultravioleta
WNV – Vírus do oeste do Nilo (*West Nile virus*)
YFV – Vírus da febre amarela (*Yellow fever virus*)
ZIKV – Vírus Zika (*Zika virus*)
Zn - Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da rota dos arbovírus	15
Figura 2: Esquema ilustrativo da organização do genoma dos flavívirus e a topologia de membrana de proteínas virais maduras.....	19
Figura 3: Visão geral da estrutura do vírion de flavívirus.....	21
Figura 4: Imagem de uma partícula de ZIKV por microscopia eletrônica de transmissão .	21
Figura 5: Ciclo de multiplicação dos flavívirus	23
Figura 6: Esquema do ciclo de manutenção geral dos arbovírus.....	25
Figura 7: Degradação de NRF-2 sob condições basais.....	30
Figura 8: Translocação nuclear de NRF-2 e interação com ARE em condições de estresse oxidativo.....	31
Figura 9: Aumento de ERO e ativação do sistema antioxidante celular	32
Figura 10: Interferência do HCV na via NRF-2	35
Figura 11: Esquematização da molécula de C ₆₀	36
Figura 12: Esquema ilustrativo da reação do fulereno com o radical hidroxila ou ânion superóxido.	37
Figura 13: Esquematização hipotética da molécula de fulerol (C ₆₀ (OH) ₂₂₋₂₄).....	37
Figura 14: Viabilidade celular por MTT após tratamento com o fulerol por 48 horas.....	53
Figura 15: Efeito da produção de ERO em células U-87 MG infectadas com ZIKV após tratamento com fulerol	56
Figura 16: Atividade de NRF-2 em células U-87MG após tratamento com fulerol.....	58
Figura 17: Atividade de NRF-2 em células U-87MG após pré-tratamento com fulerol seguido de infecção pelo ZIVK.	59
Figura 18: Efeito da multiplicação viral em células U-87MG infectadas com ZIKV após tratamento com fulerol	61
Figura 19: Efeito da redução de genoma viral em células U-87MG infectadas com ZIKV após tratamento com fulerol.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de mosquitos associados à transmissão do ZIKV de acordo com o local da epidemia/circulação.....	24
Tabela 2: Antioxidantes não enzimáticos de fontes endógenas e exógenas e seus mecanismos de ação.....	28
Tabela 3: Sequência do gBlock de ZIKV utilizado como modelo para curva padrão de qRT-PCR para quantificação viral.....	52
Tabela 4: Preparação da curva padrão a partir da diluição do gBlock de ZIKV.....	52
Tabela 5: Sequência dos iniciadores e sonda para o qRT-PCR de ZIKV.....	53
Tabela 6: Mistura de reação para preparação do qRT-PCR com volume final de 20 µL..	53
Tabela 7: Condições da reação de qRT-PCR.....	53
Tabela 8: Quantificação da capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC) do fulerol em equivalentes de Trolox.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 FEBRE ZIKA.....	14
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	14
2.1.2 PATOGENIA.....	16
2.1.3 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PROFILAXIA.....	17
2.2 ZIKA VIRUS.....	18
2.2.1 FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE, GÊNERO FLAVIVIRUS.....	18
2.2.2 GENOMA E ESTRUTURA.....	19
2.2.3 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO.....	22
2.2.4 TRANSMISSÃO E CICLO DE MANUTENÇÃO.....	23
2.3 PROCESSO OXIDATIVO.....	25
2.3.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
2.3.2 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	27
2.3.3 ESTRESSE OXIDATIVO E INFECÇÕES VIRAIS.....	32
2.4 FULEROL.....	36
3. JUSTIFICATIVA.....	39
4. OBJETIVOS.....	40
4.1 OBJETIVO GERAL.....	40
5. METODOLOGIA.....	41
5.1 FULEROL.....	41
5.2 CÉLULAS, VÍRUS E PLASMÍDEOS.....	42
5.2.1 CÉLULAS VERO, U-87MG E C6/36.....	42
5.2.2 ORIGEM E MULTIPLICAÇÃO DO ZIKV.....	43
5.2.3 TITULAÇÃO VIRAL.....	43
5.2.4 PLASMÍDEOS.....	44
5.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	44
5.4 ENSAIO DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE RADICAIS OXIGENADOS.....	45
5.5 ENSAIO DE DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	46
5.6 ENSAIO DE ATIVIDADE DO ELEMENTO DE RESPOSTA ANTIOXIDANTE.....	46
5.6.1 PREPARO DE BACTÉRIAS COMPETENTES.....	46

5.6.2	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO	47
5.6.3	PURIFICAÇÃO PLASMIDIAL	47
5.6.4	TRANSFEÇÃO CELULAR.....	48
5.6.5	ADIÇÃO DO VÍRUS E TRATAMENTO	48
5.6.6	ENSAIO DE DUAL-LUCIFERASE	48
5.7	ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	49
5.7.1	ENSAIO DE REDUÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS INFECCIOSAS	49
5.7.2	ENSAIO DE REDUÇÃO DE GENOMA VIRAL.....	49
5.7.2.1	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	50
5.7.2.2	qRT-PCR	50
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6.1	MULTIPLICAÇÃO E TITULAÇÃO DO ZIKV.....	53
6.2	ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO DO FULEROL EM CÉLULAS VERO E U-87MG.....	53
6.3	ANÁLISE DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE RADICAIS OXIGENADOS DO FULEROL.....	54
6.4	EFEITO DA PRODUÇÃO DE ERO APÓS TRATAMENTO COM FULEROL.....	56
6.5	ANÁLISE DA ATIVIDADE DE NRF-2/ARE APÓS TRATAMENTO COM FULEROL.....	57
6.6	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL APÓS TRATAMENTO COM FULEROL	60
7.	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	64
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. É um vírus de grande importância na saúde pública, devido à facilidade de disseminação, a dificuldade no combate de vetores e a associação com doenças graves. O ZIKV tem sido associado a episódios de microcefalia, condição de subdesenvolvimento do cérebro, em filhos de mulheres grávidas infectadas e ao aumento de casos de Síndrome de Guillain-Barré, uma doença autoimune que afeta o sistema nervoso (FERRARIS et al., 2019; LO, PARK, 2018).

A transmissão ocorre principalmente pela picada da fêmea infectada de mosquitos do gênero *Aedes*, podendo ocorrer transmissão perinatal, por aleitamento e/ou sexual (FERRARIS et al., 2019; HASAN et al., 2019).

O ZIKV foi isolado em 1947 na Floresta de Zika em Uganda. Os primeiros casos relatados em humanos de Febre Zika ocorreram na África e Ásia. Em 2007 foi escrito o primeiro surto fora destes continentes, nas Ilhas de Yap. Em 2013 ocorreu uma epidemia na Polinésia Francesa e, em 2015, no continente sul-americano quando foi decretado pela OMS “Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional” (FERRARIS et al., 2019).

A Febre Zika é caracterizada pelo aparecimento de febre, erupção cutânea, dor de cabeça, dor nas articulações, conjuntivite e dor muscular, porém 80% dos casos são assintomáticos. Até o momento não existem antivirais ou vacinas disponíveis contra o ZIKV, o tratamento consiste em reidratação, descanso e medicamentos não esteroidais para controle dos sintomas, como febre e dor (CDC, 2019; HASAN et al., 2019).

Uma grande parte dos flavivírus são caracterizados por causar infecções agudas e por ser eliminados pelo sistema imune do hospedeiro, porém a presença de ZIKV em fluidos corporais (sêmen, saliva e urina) por meses, assim como a infecção persistente nos tecidos testiculares, segure a necessidade de intervenções farmacológicas para eliminação do patógeno (ATKINSON et al., 2016; PITTS et al., 2017).

Estudos demonstraram que durante as infecções virais, as células do hospedeiro podem entrar em processo oxidativo, causado pelo aumento de espécies reativas e pela depleção do sistema antioxidante, podendo contribuir para vários aspectos da patogênese viral, como resposta inflamatória e morte celular, além de facilitar a multiplicação viral. Nesse contexto, a manutenção de um ambiente favorável é fundamental para o hospedeiro combater a infecção. Pesquisas vêm sendo dirigidas no sentido de avaliar

compostos com efeitos antioxidantes no combate das infecções virais (LEE, 2018; RESHI et al., 2014). Nesse sentido, nanomateriais baseados em carbono (CBN) são de grande interesse para diferentes campos da medicina e biotecnologia devido a sua atividade biológica. Sabe-se que baixas doses podem ativar as funções fisiológicas devido a processos metabólicos complexos. Alguns CBNs possuem atividade antioxidante devido a sua alta capacidade de sequestrar espécies reativas (FOLEY et. al, 2002; IAVICOLI et al, 2018; KOVEL et. al, 2019).

O fulerol, um fulereno de 60 átomos de carbono (C_{60}) com a adição química de 22-24 hidroxilas, é um composto com grande estabilidade química e possui um grande poder antioxidante devido a sua capacidade de complexar e capturar espécies reativas, inativando-as e inibindo seus efeitos deletérios (LADEIRA, 2016).

Dessa forma, o presente estudo avaliou se a atividade antioxidante do fulerol seria capaz de evitar o estresse oxidativo causado pelo ZIKV e se a manutenção da homeostase redox desencadeada por ele acarretaria em atividade antiviral.

2. REVISÃO DA LITERATURA

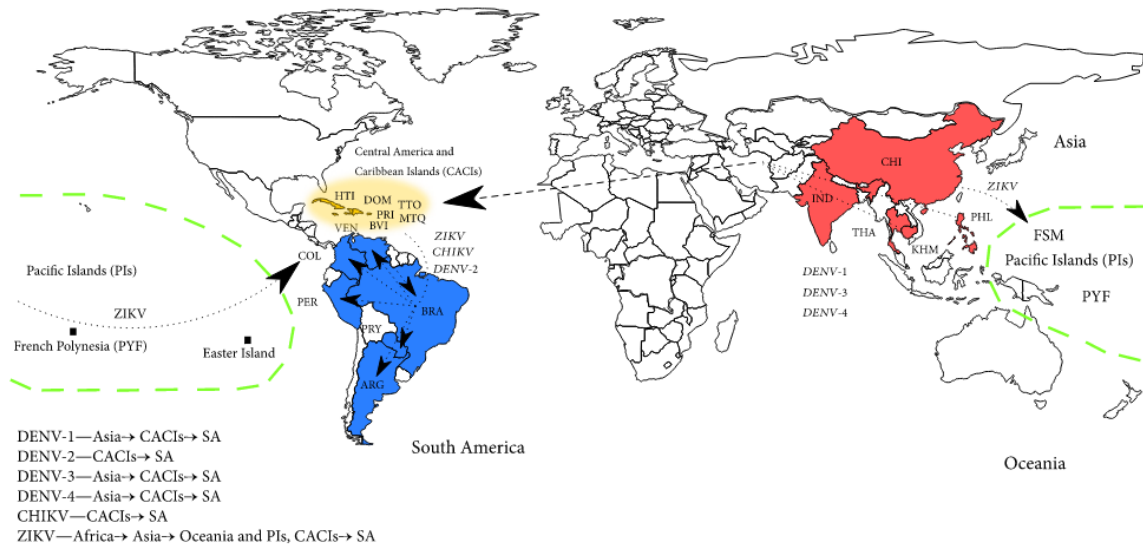
2.1 FEBRE ZIKA

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA

A Febre Zika é uma doença infecciosa causada pelo agente etiológico *Zika virus*. O ZIKV foi descoberto em 1947 durante um monitoramento de febre amarela em primatas e em mosquitos *Aedes africanus* na Floresta de Zika, em Uganda. Em 1952 ocorreu o primeiro relato de caso em humanos, também em Uganda, sendo que o isolamento do vírus em humano foi realizado um pouco mais tarde no sudeste da Ásia. Após sua descoberta, casos esporádicos foram relatados na África e na Ásia, sendo que a primeira epidemia fora desses continentes ocorreu nas Ilhas de Yap, localizada na Micronésia, no ano de 2007, atingindo quase 70% da população local. No ano de 2013 ocorreu uma nova epidemia na Polinésia Francesa. Nos anos de 2014 e 2015, foi detectada a presença deste vírus no continente Americano, sendo que no ano de 2015 ocorreu uma grande epidemia no Brasil, tendo os primeiros casos relatados no Rio Grande do Norte, com sintomas parecidos com dengue e, logo após, o isolamento do vírus em pacientes na Bahia (CAO-LORMEAU, 2014, FAYE et al., 2014; FERRARIS et al., 2019; MUSSO, NILLES, 2014). Em amostras isoladas por Musso e colaboradores em 2014, foi observado que o genoma viral que circulava no Brasil possuía 99% de identidade com a amostra asiática, que também foi reportada nas ilhas do Pacífico.

Inicialmente, a entrada do ZIKV no Brasil foi associada a dois grandes eventos: a Copa do Mundo de Futebol (2014), por meio de turistas africanos, e ao Campeonato Mundial de Canoagem, no mesmo ano, do qual participaram esportistas de países do Pacífico afetados pelo vírus (ZANLUCA et al., 2015). Porém, em um estudo desenvolvido recentemente pelo Instituto Oswaldo Cruz, foi demonstrado que o vírus em circulação no Brasil veio do Haiti através de imigrantes ilegais e militares em missões de paz, tendo o vírus migrado da Polinésia Francesa para a Oceania, posteriormente para a Ilha de Páscoa e, em seguida, para América Central e Caribe, chegando ao Brasil no final de 2013, o mesmo caminho percorrido pelo vírus da dengue e da chikungunya (CAMPOS et al., 2018). Na Figura 1 é possível observar a rota percorrida pelo ZIKV.

Figura 1: Mapa da rota de migração dos arbovírus. A linha tracejada verde destaca a entrada do ZIKV na América do Sul. O vírus migrou da Polinésia Francesa para a Oceania, passando pela Ilha de Páscoa e, em seguida, para América Central e Caribe, chegando ao Brasil.



Fonte: CAMPOS et al., 2018.

Apesar da ampla distribuição geográfica e das epidemias documentadas, as infecções em humanos pelo ZIKV antes do grande surto no Brasil eram esporádicas. Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII) e começou a emitir relatórios mensais sobre a situação da epidemia do ZIKV. Após o fim da ESPII foi estabelecido um total de 61 áreas com a presença do vírus, com 13 países com evidência da transmissão de pessoa para pessoa, 31 países com relatos de distúrbios neurológicos associados à infecção pelo ZIKV (microcefalia e má formação congênita) e 23 países com aumento de casos de Guillan-Barré (WHO, 2017).

Durante o período de circulação do ZIKV na América, o número de casos pode ter chegado a quase 1,5 milhão, uma vez que 80% são assintomáticos. A partir do ano de 2017, o número de ocorrências diminuiu significativamente apesar de alguns casos isolados ainda serem relatados (FERRARIS, 2019). No último boletim epidemiológico do ano de 2019 (nº 51) foram registrados 725 casos prováveis de Zika no Brasil (BRASIL, 2019). Um estudo publicado por Ferguson et al., 2016, já previa que o número de casos tenderia a cair no próximo ano, devido a imunidade rebanho, uma barreira ao vírus, uma vez que uma única pessoa não pode ser infectada mais de uma vez. Porém, neste mesmo estudo foi previsto que a imunidade rebanho atrasa novas epidemias em uma década, sugerindo que após este período novos surtos podem vir a acontecer.

O diagnóstico de ZIKV ainda é falho, métodos de detecção disponíveis no mercado possuem reações cruzadas e existe um grande número de casos subnotificados. Porém, muitos estudos estão sendo desenvolvidos para melhorar a detecção dessa doença, assim como o desenvolvimento de metodologias para determinar parâmetros relacionados à infecção, como abundância do vetor, modo de transmissão, informações de vigilância e comportamento humano (LO, PARK, 2018).

2.1.2 PATOGENIA

A multiplicação do ZIKV ocorre principalmente nas células dendríticas após a inoculação pela picada do mosquito (HASAN et al., 2019). Posteriormente, a infecção é disseminada pela corrente sanguínea para os linfonodos, miocárdio, sistema nervoso central, músculos esqueléticos e para o feto no caso de gestantes (CHAN et al., 2016).

A viremia ocorre de três a quatro dias após o aparecimento dos sintomas e o RNA viral pode ser encontrado a partir do primeiro dia de infecção até o décimo primeiro dia (HASAN et al., 2019).

A Febre Zika apresenta sinais clínicos parecidos com outras arboviroses, como dengue e chikungunya. Os principais sintomas são febre, erupção cutânea, dor de cabeça, dor nas articulações, conjuntivite e dor muscular. Cerca de 80% das pessoas infectadas por ZIKV são assintomáticas (CDC, 2019).

A grande preocupação com ZIKV foi o desenvolvimento de sintomas graves em recém-nascidos, levantando grande preocupação sobre a patogenicidade dessa infecção. No surto ocorrido no Brasil, 42% dos fetos nascidos de grávidas infectadas nasceram com algum tipo de anormalidade, como calcificações cerebrais, microcefalia, restrição de crescimento intrauterino ou morte fetal (HASAN et al., 2019).

Além disso, o ZIKV também tem sido associado ao desenvolvimento da Síndrome de Guillain-Barré, um distúrbio autoimune que ataca parte do sistema nervoso. Após o surto na Polinésia Francesa foi identificado um aumento de mais de vinte vezes no número de casos, além de sintomas neurológicos, um paciente apresentou dificuldades auditivas bilaterais durante a infecção, porém, esses mecanismos ainda precisam ser melhor elucidados (TAPPE et al., 2015).

A população considerada de risco para a infecção pelo ZIKV são as gestantes, principalmente nos três primeiros meses de gestação, momento em que o feto está em processo de formação. O risco também existe para gestantes no segundo trimestre de

gestação, porém em nível menor, uma vez que o desenvolvimento de microcefalia no feto é considerado baixo, mesmo que não esteja totalmente formado (BRASIL, NIELSEN, 2017).

2.1.3 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E PROFILAXIA

A Febre Zika é dificilmente detectada apenas pela avaliação dos sintomas, uma vez que os mesmos são semelhantes à de infecções como dengue e chikungunya, principalmente durante a fase aguda destas doenças (MARDEKIAN, ROBERTS, 2015).

Durante a epidemia no Brasil, os casos considerados suspeitos foram de pacientes que apresentaram exantema maculopapular pruriginoso, além de duas ou mais das seguintes características: febre, conjuntivite não purulenta e prurido, artralgia de múltiplas articulações (poliartralgia) e edema periarticular. Para confirmação dos casos, foi necessária a realização de teste como: identificação de RNA viral por PCR, técnica de qRT-PCR demonstrando presença de RNA do ZIKV e/ou reação sorológica por imunoglobulina M (IgM) (pode exibir reação falso-positiva se uma infecção pelo vírus da dengue coexiste) (DE OLIVEIRA, et al., 2016).

Até o momento, não existem medicamentos antivirais para o combate da infecção pelo ZIKV. São administrados aos pacientes medicamentos paliativos para controle dos sintomas como analgésicos e anti-inflamatórios não esteroides, descanso e hidratação (CDC, 2019).

Atualmente, não existem vacinas para o combate do ZIKV. No entanto, pesquisas extensas estão sendo realizadas no instituto Butantan (São Paulo – Brasil) para o desenvolvimento de uma vacina contra o ZIKV, em colaboração com outras instituições brasileiras e o Ministério da Saúde dos EUA. Inúmeros estudos apresentam vacinas candidatas para avaliação clínica, vacinas de DNA, RNA modificado, vírus inativados e uma vacina com vetor de sarampo, porém as mesmas ainda se encontram em ensaio clínico de fase 1 (HASAN et al., 2019).

2.2 ZIKA VIRUS

2.2.1 FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE, GÊNERO FLAVIVIRUS

A família *Flaviviridae* é composta por pequenos vírus envelopados com material genético composto por RNA senso positivo de fita simples com aproximadamente 9 a 13 kb. Os vírions possuem cerca 40-60 nm de diâmetro e seu material genético codifica uma única poliproteína (SIMMONDS et al., 2017). O nome teve origem devido ao primeiro membro descoberto dessa família, o vírus da febre amarela, do latim *flavus* “amarelo” (KNIPE, HOWLEY, 2013).

Essa família é formada por quatro gêneros: os *Flavivirus* (com 53 espécies), os *Hepacivirus* (com 14 espécies), os *Pegivirus* (com 11 espécies) e *Pestivirus* (com 4 espécies). Os membros dessa família compartilham semelhanças morfológicas, na organização genômica e nas estratégias de multiplicação (NEUFELDT et al., 2018, SIMMONDS et al., 2017).

A maioria dos membros do gênero *Flavivirus* é transmitida por artrópodes, com grupos que infectam mosquitos e outros que infectam carrapatos. Os hospedeiros usuais são mamíferos e aves, um número elevado de casos são assintomáticos ou com a presença de febre leve. Em alguns casos, podem ocorrer sintomas mais graves, como vazamento vascular, hemorragia, choque ou complicações neurológicas graves, como encefalite e meningite. A dengue, causada pelo agente etiológico vírus dengue (DENV), acomete cerca de 390 milhões de pessoas por ano, causando cerca de 10 mil mortes/ano (NEUFELDT et al., 2018). Além do dengue, outros flavivírus possuem importância em saúde pública, como o vírus da febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do oeste do Nilo (WNV) e o ZIKV (WIKAN, SMITH, 2016). Outros membros causam doenças economicamente importantes em animais domésticos e selvagens, ou infectam apenas artrópodes (SIMMONDS et al., 2017).

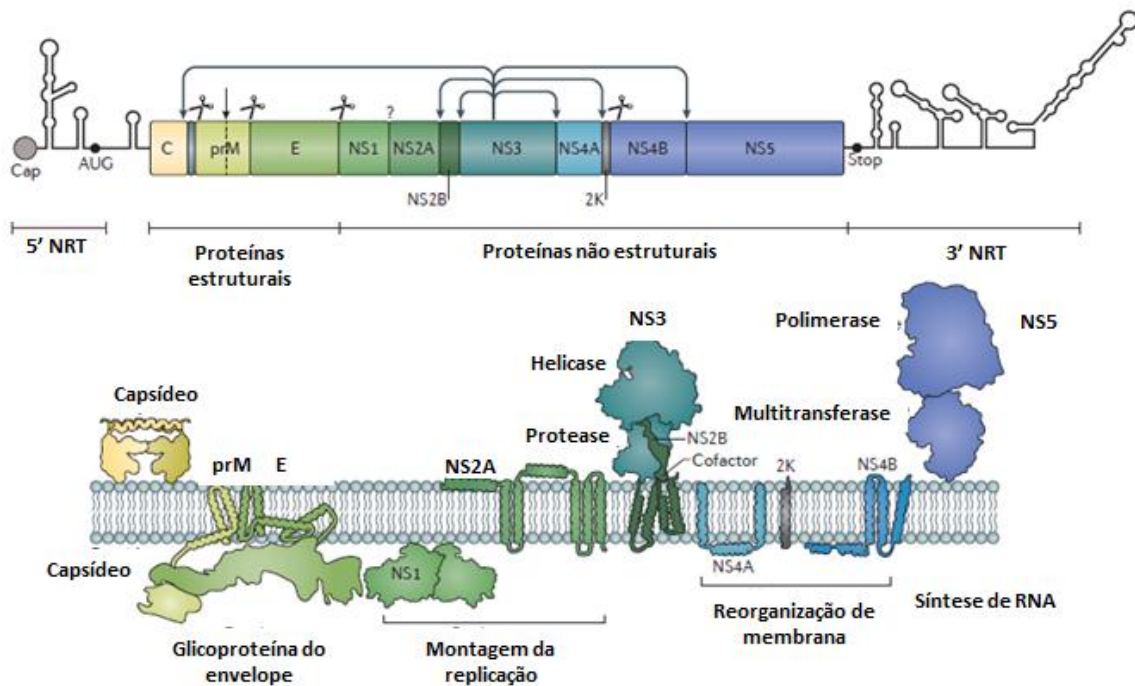
O gênero *Hepacivirus* compreende o agente etiológico da Hepatite C, hepacivírus C (HCV), sendo o principal responsável por doenças hepáticas no mundo, com uma grande parcela com risco de desenvolver cirrose hepática e carcinoma hepatocelular. Esse gênero também possui outros vírus que infectam cavalos, roedores, vacas e primatas, porém com patogenicidade desconhecida. As infecções causadas pelos hepacivírus são persistentes e têm como alvo o fígado. Já o gênero *Pestivirus* infecta porcos e ruminantes e são transmitidos pelo contato de secreções, como gotículas

respiratórias, urina ou fezes. Os principais membros são os vírus da diarreia viral bovina e o vírus da peste suína clássica. Os membros do gênero *Pegivirus* causam infecções persistentes em mamíferos, no entanto não foram associados a nenhuma doença (SIMMONDS et al., 2017; NEUFELDT et al., 2018).

2.2.2 GENOMA E ESTRUTURA

O RNA viral é estrategicamente organizado para conter o mínimo de genes necessário para multiplicação e evasão ao sistema imune do hospedeiro. O genoma do ZIKV, assim como de todos os flavivírus, é composto com um RNA de fita simples que gera um único RNA mensageiro. Consiste em uma única janela de leitura, *open reading frame* (ORF), com mais de 10.000 nucleotídeos que codificam todas as proteínas estruturais e não estruturais e é flanqueado por duas regiões não codificantes (NTR) nas extremidades 5'-3' (KING et al., 2012). Na Figura 2 é possível observar um esquema do ORF codificado.

Figura 2: Esquema ilustrativo da organização do genoma dos flavivírus e a topologia de membrana de proteínas virais maduras. As tesouras representam o local de clivagem da poliproteína, AUG o códon de iniciação e NRT as regiões não codificantes do genoma.



Fonte: adaptado de NEUFELDT et al., 2018.

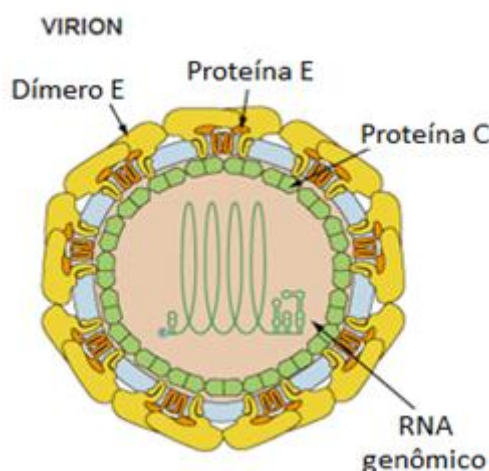
A poliproteína é clivada em dez proteínas, três estruturais (C do capsídeo, prM de membrana e proteína E do envelope) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). A clivagem da poliproteína ocorre tanto por proteases virais como por proteases do hospedeiro. Clivagem entre NS2/NS3 ocorre por protease viral, uma peptidase de sinal do hospedeiro para separação entre C/prM, prM/E, E/NS1, 2K/NS4B, e uma protease do hospedeiro para fragmentação entre NS1/NS2A (BEAVER et al., 2018).

A proteína NS1, única proteína não estrutural que reside no lúmen do retículo endoplasmático, juntamente com a NS2A é essencial para a multiplicação viral e produção de partículas infecciosas. A NS2B possui uma subunidade de serina que atua como cofator de NS3. A NS3 possui função de protease e helicase. Já a NS4A é uma proteína integral de membrana com atividade indutora de curva de membrana. A NS4B é uma proteína sem relato de atividade enzimática, que interage com a NS3. A NS3 e NS5 são necessárias para a multiplicação viral (NEUFELDT et al., 2018).

As proteínas NS3 e NS5 são essenciais para o vírus, elas abrigam juntas a maior parte das atividades catalíticas necessárias para multiplicação. A NS3 possui múltiplos domínios, com N-terminal e uma porção C-terminal contendo as atividades de RNA trifosfatase e RNA helicase envolvidas na captação e síntese de RNA viral. A NS5 possui um domínio N-terminal multitransferase e no domínio C-terminal atividade RNA polimerase depende de RNA. Durante este processo, o genoma viral senso positivo atua como modelo para a síntese intermediária para RNA senso negativo que, por sua vez, opera como modelo para a síntese de RNA (+) pela NS5 C-terminal o qual, posteriormente, é traduzido na poliproteína viral (BOLLATI et al., 2010; ZHANG et al., 2017).

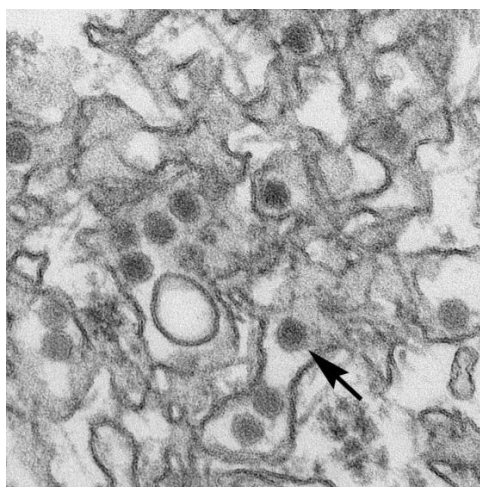
O processo de formação da partícula viral inclui todas as proteínas codificadas por seu genoma, as quais têm função em momentos e localizações celulares específicos. A proteína C forma o capsídeo viral com formato icosaédrico com cerca de 50 nm de diâmetro, seguido por uma membrana de bicamada lipídica derivada do hospedeiro. As proteínas M e E são exibidas na superfície do vírus e possuem hélices transmembranares que ancoram na membrana. De acordo com a liberação das partículas virais maduras, a proteína prM é clivada por uma protease do tipo furina localizada na rede *trans*-Golgi entre o peptídeo pr e a proteína M (BEAVER et al., 2018; YE et al., 2016). A estrutura dos flavivírus podem ser observadas nas Figuras 3 e 4.

Figura 3: Visão geral da estrutura do vírion de flavivírus. Em destaque o RNA viral envolto pelo capsídeo, a membrana de origem celular e as proteínas do envelope.



Fonte: "Zika virus: Virion," por ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics, disponível em: <https://viralzone.expasy.org/6756?outline=all_by_species>.

Figura 4: Imagem de uma partícula de ZIKV por microscopia eletrônica de transmissão. A seta indica uma única partícula viral.



Fonte: GOLDSMITH, 2016 - CDC Public Health Image Library.

Uma descoberta no genoma dos flavivírus é a presença de RNAs subgenômicos não codificadores (sfRNA), responsáveis pela evasão da imunidade do hospedeiro. Esses RNAs têm sido implicados na redução de interferon tipo I e na mediação da resistência a exonucleases celulares que degradam transcritos genômicos. Um trabalho recente sugere que esse sfRNA de ZIKV pode inibir a resposta do interferon de maneira mais ampla que outros flavivírus (DONALD et al., 2016; GÖERTZ, et al., 2018).

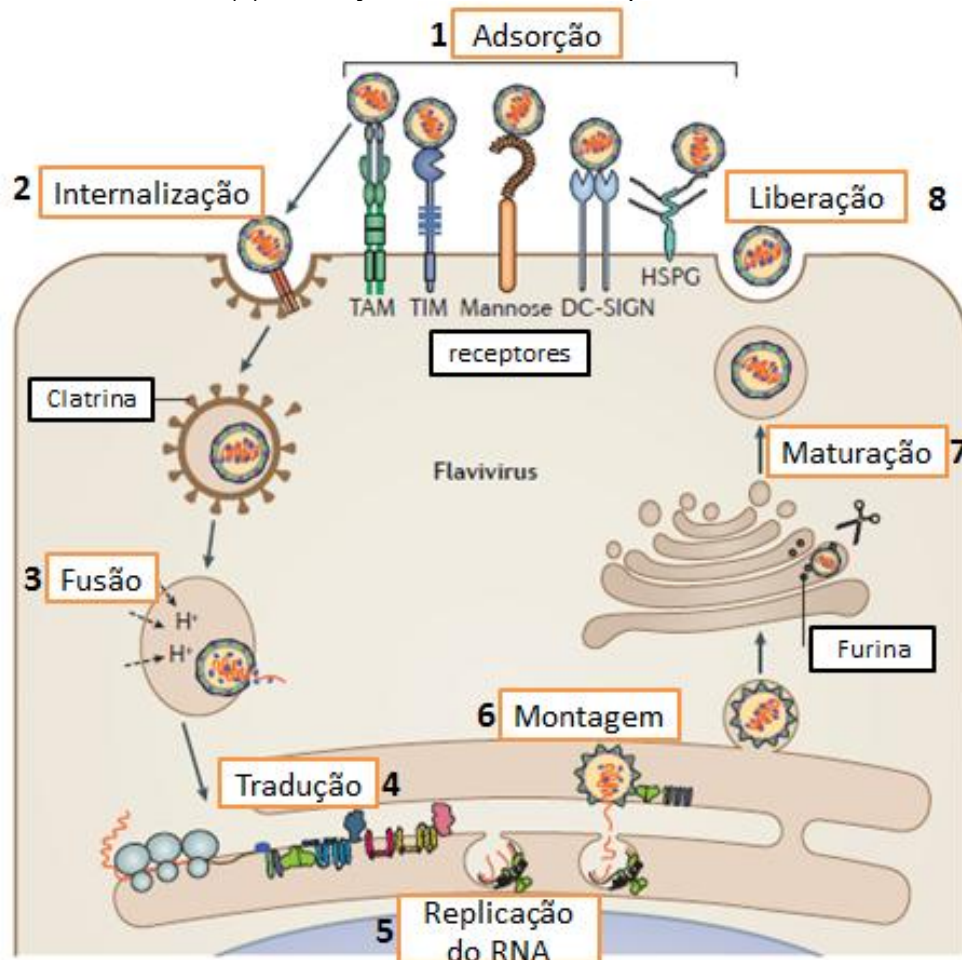
2.2.3 CICLO DE MULTIPLICAÇÃO

As partículas virais de Zika se ligam na superfície de células suscetíveis, como monócitos, células dendríticas, neurônios, macrófagos placentários, trofoblastos, células progenitoras neurais humanas, células testiculares, fibroblastos uterinos e tecidos oculares associados. As partículas virais interagem primeiro com os receptores necessários para adsorção do vírus na superfície da célula, seguido por outras interações específicas com os receptores secundários, mediando a internalização endocítica. Os vírions penetram nas células suscetíveis por um mecanismo de endocitose mediada por clatrina, através da interação da proteína E com receptores da célula do hospedeiro. (NEUFELDT et al., 2018).

O pH baixo do endossoma faz com que o envelope viral se funda com a membrana da vesícula, ocorrendo a liberação do genoma do vírus no citoplasma. O RNA (+) é liberado e identificado pelos ribossomos, sendo a tradução iniciada na membrana do retículo endoplasmático rugoso, produzindo uma única poliproteína. As proteases virais e celulares catalisam a clivagem co-traducional e pós-traducional da poliproteína. As moléculas de RNA (+) geradas pelo complexo de replicase viral podem ser incorporadas às partículas virais por um processo que envolve a encapsidação do RNA, seguido do brotamento no lúmen do retículo endoplasmático, o qual ocorre predominantemente em regiões opostas aos locais de replicação. A maturação das partículas nascentes contendo prM acontece ao longo da via secretória por clivagem de prM mediada por furina (ZHANG et al., 2015; SCATURRO, et al., 2015).

A esquematização do ciclo de multiplicação dos flavivírus pode ser observada na Figura 5.

Figura 5: Ciclo de multiplicação dos flavivírus. (1) Ligação do vírion nos receptores; (2) Endocitose mediada por clatrina; (3) Acidificação, fusão membranar e liberação do RNA; (4) Tradução do mRNA no retículo endoplasmático; (5) Replicação do RNA e processamento; (6) Montagem do nucleocapsídeo com ativação das furinas para clivagem da prM; (7) Maturação da partícula viral e brotamento; (8) Liberação do vírus maduro por exocitose.



Fonte: adaptado de NEUFELDT et al., 2018.

2.2.4 TRANSMISSÃO E CICLO DE MANUTENÇÃO

A transmissão do ZIKV ocorre principalmente pela picada da fêmea de mosquitos infectados (transmissão vertical), sendo os mosquitos do gênero *Aedes* os principais vetores, com predominância para o *Ae. aegypti* nas regiões tropicais (FERRARIS, 2019). A Tabela 1 mostra as diferentes espécies de mosquitos do gênero *Aedes* e sua associação com o local de circulação do vírus.

Tabela 1: Espécies de mosquitos associados à transmissão do ZIKV de acordo com o local da epidemia/circulação.

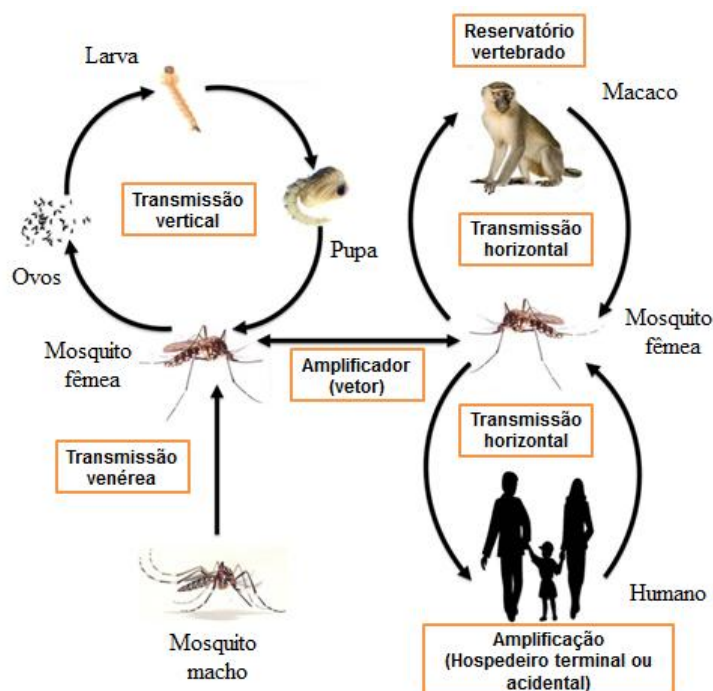
Espécie de mosquito	Local
<i>Aedes hensilii</i>	Epidemia na ilha de Yap.
<i>Aedes aegypti</i>	Epidemia no Brasil.
<i>Aedes africanus</i>	Circulação em Uganda.
<i>Aedes aegypti e albopictus</i>	Circulação no continente Asiático e epidemia na Polinésia Francesa.

Fonte: adaptado de HASAN et al. 2019.

Outras formas de transmissão descritas foram de humano para humano sem a presença do vetor, como de uma mulher grávida para o feto (perinatal), transmissão sexual e durante o aleitamento materno (CDC, 2019). Estudos indicam que a cepa africana é mais bem adaptada à transmissão por mosquitos, enquanto a cepa americana pode ter obtido uma maior capacidade de transmissão vertical (BRASIL, NIELSEN, 2016; CALVET et al., 2016).

Na África, o ciclo de manutenção do ZIKV, assim como os outros arbovírus, ocorre através de reservatórios primatas, onde artrópodes podem transmitir o vírus a primatas não humanos e outros mamíferos de vida livre. No entanto, no Brasil, os seres humanos são considerados o único hospedeiro do ciclo de transmissão urbana e periurbana do ZIKV e ainda não se sabe ao certo como ocorre manutenção silvestre desse vírus. Estudos recentes evidenciam a infecção natural de primatas não humanos, porém mais estudos precisam ser realizados para uma melhor compreensão (TERZIAN et al., 2018). A Figura 6 demonstra o esquema geral de manutenção dos arbovírus na natureza.

Figura 6: Esquema do ciclo de manutenção geral dos arbovírus. São mantidos na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados.



Fonte: adaptado de AGARWAL, PARIDA, PABAN, 2017.

2.3 PROCESSO OXIDATIVO

2.3.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Constantemente o metabolismo celular produz espécies reativas de oxigênio (ERO) como subproduto da respiração anaeróbica, por enzimas mitocondriais, pelo retículo endoplasmático e pelos peroxissomos, sendo a mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, a principal fonte de ERO (ROY et al., 2017).

As espécies reativas podem ser radicalares ou não-radicalares. As radicalares, conhecidas como radicais livres, possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, permitindo a transferência de elétrons para moléculas vizinhas. Alguns exemplos são: OH^\bullet (íon hidroxila), HOH^\bullet (íon peroxil), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (ânion superóxido), NO (óxido nítrico) e O_2 (oxigênio molecular). As não radicalares são mais estáveis que os radicais livres, mas também reagem com moléculas vizinhas, sendo também muito reativas, como H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e HOCl (ácido hipocloroso) (MARTELLI, NUNES, 2014).

A principal via de metabolismo do oxigênio no organismo ocorre com a sua completa oxidação e com a adição de quatro elétrons ao final da cadeia respiratória para

formação de água. Se ocorrer redução do oxigênio com o número menor de elétrons, haverá a produção de ERO, como o superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$), o peróxido de hidrogênio ($O_2 + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) e a hidroxila ($H_2O_2 + e^- \rightarrow OH + OH$) (ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

O ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ é considerado a ERO “primária”, e pode interagir com outras moléculas para gerar as ERO “secundárias”. A espécie reativa considerada a mais potente em sistemas biológicos é o OH^\bullet , o qual é gerado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss, na presença de um metal de transição, geralmente ferro (Fe) ou cobre (Cu). O OH^\bullet apresenta uma alta reatividade, o que o torna muito nocivo, além de possuir uma meia vida muito curta, aproximadamente 10^{-9} segundos (PASTOR et al., 2000).

As ERO são formadas em resposta a estímulos extracelulares e intracelulares. Estima-se que uma célula humana é exposta a cerca de $1,5 \times 10^5$ fontes de produção por dia, a partir dos radicais hidroxila e de outras espécies reativas (AMES, SHIGENAGA, HAGEN, 2013; HALLIWELL, CROSS, 1994).

No contexto biológico, as ERO são oxidantes e mediadoras de lesão celular, envolvidas na patogênese de diversas doenças e responsáveis por desequilibrarem a homeostase redox. As espécies reativas também desempenham um papel importante na sinalização celular, regulação de citocinas, fatores de crescimento, transcrição, imunomodulação e apoptose. As células possuem um poderoso sistema antioxidante para remoção de espécies reativas, porém, uma vez que acontece o desequilíbrio entre as ERO e o sistema antioxidante em favor dos oxidantes, ocorre a interrupção da sinalização e controle redox, culminando com o estresse oxidativo (SIEIS, 2015; ZHANG, RONG, LI, 2019).

As consequências do estresse oxidativo são danos ao DNA, proteínas e lipídeos de membrana, levando a lesões teciduais, respostas à inflamação, perda da integridade e morte celular (ZHANG, RONG, LI, 2019).

Cada espécie reativa possui um mecanismo de lesão celular dependendo de sua toxicidade. Um exemplo é o H_2O_2 , que possui um grande potencial deletério devido à sua meia vida longa e a sua capacidade de atravessar as membranas celulares. Esta espécie também pode gerar radicais hidroxilas e, quando na presença de excesso de íons ferro, pode ocorrer ligação com proteínas carreadoras do ferro potencializando em mil vezes seu caráter oxidativo. O radical hidroxila pode se ligar com metais ou outros radicais e causar danos ao metabolismo celular, incluindo mutações no DNA por alterações de bases nitrogenadas, inativar proteínas e enzimas através da ligação com grupamentos

proteicos sulfidrilas e pontes dissulfeto, e iniciam a oxidação de ácidos graxos em membranas celulares, causando lipoperoxidação, ocasionando perda da seletividade da membrana comprometendo a função celular. Outro exemplo são os radicais superóxido que podem gerar lesões secundárias em sistemas orgânicos, principalmente durante os processos inflamatórios, uma vez que são espécies geradas por monócitos, neutrófilos, macrófagos e eosinófilos durante a fase de ativação dessas células. Sua forma protonada (radical hidropoxila) é considerada mais reativa devido à maior toxicidade para membranas celulares (FERREIRA, ABREU, 2007; SCHNEIDER, OLIVEIRA, 2004; VASCONCELOS et al., 2007).

Entre as diversas injúrias celulares causadas pelas espécies reativas, a lipoperoxidação apresenta os maiores efeitos deletérios. Uma vez que a destruição das moléculas de lipídeos se dá por meio da quebra de ligações covalentes dos ácidos graxos, causando a destruição das membranas celulares devido à perda de seletividade na troca iônica e, como consequência da liberação de produtos tóxicos das organelas, principalmente dos lisossomos, culmina posteriormente em morte celular (VASCONCELOS et al., 2007, BARBOSA et al., 2010).

2.3.2 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

O sistema de defesa antioxidante tem a função de defender as células dos efeitos deletérios causados pelas espécies reativas. O sistema antioxidante pode agir na prevenção do dano, impedindo a formação ou a ação das espécies reativas, além disso, pode favorecer o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (KOURY, DONANGELO, 2003).

Os antioxidantes são qualquer substância presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, apto a atrasar ou bloquear a oxidação de maneira eficiente. Os antioxidantes podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos podem ser endógenos, quando a produção é realizada *in vivo* ou exógenos, também denominados dietéticos, quando a aquisição ocorre por ingestão de alimentos (CAMPOS, LEME, 2018). Alguns antioxidantes não enzimáticos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Antioxidantes não enzimáticos de fontes endógenas e exógenas e seus mecanismos de ação.

Antioxidantes	Ação
Vitamina A (β -caroteno)	Proteção contra a oxidação de lipídeos e DNA.
Vitamina C (ácido ascórbico)	Inibição de ERO. Proteção contra danos causados pela LDL oxidada.
Vitamina E (α -tocoferol)	Proteção contra oxidação de ácidos graxos na membrana celular. Converte $O_2^{\cdot -}$ e H_2O_2 em espécies menos reativas.
Outros carotenoides	Proteção contra oxidação de lipídeos, LDL, proteínas e DNA. Sequestra e inativa espécies reativas.
Cu, Zn, Mn, Se	Cofatores de enzimas antioxidantes.
Coenzima Q10	Translocação de íons H^+ mitocondrial, neutralizando o potencial tóxico do hidrogênio.
Ácido úrico	Previne oxidação de lipídeos e DNA.
Hemoglobina	Após degradação pela biliverdina redutase protege as células contra danos oxidativos devido a “proteção” do ferro central.

Fonte: adaptado de BARBOSA et al., 2010; CAMPOS, LEME, 2018.

Os antioxidantes enzimáticos são compostos por enzimas que agem por meio de mecanismos de prevenção que impedem ou controlam a formação de espécies reativas envolvidas com a iniciação das reações em cadeia que acabam com propagação e amplificação do processo e, com isso, com a ocorrência de danos oxidativos. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) (BARBOSA et al., 2010).

A SOD é indispensável na proteção do organismo contra as ERO, está presente essencialmente em todas as células. Atua na remoção de $O_2^{\cdot -}$ formando O_2 e H_2O_2 . Essa enzima foi descoberta em 1969 e até hoje, apesar de inúmeras pesquisas, nenhum outro substrato foi demonstrado tão eficiente para remoção desse radical (CAMPOS, LEME, 2018). Essa enzima possui três isoformas: a citoplasmática, Cu/Zn SOD (SOD1); a mitocondrial, Mn SOD (SOD2), e a extracelular, Cu/Zn SOD (SOD3).

As três isoformas exibem funções análogas, no entanto, diferem em algumas características, como estrutura proteica, localização cromossômica, cofatores, distribuição gênica e compartimento celular. A SOD1 e a SOD3 compartilham semelhanças genéticas

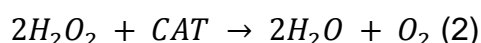
e homologia de aminoácidos, diferentes da SOD2. A SOD1 é a principal isoforma intracelular, sendo responsável por 80% da concentração total dessa proteína. As três isoformas da SOD agem por mecanismo comum de desmutação do ânion superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio, que é uma espécie reativa menos tóxica (FORMAN, 2007; LIU et al., 2008). A equação (1) demonstra a reação catalisada por SOD:



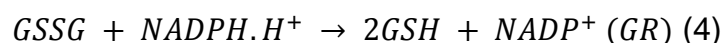
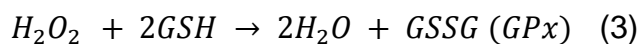
A eliminação de H_2O_2 pode ser realizada por várias enzimas, sendo que a principal delas é a CAT. Essa enzima é dependente de Fe^{2+} e utiliza H_2O_2 como substrato, catalisando a desmutação e formando H_2O e O_2 . É expressa nos principais órgãos, especialmente no fígado, rins e eritrócitos. Sua localização principal é nos peroxissomos, mas também está presente no núcleo e citoplasma (CAMPOS, LEME, 2018).

Após o tempo de exposição da CAT ao H_2O_2 podem ocorrer alterações na expressão dessa enzima, influenciadas pela concentração de peróxido de hidrogênio e capacidade basal da enzima. Altas concentrações de NO^{\bullet} podem inibir a atividade da CAT. Ainda, CAT evita o acúmulo de metahemoglobina, resultante da oxidação da hemoglobina (GLORIEUX et al., 2015).

A CAT apresenta uma das mais altas taxas de atividade para todas as enzimas, sendo que uma molécula pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio a cada minuto (VALKO et al., 2006). A equação (2) de desmutação de CAT pode ser observada abaixo:



A enzima GPx também promove a remoção de H_2O_2 , no entanto, também pode agir na remoção de hidroperóxidos orgânicos (R-OOH) e peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Essa enzima é expressa na maioria das células. É dependente de selênio (Se) e requer glutatona para promover a redução de H_2O_2 em H_2O . Cerca de 90% da glutatona estão localizadas no citoplasma, 10% na mitocôndria e uma pequena porcentagem no retículo endoplasmático. Aproximadamente 90% de glutatona encontra-se em sua forma reduzida (GSH) e o restante em sua forma oxidada (GSSG). A GSH é oxidada a GSSG pela GPx, reduzindo o H_2O_2 a H_2O (equação 3). A conversão da glutatona para forma reduzida é realizada pela glutatona redutase (GR) (equação 4) (VIZZOTO, 2017).

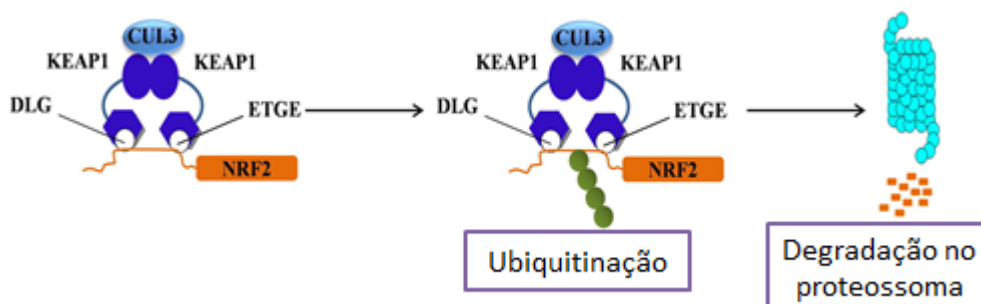


A enzima GPx tem alta afinidade pelo H_2O_2 e possui melhor atividade com menores concentrações de substrato. Assim, como a CAT, a GPx também pode ser inibida por altas concentrações de NO^* . A relação entre GSH/GSSG pode ser utilizada para verificar o estado redox intracelular (BIRBEN et al., 2012; VIZZOTO, 2017).

A expressão das enzimas do sistema antioxidante é fortemente regulada pelo fator de transcrição NRF-2 (fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2). O NRF-2 pertence à subfamília Cap 'n' Collar (CNC) e compreende sete domínios funcionais, Neh (homologia NRF-2-ECH) 1 a Neh7. Cada domínio possui uma função, Neh1 permite que NRF-2 heterodimerize com pequenas proteínas fibrosarcoma musculoaponeurótica (Maf), DNA e outros elementos de transcrição, além de formar um complexo nuclear com a enzima conjugadora de ubiquitina (UbcM2). Neh2 interage com dois motivos importantes de Keap1 conhecidos como DLG e ETGE, que são essenciais para a interação entre o NRF-2 e Keap1, este responsável por inibir a atividade transcricional de NRF-2 por meio de ubiquitinação e degradação proteossomal sob condições normais (AHMED et al., 2017; CANNING, SORRELL, BULLOCK, 2015).

Na Figura 7 é demonstrada a ubiquitinação e a degradação de NRF-2 em condições basais, onde ETGE atua como dobradiça com maior afinidade e DLG exercendo repressão sob NRF-2 (AHMED et al., 2017; ZHANG et al., 2004).

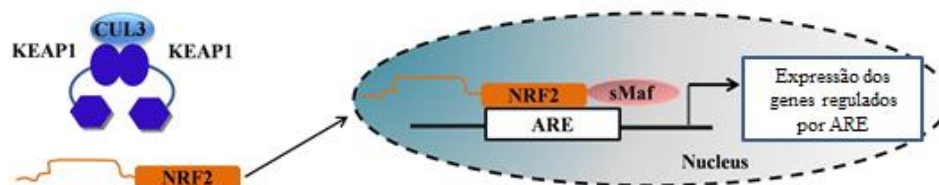
Figura 7: Degradação de NRF-2 sob condições basais. O NRF-2 é sequestrado por Keap1 por seus dois motivos (ETGE e DLG) que levam à ubiquitinação mediada por CUL3 seguida de degradação do proteossoma.



Fonte: adaptado de AHMED et al., 2017.

Quando as células entram em estresse oxidativo, o NRF-2 se dissocia da ligação com Keap1 devido a uma modificação no tiol dos resíduos de cisteína de Keap1, evitando assim a ubiquitinação do NRF-2 e sua degradação proteossomal. Com isso, NRF-2 transloca para o núcleo, heterodimeriza com pequenas proteínas (Maf) e se liga ao elemento de resposta antioxidante (ARE) (Figura 8). O terminal carboxi de Neh3 atua como um domínio de transativação ao interagir com o co-ativador de transcrição CHD6 (proteína de ligação ao cromosoma-ATPase/helicase ao DNA). Neh4 e Neh5 também atuam como domínios de transativação, mas se ligam a outro co-ativador de transcrição conhecido como CBP (proteína de ligação ao elemento de resposta do cAMP). Além do mais, Neh4 e Neh5 interagem com o cofator nuclear RAC3 / AIB1 / SRC-3, levando a uma expressão aprimorada do gene ARE direcionado a NRF-2. Neh5 possui um sinal de exportação nuclear sensível a redox, que é crucial para a regulação e localização celular deste fator nuclear (AHMED et al., 2017; KIM et al., 2012; LI, YU, KONG, 2006; NIOI et al., 2005;).

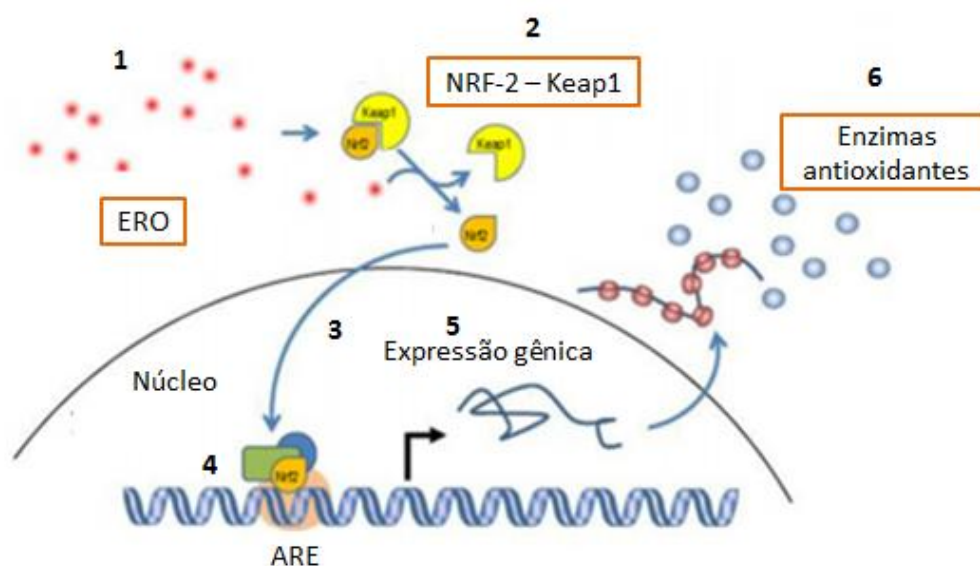
Figura 8: Translocação nuclear de NRF-2 e interação com ARE em condições de estresse oxidativo.



Fonte: adaptado de AHMED et al., 2017.

A Figura 9 apresenta um resumo simplificado a partir do aumento de espécies reativas até a expressão das enzimas antioxidantes.

Figura 9: Aumento de ERO e ativação do sistema antioxidante celular. (1) Aumento e acumulação de ERO no citoplasma; (2) Ruptura do complexo NRF-2/Keap1; (3) Translocação nuclear do fator de transcrição NRF-2; (4) Ligação de NRF-2 ao ARE; (5) Expressão gênica das enzimas antioxidantes; (6) Tradução das enzimas antioxidantes no citoplasma.



Fonte: adaptado de DERAMAUDT, DILL, BONAY, 2013.

Fazem parte do sistema de defesa antioxidantes controlado pelo complexo NRF-2/ARE, as enzimas SOD, CAT, GPx, glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PD), heme oxigenase-1(HO-1), NAD(P)H quinona oxidoreductase-1 (NQO-1), subunidades catalíticas e reguladoras de glutamato cisteína ligase (GCLC e GCLM), glutathiona S-transferase (GST) e uridinadifosfato glucuronosiltransferase (UDPGT) (LEE, 2018).

2.3.3 ESTRESSE OXIDATIVO E INFECÇÕES VIRAIS

Já foi demonstrado na literatura que uma variedade de infecções virais desencadeia o estresse oxidativo, interferindo na função normal da célula hospedeira. O primeiro estudo divulgado sobre a interação vírus/estresse oxidativo foi demonstrado por Peterhans et al. (1997). Os quais descreveram que o vírus Sendai induz o aumento dos níveis de quimioluminescência, devido à oxidação do luminol por espécies reativas. Além disso, foi relatado que o vírus inativado com luz UV é capaz de gerar espécies reativas, enquanto vírus inativado pelo calor não gerava, sugerindo que a conformação da estrutura viral medeia essa ação. Posteriormente, também foi descrito que muitos retrovírus, vírus de DNA e RNA também estariam envolvidos na geração de espécies reativas e alterações na homeostase redox. Para a família *Flaviviridae*, foi demonstrado

que os vírus da DENV, JEV, WNV, encefalite do carrapato (TBEV) e HCV desencadeiam estresse oxidativo (CAMINI et al., 2017; ZANGH, RONG, LI, 2019).

No primeiro momento da infecção viral, as espécies reativas são vistas como um mecanismo de defesa da célula hospedeira. Porém, com a progressão da infecção, mais ERO são formadas, gerando um desequilíbrio na homeostase redox celular. Além disso, as espécies reativas podem facilitar ou mesmo promover a multiplicação viral. Dessa forma, o estresse oxidativo pode contribuir para vários aspectos da patogênese viral, incluindo resposta inflamatória, morte celular, entre outros, que são influenciados pela quantidade de ERO formada e tempo de exposição à célula hospedeira (CAMINI et al., 2017; RESHI et al., 2014).

Na infecção pelo HCV, a produção exorbitante de ERO pode contribuir para inflamação do fígado, fibrogênese e carcinogênese hepática. Sabe-se que o HCV gera estresse oxidativo e modifica os sistemas antioxidantes, levando a hepatite C crônica e manifestações extra-hepáticas como diabetes *mellitus* de tipo 2, doenças cardiovasculares, desordens auto-imunes ou linfoproliferativas, lomerulopatias e doenças neurológicas. O HCV é o membro da família *Flaviviridae* que possui o maior número de informações em relação a sua associação com o estresse oxidativo (ZANGH, RONG, LI, 2019).

Análogo à infecção por HCV, o DENV causa nas células hospedeiras alterações no estado redox. Danos oxidativos têm sido relatados em pacientes graves de dengue, indicando uma correlação entre o estresse oxidativo e a patogênese viral. Um estudo recente demonstrou que mudanças na homeostase redox estão associadas ao aumento da carga viral em monócitos deficientes em glicose-6-fosfato (G6PD), a deficiência de G6PD enfraquece as defesas antioxidantes, causando estresse oxidativo. Também foi relatado que o DENV pode manipular as defesas antioxidantes favorecendo sua multiplicação, em acordo com isso, DENV 2 pode alterar a GSH intracelular inibindo a síntese de GSH e promovendo a multiplicação viral (AL-ALIMI et al., 2014, TIAN et al., 2010; ZANGH, RONG, LI, 2019).

Infecções causadas pelo JEV também relatam o aumento das ERO e que o fator chave da patogênese está relacionado com o estresse oxidativo. Menos estudos são relatados para o WNV e TBEV, porém há uma associação do aumento de ERO com o aumento da transcrição de enzimas antioxidantes durante a infecção (ZANGH, RONG, LI, 2019).

Como foi demonstrado, as infecções por vírus da família *Flaviviridae* induzem estresse oxidativo, afetando o metabolismo celular e o ciclo de multiplicação do vírus. Nas últimas décadas, muitos progressos foram alcançados para compreensão da interação entre estresse oxidativo e os vírus dessa família, especialmente para HCV e DENV (ZANGH, RONG, LI, 2019). Porém, até o momento, existem poucos relatos sobre os efeitos das ERO na multiplicação e na patogênese do ZIKV. Tricarito et al. (2017) mostraram o aumento da expressão de SOD2 e HO-1 em infecções virais em células U-87MG no entanto, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

O estresse oxidativo induzido por infecções virais também pode ativar as principais vias de sinalização inflamatórias, contribuindo para a patogênese viral. Estudos realizados com o DENV demonstraram que o estresse induzido por esse vírus é dependente de NOX, ativa o fator regulador de IRF-3, IRF-7, STAT-1 e NFκB. Também pode induzir estresse oxidativo nas células hepáticas, levando à produção de CCL5 e ativação do sistema transcricional regulador CCAAT / proteína de ligação ao potenciador β (C/EBP β) (LIN et al., 2000; OLAGNIER, PERI, STEEL, 2014). Estresse oxidativo causado por outros vírus, como o vírus da febre do Rift Valley (RVFV), também poderia ativar reguladores inflamatórios NFκB e p53, modulando a expressão de citocinas, apoptose e morte celular (NARAYANAN et al., 2014). O vírus sincicial respiratório (RSV) também ativa IRF-3 dependente de NOX (INDUKURI et al., 2006).

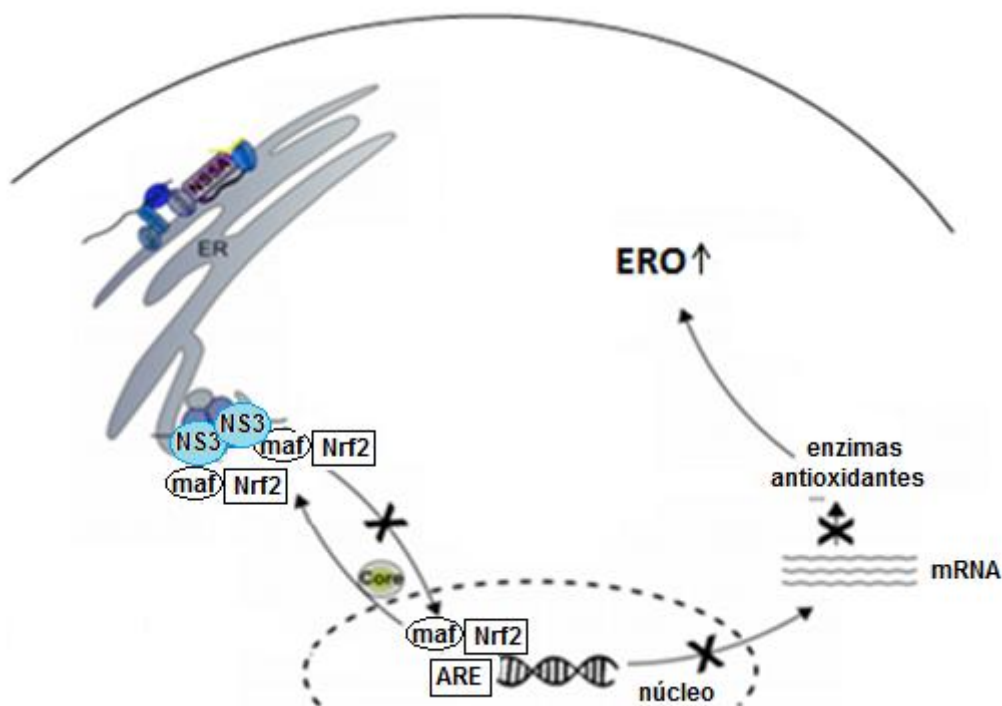
Além do dano oxidativo, já foi demonstrado que os flavivírus e alfavírus podem utilizar do estresse oxidativo para facilitar sua multiplicação e utilizar o oxigênio produzido para controlar o capeamento de RNA viral (ZANGH, RONG, LI, 2019). Com isso, o estresse oxidativo desempenha um papel crucial não apenas no ciclo de multiplicação do vírus, como também na patogênese. No entanto, o estresse oxidativo é muito prejudicial à célula, com isso o vírus manipula as vias celulares do hospedeiro, mantendo o desequilíbrio redox alto o suficiente para facilitar a multiplicação viral mas, ao mesmo tempo, em um nível que não mate a célula hospedeira. Dessa forma, os vírus têm a capacidade de manipular a via de NRF-2. Para alguns vírus, a modulação da via é positiva e para outros ocorre repressão da via (HOSAKOTE et al., 2011; LEE, 2018).

Um exemplo de modulação positiva de NRF-2 foi relatado para o vírus da dengue. O DENV ativa preferencialmente a via NRF-2 em células dendríticas derivadas de monócitos humanos primários. Os genes alvo do NRF-2, estimulados por uma infecção por DENV, incluem HO-1, NQO1, SOD2, GCLM e GCLC (OLAGNIER et al., 2014). Outro

estudo mostrou a ativação da via NRF-2 por DENV em fagócitos mononucleares, a proteína DENV NS2B3 demonstrou estar envolvida na indução de estresse no retículo endoplasmático e na ativação da via NRF-2 (CHENG et al., 2016).

Já para o HCV, foi demonstrada uma atividade repressora da via de NRF-2 durante as infecções virais. A proteína Maf, que se liga a NRF-2 no núcleo, estaria deslocalizada através da ligação com a NS3, como consequência, as proteínas Maf se ligariam a NRF-2 fora do núcleo e impediriam a translocação nuclear, prejudicando a expressão dos genes do sistema de defesa antioxidante (CARVAJAL-YEPES et al., 2011). Na Figura 10 é possível observar a repressão de NRF-2 pela proteína NS3 do HCV.

Figura 10: Interferência do HCV na via NRF-2. A proteína NS3 do HCV se liga as proteínas Mafs, deslocalizando-as, com isso NRF-2 se liga às Mafs deslocalizadas no citoplasma, impedindo sua translocação nuclear e, conseqüentemente, a expressão dos genes regulados por ARE.



Fonte: adaptado de BENDER, HILDT, 2019.

Conforme demonstrado, uma variedade de infecções virais foram descritas como causadoras de estresse oxidativo e sua interferência na função normal da célula hospedeira. Com isso, a manutenção de um ambiente favorável é de grande importância para o hospedeiro combater a infecção viral. Estudos vêm sendo conduzidos no sentido

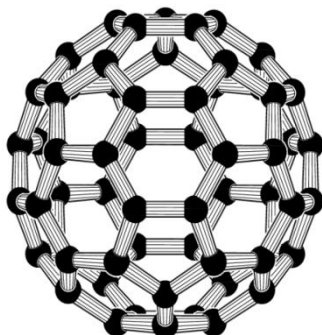
de avaliar o potencial de substâncias com efeitos antioxidantes na terapia de doenças virais (LEE, 2018).

2.4 FULLEROL

Nos últimos anos, nanomateriais de carbono têm despertado grande interesse para diversos campos da medicina, farmacologia e biotecnologia (KOVEL et al., 2019)

Os fulerenos foram descobertos por Kroto e colaboradores em 1985. Constituem uma classe de nanomoléculas esferoidais estáveis, altamente simétricas e formadas somente por carbonos. De maneira oposta a outras formas alotrópicas de carbono, como grafite, diamantes e nanotubos, os fulerenos são formas moleculares de carbono. O representante mais conhecido da classe dos fulerenos é o C_{60} (com 60 átomos de carbono). Possui forma icosaédrica truncada de simetria Ih e 1nm de diâmetro, contém 32 faces, composta por 20 hexágonos e 12 pentágonos responsáveis pela curvatura da molécula (Figura 11) (LADEIRA, 2016).

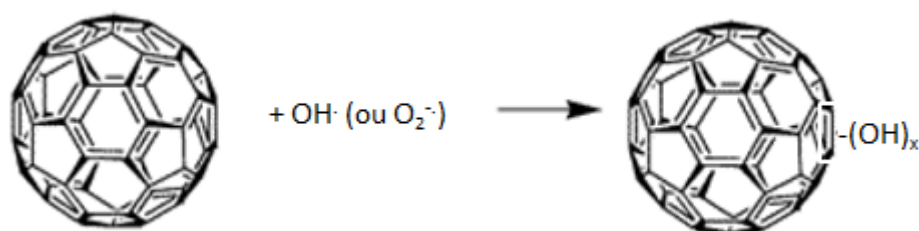
Figura 11: Esquematização da molécula de fulereno. Nanomaterial com 60 átomos de carbono (C_{60}).



Fonte: Wikipédia. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Fulereno>>. Acesso em 17 de dezembro de 2019.

Os fulerenos, além de alta estabilidade química, possuem um grande poder antioxidante pela sua capacidade de complexar e capturar ERO, inativando e inibindo seus efeitos (LADEIRA, 2016). Um esquema ilustrativo da sua ação antioxidante pode ser observado na Figura 12.

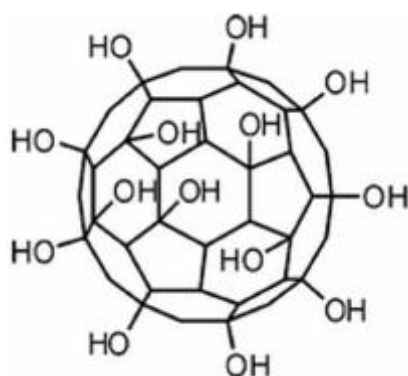
Figura 12: Esquema ilustrativo da reação do fulereno com o radical hidroxila ou ânion superóxido. A bola representa o fulereno reagindo com o radical hidroxila ou o radical superóxido e em seguida mostra o nanomaterial oxidado.



Fonte: adaptado de LADEIRA, 2016.

Entretanto, a aplicação nas áreas biomédicas tem sido limitada devido ao caráter hidrofóbico dessa molécula. Com isso, a funcionalização química dos fulerenos permite além de agregar hidrofiliabilidade ao composto, reduzir da sua citotoxicidade. Uma técnica de funcionalização é a de polihidroxilação dos fulerenos através de ligações de hidroxilas (íons OH⁻) na superfície da molécula, capaz de fornecer alta hidrossolubilidade, sem alterar as propriedades ópticas e eletrônicas das moléculas de fulereno. Esse processo é capaz de adicionar de 22 a 24 hidroxilas gerando o composto fulerol (Figura 13) (LADEIRA, 2016).

Figura 13: Esquematização hipotética da molécula de fulerol (C₆₀(OH)₂₂₋₂₄). Nanomaterial com 60 átomos de carbono ligado a 22-24 moléculas de hidroxila.



Fonte: KOVEL et al., 2019.

Vários estudos têm utilizado o fulerol no contexto de aplicações biológicas, alguns exemplos são:

- i) Redução dos níveis de ERO em cultura de neurônios corticais, contribuindo para a redução da toxicidade e consequentes danos aos tecidos neuronais,

podendo ser utilizado como um potencial fármaco contra doenças neurodegenerativas, como o mal de Parkinson e Alzheimer (DUGAN et al., 1996);

- ii) Durante a isquemia, uma grande quantidade de radicais superóxido é produzido, estudos *in vivo* mostraram o potencial antioxidante do fulerol e sua capacidade em reduzir as concentrações de ERO e, conseqüentemente, os danos gerados durante o processo de isquemia e reperfusão (LAI et al., 2000);
- iii) Redução do processo de lipoperoxidação durante cardiotoxicidade aguda ao restabelecer a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx) para seus níveis basais (TORRES et al., 2010);
- iv) Inibição da adipogênese e melhora da osteogênese de células tronco através da eliminação de espécies reativas celulares de oxigênio, indicando seu potencial para prevenção e tratamento da osteonecrose induzida por corticosteroides (LIU et al., 2012).

Dessa forma, uma vez que o estresse oxidativo está relacionado diretamente com as infecções virais, o presente trabalho teve como intuito avaliar o efeito antioxidante do fulerol durante a multiplicação do ZIKV.

3. JUSTIFICATIVA

A Febre Zika é uma doença emergente de grande importância na saúde pública devido a sua associação com síndromes congênitas e a síndrome de Guillain-Barré. O número de casos registrados caiu de forma significativa após a epidemia de 2016, porém, um estudo divulgado neste mesmo ano demonstrou que uma nova epidemia pode ocorrer em dez anos, devido à queda da proteção por imunidade rebanho. Até o momento não há tratamentos antivirais ou vacinas disponíveis, com isso, o desenvolvimento de drogas capazes de combater ou minimizar a infecção é fundamental.

Como já foi demonstrado anteriormente, a progressão da infecção viral, assim como sua patogênese está associada ao aumento de espécies reativas e ao desequilíbrio da homeostase redox celular, com isso, o tratamento com agentes antioxidantes se torna uma alternativa promissora no combate da infecção.

Dessa forma, o presente trabalho busca avaliar a atividade antioxidante do fulerol, um potente sequestrador de espécies reativas, no contexto de infecções pelo ZIKV.

4. OBJETIVOS

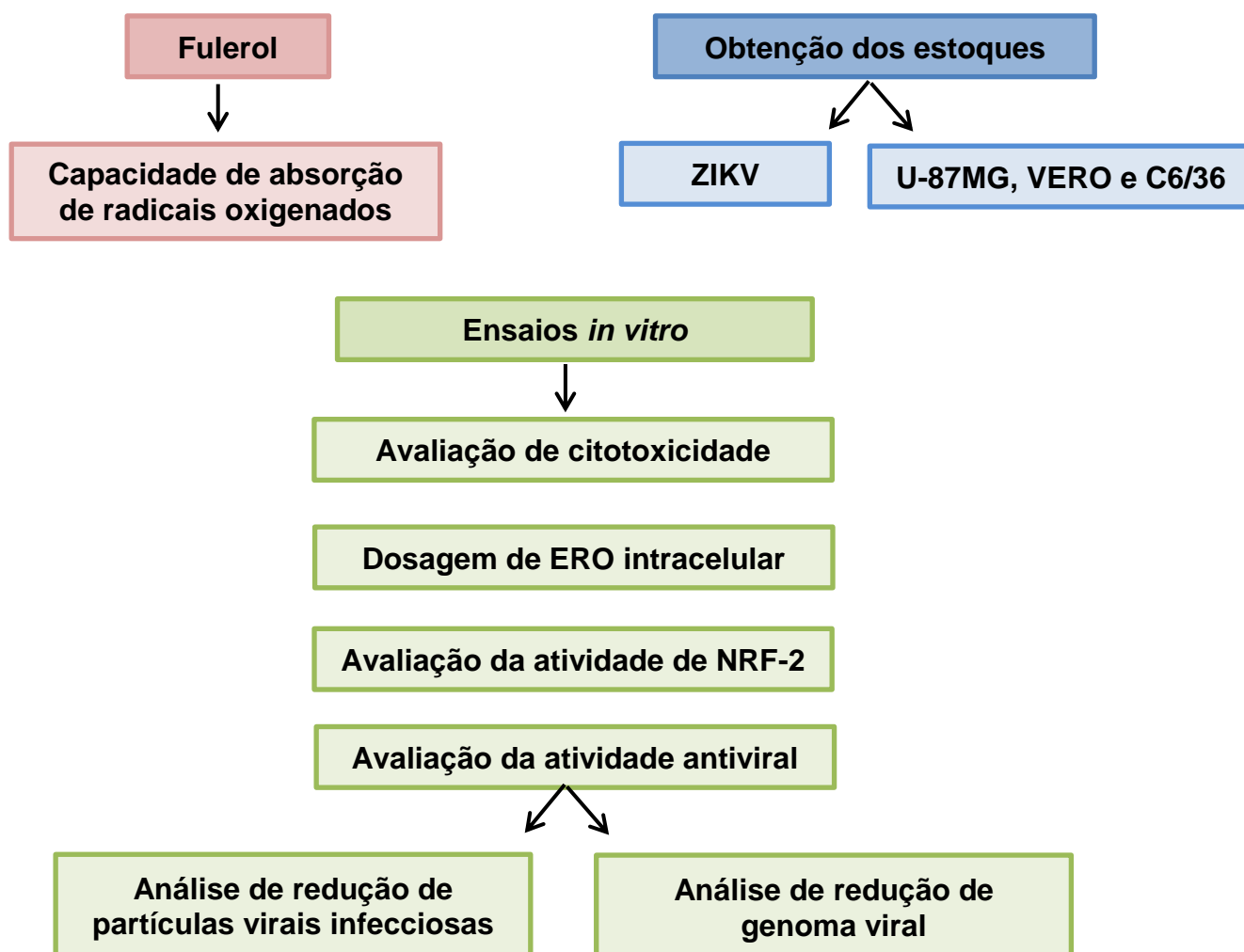
4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antioxidante do fulerol em infecções causadas pelo ZIKV em células neuronais U-87MG.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a citotoxicidade do fulerol.
2. Determinar o potencial antioxidante do fulerol a partir da sua capacidade de absorção de radicais.
3. Investigar a capacidade do fulerol em restabelecer o estado redox celular durante a infecção pelo ZIKV.
4. Analisar a atividade antiviral do fulerol em infecções pelo ZIKV.

5. METODOLOGIA



5.1 FULEROL

O fulerol ($C_{60}OH_{22-24}$) foi sintetizado a partir do processo de polihidroxilação do fulereno (C_{60}) com o intuito de tornar esta nanoestrutura hidrossolúvel, apresentando menor citotoxicidade quando comparado ao fulereno puro. O composto foi sintetizado e fornecido gentilmente pela colaboradora Dra. Marina de Souza Ladeira do Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física (UFMG). O composto liofilizado foi diluído em água para injeção para uma concentração estoque de 1 mM e foi colocado em banho ultrassônico por 30 minutos. As alíquotas foram armazenadas ao abrigo da luz, por se tratar de um composto fotossensível, à $-80^{\circ}C$. Antes do uso, as alíquotas eram novamente colocadas em banho ultrassônico.

5.2 CÉLULAS, VÍRUS E PLASMÍDEOS

5.2.1 CÉLULAS VERO, U-87MG E C6/36

Células da linhagem C6/36, aderentes, isoladas da larva de mosquitos (*Aedes albopictus*), obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC), foram cultivadas em meio Leibowitz (L-15, Sigma-Aldrich), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e com os antibióticos estreptomicina/penicilina (200 U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). Essa linhagem celular foi empregada para multiplicação do ZIKV, célula comumente utilizada para multiplicação deste vírus devido a sua permissividade e susceptibilidade (BARRETO-VIEIRA et al., 2017).

Células da linhagem Vero, aderentes, isoladas do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de SFB (Gibco) e com os antibióticos estreptomicina/penicilina (200 U/mL, Sigma-Aldrich) e anfotericina B (2,5 µg/mL, Sigma-Aldrich). Essa linhagem celular foi aplicada para avaliação do efeito citotóxico do fulerol e para as titulações virais.

Células da linhagem U-87MG, aderentes, isoladas do cérebro de um paciente humano (*Homo sapiens*) com possível glioblastoma, obtidas da ATCC, foram cultivadas em meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) com alto nível de glicose, suplementado com 10% de SFB e com os antibióticos estreptomicina/penicilina (200U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). Essas células foram utilizadas para avaliação de efeito citotóxico, avaliação da atividade antioxidante e antiviral do fulerol, o uso dessa linhagem se torna relevante para essas investigações devido ao tropismo do vírus pelo sistema nervoso, além dessa linhagem celular glial responder a infecção pelo ZIKV em termos de inflamação (IL-1β, NLRP-3 e CASP-1), estresse oxidativo (SOD2 e HO-1) e morte celular (TRICARITO et al., 2017).

As linhagens celulares Vero e U-87MG, como recomendando pelo banco de células, foram mantidas em estufa de atmosfera umidificada, a 37°C e 5% de CO₂. A linhagem C6/36 foi mantida em estufa de Demanda Biológica de Oxigênio (BOD) a 28°C. Para manutenção, estas células eram repicadas aproximadamente a cada 3 dias, as garrafas contendo as células eram lavadas com tampão salino-fosfato (PBS) (10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 3mM KCl, pH 7,2) e desprendidas da

monocamada celular enzimaticamente por ação da tripsina. Uma parte das células era mantida com adição de novo meio de cultura.

O estoque celular foi preparado a partir de um *pool* de células com adição de 10% de DMSO, 20% de SFB e 70% de meio de cultura para as células Vero e com adição de 10% de DMSO e 90% de SFB para as células U-87MG e C6/36. Em seguida, as soluções celulares foram aliquoteadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido, cada criotubo contendo cerca de 5×10^6 células..

5.2.2 ORIGEM E MULTIPLICAÇÃO DO ZIKV

A amostra de ZIKV (ZIKA/*H. sapiens*/Brazil/PE-243/215/GenBank:KX197192), obtida de um paciente com quadro clínico sem complicações, no estado de Pernambuco – Brasil, foi gentilmente cedida pela professora Dra. Erna Geessien Kroon do Laboratório de Vírus (UFMG) (SisGen acess AF85085). Para produção dos estoques, uma garrafa média (182cm^2) contendo células C6/36 semi-confluentes foi preparada e adicionou-se o ZIKV com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 vírus/célula. A garrafa foi incubada por 1 hora na estufa para adsorção viral, sendo delicadamente agitada a cada 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado meio de cultura suplementado com 1% de SFB a garrafa. Após 7 dias, o meio celular foi coletado e centrifugado para clarificação por 5 minutos a 4°C a 3000g . O sobrenadante foi coletado, aliquoteado em microtubos e armazenado a -80°C .

5.2.3 TITULAÇÃO VIRAL

A titulação viral foi realizada a partir do método de contagem de placas de Dulbecco (1952). Esse método consiste na produção de placas de lise em meio de cultura semissólido.

Foram preparadas placas de 6 poços (1×10^6 células/poço) com células Vero. Um poço foi reservado para controle celular negativo e aos outros 5 poços foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de diluições seriadas de ZIKV, preparadas em meio RPMI 0% SFB. A placa foi mantida durante uma hora na estufa para adsorção do vírus, com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, a suspensão viral foi removida e foram adicionados 2 mL de meio RPMI 2,5% SFB acrescido de carboximetilcelulose (CMC) a 1,5%. Após 72 horas, foram adicionado aos poços formol 10% por 30 minutos para fixação das células. Logo após, a

placa foi lavada com água corrente e a monocamada celular foi corada com cristal violeta (20% etanol e 1% cristal violeta) (DULBECCO, 1952). O título viral foi expresso pelo número de unidades formadoras de placas (UFP), obtido pela contagem de placas de lise no poço em que a diluição viral apresentava entre 30 e 300 placas, multiplicado pelo inverso da diluição e convertido para mL, como pode ser observado na equação 5:

$$\text{Título viral (UFP/mL)} = n \times fc \times 10^d \quad (5)$$

onde, **n** é o número de placas de lise, **fc** o fator de correção para mL e **d** o inverso da diluição.

5.2.4 PLASMÍDEOS

Para avaliação da modulação da atividade transcricional NRF-2/ARE foi utilizado o plasmídeo pGL4.37 [*luc2P* / ARE / Hygro] (PROMEGA) (anexo). Este vetor possui quatro cópias do elemento de resposta antioxidante (ARE) que conduz a transcrição do gene repórter *luc2P* (luciferase do vagalume), este gene contém uma sequência de desestabilização de proteínas, a qual confere instabilidade a enzima, resultando na degradação mais rápida e, conseqüentemente, um menor acúmulo dentro da célula, permitindo identificar com precisão o período em que a célula está com a atividade transcricional ativa dentro do contexto experimental.

O plasmídeo pRL.TK (PROMEGA) (anexo) foi utilizado como vetor controle do ensaio de dual-luciferase. Este vetor possui expressão constitutiva da luciferase *Renilla* que fornece um valor de controle interno para o qual a expressão do gene repórter experimental da luciferase do vagalume pode ser normalizada.

Estes vetores possuem o gene de resistência à ampicilina para posterior seleção.

5.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Antes da realização dos ensaios com fulerol, foi avaliado se as concentrações de trabalho seriam citotóxicas. Para esta avaliação, células Vero e U-87MG foram distribuídas em placas de 96 poços (5×10^4 células/poços) e incubadas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, o meio foi retirado e adicionaram-se às células o fulerol diluído em meio de cultura, nas concentrações de [1560, 780, 390, 195, 98, 49,

24,5, 12,25] em células Vero e [1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5] para as células U-87MG. As placas foram mantidas sob as mesmas condições por 48 horas. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado 25 µL de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5 – difeniltetrazol (MTT) (2 mg/mL) por poço, seguindo de incubação por 90 minutos. Posteriormente, foi adicionado 130 µL do solvente DMSO por poço. As placas foram colocadas sob agitação por 15 minutos. A quantidade de formazan gerado foi mensurada através da leitura da absorbância a 490 nm no leitor de placas Victor X3 (PerkinElmer). O composto MTT é reduzido pelas células viáveis com metabolismo ativo, sendo convertido em cristais com coloração roxa (formazan), enquanto células não viáveis não são capazes de realizar essa conversão. O formazan é insolúvel e se concentra próximo à parede celular e para isso é adicionado DMSO que é capaz de dissolver estes cristais. Dessa forma, a viabilidade celular é mensurada de forma indireta a partir da quantificação de formazan produzido (MOSMANN, 1983).

A viabilidade celular foi determinada pela porcentagem de células viáveis tratadas com o fulerol em relação ao controle de células (sem tratamento).

5.4 ENSAIO DE CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE RADICAIS OXIGENADOS

Para determinar a capacidade antioxidante do composto, foi realizado o ensaio de ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), no qual o radical peroxil produzido pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2-azobis (2-amidinopropano)] com oxigênio atmosférico, reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, o qual é mensurado pelo decaimento espectrofotométrico da fluorescência no composto. Foi preparada uma curva de trolox (6-hidroxi-2,5,7,8- ácido tetrametilcromano-2-carboxílico) para calibração. As concentrações utilizadas foram de 10, 20, 30 e 40 µM, a partir de uma solução mãe de 8M diluída PBS (75 mM, pH 7,0). Adicionou-se a uma placa branca de 96 poços as concentrações de fulerol [400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 nM] e, logo após, foi acrescentada a sonda fluorescente fluoresceína (78 nM) dissolvida em PBS. Após 15 minutos de incubação a 37°C, o radical AAPH a uma concentração de 221 mM foi adicionado. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de placas Victor X3 a 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão) a cada minuto durante 1 hora. Os valores do ORAC foram determinados pela área líquida sob a curva (AUC) do padrão e amostra. A curva padrão foi obtida ao traçar as concentrações de Trolox contra a AUC líquida das concentrações do fulerol. Os valores ORAC finais foram calculados usando a equação de

regressão entre a concentração de trolox e a AUC líquida e são expressas como equivalentes de μM de trolox por litro (adaptado CAO et al., 1993, HUANG et al., 2002; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; SILVA et al., 2007).

5.5 ENSAIO DE DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A produção de ERO intracelular foi medida utilizando o kit *Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species* (Invitrogen). A metodologia emprega um marcador fluorogênico (5-ou-6)-carboxy-2',7' diacetato de diclorodi-hidro fluoresceína (carboxy- H_2DCFDA), que quando quebrado por esterases intracelulares não específicas gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as ERO, preferencialmente com H_2O_2 , tornando-se fluorescente.

A dosagem de ERO foi realizada a partir do preparo de uma placa branca de 96 poços ($2,5 \times 10^4$ células/poço) com células U-87MG e incubada por 40 minutos. Após a incubação o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão HBSS [0,4 g/L KCl; 0,09 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,06 g/L KH_2PO_4 ; 0,14 g/L CaCl_2 ; 0,10 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,0 g/L $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_{12}$; 0,35 g/L NaHCO_3 ; 8g NaCl; q.s.p H_2O milli-Q]. Logo após, adicionou-se o fulerol [100, 50, 25, 12,5, 6,25 nM] e o ZIKV (MOI 1), sendo 8 poços de controle de células, 8 poços de células infectadas com ZIKV e 8 poços de células infectadas com ZIKV e tratadas com o fulerol, seguido de incubação por 24 horas. Posteriormente, a placa foi lavada com o tampão HBSS e foi adicionada a sonda Carboxy- H_2DCFDA (25 μM) por 45 minutos. Após a incubação, descartou-se a sonda, lavou-se a placa novamente com HBSS e adicionou-se meio sem vermelho de fenol. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de placas Victor X3 a 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão) (CAMINI et al., 2018).

5.6 ENSAIO DE ATIVIDADE DO ELEMENTO DE RESPOSTA ANTIOXIDANTE

5.6.1 PREPARO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

Bactérias *E. coli* ultracompetentes XL10 gold (Stratagene) foram inoculadas em 50 mL de caldo Luria Bertani (LB) *overnight* a 37°C sob agitação de 180 rpm. Após a incubação, 0,5 mL da cultura bacteriana foi adicionada a 50 mL de meio A [caldo LB (10g/L triptona, 10 g/L NaCl, 5 g/L extrato de levedura) suplementado com 10 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,2% de glicose] e incubadas sob as mesmas condições até atingirem a

fase logarítmica ($A_{600}=0,4$). As células foram mantidas por 10 minutos no gelo e, em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 1500g a 4°C. As células foram cuidadosamente ressuspensas em 0,5 mL de meio A gelado e acrescentou-se 2,5 mL de meio B [caldo LB suplementado com 36% glicerina, 12% PEG, 12 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, (esterilizado por filtração)]. As células foram alíquotadas e armazenadas a -80°C (NISHIMURA et al, 1990).

5.6.2 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO

Uma alíquota contendo 100 μ L de bactéria competente (item 5.6.1) foi descongelada e foi adicionado 500 ng de plasmídeo. O microtubo foi incubado por 10 minutos no gelo e, imediatamente, foi colocado a 42°C por 45 segundos e novamente no gelo por 2 minutos. A diferença de temperatura induz à formação de poros na membrana plasmática da bactéria permitindo a entrada do plasmídeo intracelularmente. A seguir, foram adicionados 900 μ L de meio LB e incubou-se a 37°C sob agitação de 180 rpm por 60 minutos. Após este período, 100 μ L da suspensão bacteriana foram semeadas em uma placa de Petri contendo meio LB ágar com adição de 100 μ g/mL de ampicilina para seleção das bactérias transformadas (CALVETE, CASEIRO, SOUZA, 2015).

5.6.3 PURIFICAÇÃO PLASMIDIAL

Para purificação plasmidial foi selecionada uma colônia de bactéria da placa de Petri contendo o meio com antibiótico. A colônia foi inoculada em 50 mL de meio caldo LB com 100 μ g/mL de ampicilina *overnight*.

A extração foi realizada utilizando o kit *PureYield Plasmid DNA Purification System* (Promega), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este kit permite a purificação plasmidial com remoção de endotoxinas, sendo ideal para o uso em transfecções celulares.

A extração foi realizada conforme orientação do fabricante. Para isso, a cultura bacteriana foi centrifugada por 10 minutos a 1500g, o pellet foi ressuspensado em 3 mL da solução de ressuspensão celular. Logo após, foram adicionados 3 mL de solução de lise celular, invertendo suavemente por 5 vezes o tubo, seguido de incubação por 3 minutos. Sobre o lisado celular foi acrescido 3 mL de solução de neutralização. A solução foi filtrada com a *Clearing Column* acoplada a um tubo de 50 mL, o tubo foi centrifugado por

5 minutos a 1500g. Logo após, o filtrado foi colocado na *Binding Column* acoplada a um tubo de 50 mL e novamente centrifugado. Foram adicionados 5 mL de solução de lavagem para remoção de endotoxinas e novamente centrifugado. Adicionou-se 20 mL de solução de lavagem na coluna e novamente a coluna foi centrifugada. Para eluição do DNA plasmidial a coluna foi acoplada a um novo tubo e adicionou-se 600µL de água livre de nucleases. As alíquotas foram armazenadas a -80°C.

5.6.4 TRANSFEÇÃO CELULAR

A transfecção celular foi realizada utilizando o kit de *Lipofectamine 3000* (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Esse kit proporciona uma eficiência de 70% através do uso de nanopartículas lipídicas para entrega do DNA plasmidial. Foi preparada uma placa de 24 poços ($2,5 \times 10^5$ células/poço) contendo células U-87MG em meio OptiMEM (Gibco). Para cada reação foi diluído 0,75 µL do reagente Lipofectamine 3000 em 25 µL de meio OptiMEM. Em outro microtubo foi adicionado 1 µL de reagente P300, 500 ng de DNA e 25 µL de meio OptiMEM. O conteúdo do primeiro tubo foi acrescentado ao segundo e incubou-se a mistura por 15 minutos. O conteúdo de cada reação foi adicionado aos poços contendo as células e incubou-as por 24 horas.

5.6.5 ADIÇÃO DO VÍRUS E TRATAMENTO

Após a incubação das células, o meio contendo os reagentes de transfecção foi descartado e foi acrescido meio contendo o fulerol nas concentrações [12,5 e 6,25 nM] durante 0, 2 e 3 horas antes da infecção. Após o tempo de pré-tratamento foi adicionado o ZIKV (MOI 1) por 12 e 24 horas, sendo que 9 poços foram utilizados como controle celular e 9 poços para cada concentração de fulerol, tempo de pré-tratamento e tempo pós-infecção.

5.6.6 ENSAIO DE DUAL-LUCIFERASE

O ensaio de luciferase foi realizado utilizando o kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Este kit permite a dosagem de duas enzimas, luciferase do vagalume e de *Renilla sp.* a partir de uma única amostra. Neste ensaio foi avaliada a atividade do fator de transcrição NRF-2/ARE.

O meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS. Foram adicionados a cada poço 100 µL de solução de lise e a placa permaneceu sob agitação por 15 minutos. O luminômetro (Sirius – Titertek Berthold) foi programado para um atraso de leitura de 2 segundos, seguido de duas leituras de 10 segundos. A cada tubo foram adicionados 20 µL de lisado celular e 100 µL da solução LARII, que fornece o substrato para a enzima luciferase do vagalume (luciferina), após a primeira leitura adicionou-se o reagente StopGlo, que inativa a enzima da luciferase do vagalume e fornece o substrato da enzima luciferase de *Renilla sp.* Para normalização dos resultados, os valores obtidos na primeira leitura foram divididos pelo resultado da segunda leitura.

5.7 ENSAIO DE ATIVIDADE ANTIVIRAL

5.7.1 ENSAIO DE REDUÇÃO DE PARTÍCULAS VIRAIS INFECCIOSAS

Placas de 96 poços (5×10^4 células/poço) foram preparadas com células U-87MG. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Logo após, as células foram pré-tratadas com fulerol diluído em meio de cultura por 0, 2 e 3 horas nas concentrações de 6,25 e 12,5 nM. Após o pré-tratamento foi adicionada uma suspensão viral de ZIKV com MOI de 1 e as placas foram incubadas por 24 horas. Posteriormente à incubação, o sobrenadante das células foi coletado. Em seguida, o sobrenadante das células foi titulado em placas de 12 poços contendo células Vero, conforme item 5.2.3, sendo que cada placa foi destinada a uma concentração de fulerol (12,5 e 6,25 nM) em diluições (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Em cada placa, um poço foi destinado ao controle de células (CC; não tratado e não infectado), dois controles virais (CV; infectado e não tratado) e três poços para cada pré-tratamento com fulerol e adição de vírus (FV; infectado e tratado).

5.7.2 ENSAIO DE REDUÇÃO DE GENOMA VIRAL

Placas de 12 poços (5×10^5 células/poço) foram preparadas com células U-87MG. Após 24 horas, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Logo após, foi adicionada uma suspensão viral de ZIKV com MOI de 1 e o fulerol diluído em meio de cultura nas concentrações de 6,25 e 12,5 nM, as placas foram incubadas por 24 horas.

5.7.2.1 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para extração de RNA total foi utilizado o kit *SV TOTAL RNA ISOLATION SYSTEM* (Promega). As células foram lavadas com PBS gelado, tripsinizadas e coletadas por centrifugação a 500g por 5 minutos. Logo após, as células foram ressuspendidas em 175 µL de tampão de lise celular. Foram adicionados 350 µL de tampão de diluição de RNA a 175 µL de lisado e incubou-se no termo bloco a 70°C por 3 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14.000g por 10 minutos. O lisado foi então transferido para um novo microtubo e foi adicionado 200 µL de etanol a 95%. O conteúdo do microtubo foi transferido para uma coluna de filtração e centrifugou-se a 14.000g por 1 minuto. Foi adicionado a coluna 600 µL de solução de lavagem de RNA e centrifugou-se novamente por 1 minuto. Uma mistura contendo DNase, tampão e MnCl₂ foi preparada e pipetada cuidadosamente na coluna e incubou-se a temperatura ambiente. Após a incubação, adicionou-se 200 µL de DNase Stop Solution na coluna e centrifugou-se a 14.000g por 1 minuto. O RNA foi eluído em 100 µL de água livre de nuclease e armazenado em freezer - 80°C.

5.7.2.2 qRT-PCR

Para quantificar o nível de genoma viral foi utilizada PCR em tempo real pelo kit TaqMan® qRT-PCR, usando o sistema qRT-PCR de uma etapa GoTaq® Probe 1 (Step) (Promega). Os qRT-PCRs foram realizados com o sistema de PCR em tempo real Thermocycler 7500 (Applied Biosystems). A concentração de RNA viral (cópias/mL) foi estimada utilizando uma curva padrão. A curva padrão foi preparada em duplicatas, realizando diluições seriadas de 1:10 de gDNA (ZIKV gBlock) dos pontos 3.000.000, 300.000, 30.000, 3.000, 300 e 30 cópias. A sequência do gBlock utilizada pode ser observada na Tabela 3 e as diluições realizadas para o preparo da curva padrão na Tabela 4.

Tabela 3: Sequência do gBlock de ZIKV utilizado como modelo para curva padrão de qRT-PCR para quantificação viral.

gBlock ZIKV	GTTGTAAAACGACGGCCAGTAGGACYAGAGGTTAGAGGAG ACCCCCCGCACAACAACAAACAGCATATTGACGCTGGGAR AGACCAGAGATCCTGCTGTCTCTACAGCATCAWTCCAGGC ACAGARCGiTCGACGCGCCCTCTTTAACGGACATGTCATGC GAGGTACCAGCCTGCACCCATTCTCAGACTTTGGGGGCG TCGCCATTATTAATATGCAGTCAGCAAGAAAGGCAAGTGT GCGGTGCATTTCGATCCGCTGCCCAACACAAGGTGAAGCCT ACCTTGACAAGCAATCAGACACTCAATATGTCTGCAAAAGA ACGTTAGTGGGGTCATAGCTGTTTCCTGTG
-------------	--

Fonte: o autor.

Tabela 4: Preparação da curva padrão a partir da diluição do gBlock de ZIKV.

Diluição	Fonte do DNA	[Inicial] (g/μL)	DNA (μL)	Água (μL)	Vol final (μL)	[Final] (g/μL)	Nº de cópia/3μL
1	Estoque	1,24x10 ⁻⁸	10	990	1000	1,24x10 ⁻¹⁰	N/A
2	Diluição 1	1,24x10 ⁻¹⁰	10	990	1000	1,24x10 ⁻¹²	N/A
3	Diluição 2	1,24x10 ⁻¹²	31,45	58,55	100	3,9x10 ⁻¹³	3.000.000
4	Diluição 3	1,24x10 ⁻¹³	10	90	100	3,9x10 ⁻¹⁴	300.000
5	Diluição 4	1,24x10 ⁻¹⁴	10	90	100	3,9x10 ⁻¹⁵	30.000
6	Diluição 5	1,24x10 ⁻¹⁵	10	90	100	3,9x10 ⁻¹⁶	3.000
7	Diluição 6	1,24x10 ⁻¹⁶	10	90	100	3,9x10 ⁻¹⁷	300
8	Diluição 7	1,24x10 ⁻¹⁷	10	90	100	3,9x10 ⁻¹⁸	30

Fonte: o autor.

O conjunto de Primers/Probe em tempo real, específico para ZIKV, foi sintetizado pelo IDT (Integrated DNA Technologies, Brasil) usando a sequência relatada no estudo de Lanciotti (2008). Utilizou-se uma sonda de dupla têmpera TaqMan (5'FAM / ZEN / 3'AbkFQ) com dois extintores, ZEN e AbkFQ e o repórter da FAM. Na Tabela 5 é possível observar as sequências dos iniciadores e da sonda.

Tabela 5: Sequência dos iniciadores e sonda para o qRT-PCR de ZIKV.

Nome	Sequência
qZIKV-FOW	CCG CTG CCC AAC ACA AG
qZIKV-REV	CCA CTA ACG TTC TTT TGC AGA CAT
qZIKV-Probe	/56-FAM/AGC CTA CCT /ZEN/TGA CAA GCA GTC AGA CAC TCA A/3ABkFQ/

Fonte: o autor.

A montagem da reação de qRT-PCR foi realizada a partir das condições estabelecidas na Tabela 6 e 7, conforme orientação do fabricante.

Tabela 6: Mistura de reação para preparação do qRT-PCR com volume final de 20 µL.

Reagente	[final]	Volume (µL)
GoTaq Probe qPCR Master Mix (2X)	1X	10
GoScript RT Mix for 1-Step RT-qPCR (50X)	1X	0,4
Primer Forward (18 µM)	900nM	1,0
Primer Reverse (18 µM)	900nM	1,0
Probe (5 µM)	250	1,0
RNA	50 ng	3,0
Água livre de nuclease	-	3,6

Fonte: o autor.

Tabela 7: Condições da reação de qRT-PCR.

Programa TaqMan 7500	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Ciclos
Transcrição reversa	45	15	1
Inativação da transcrição reversa e ativação da GoTaq® DNA polimerase	95	2	1
Desnaturação	95	0,25	40
Anelamento	60	1	

Fonte: o autor.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

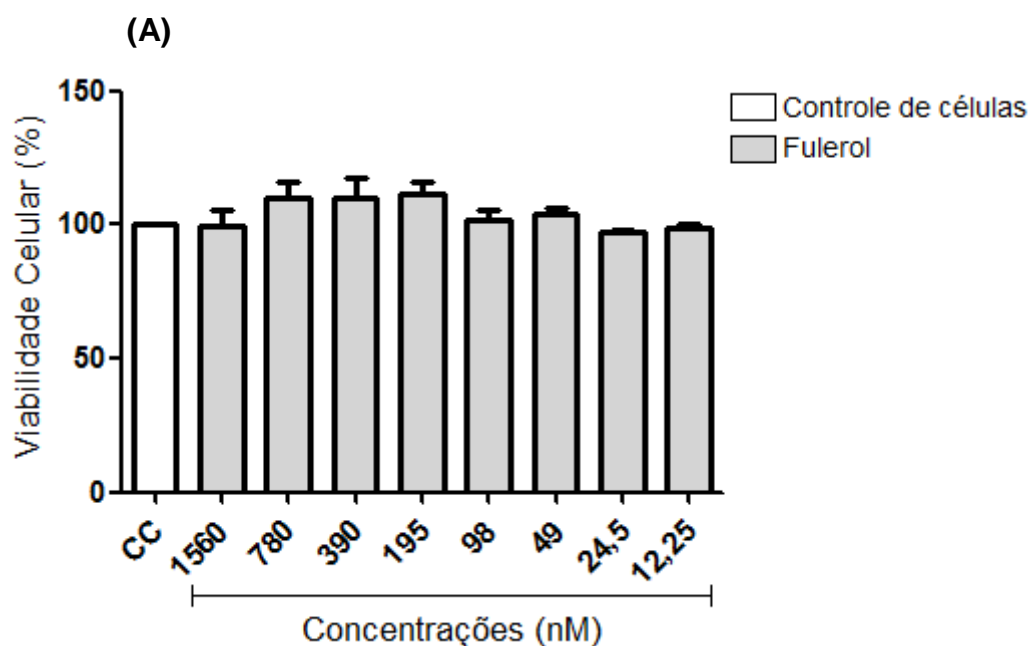
6.1 MULTIPLICAÇÃO E TITULAÇÃO DO ZIKV

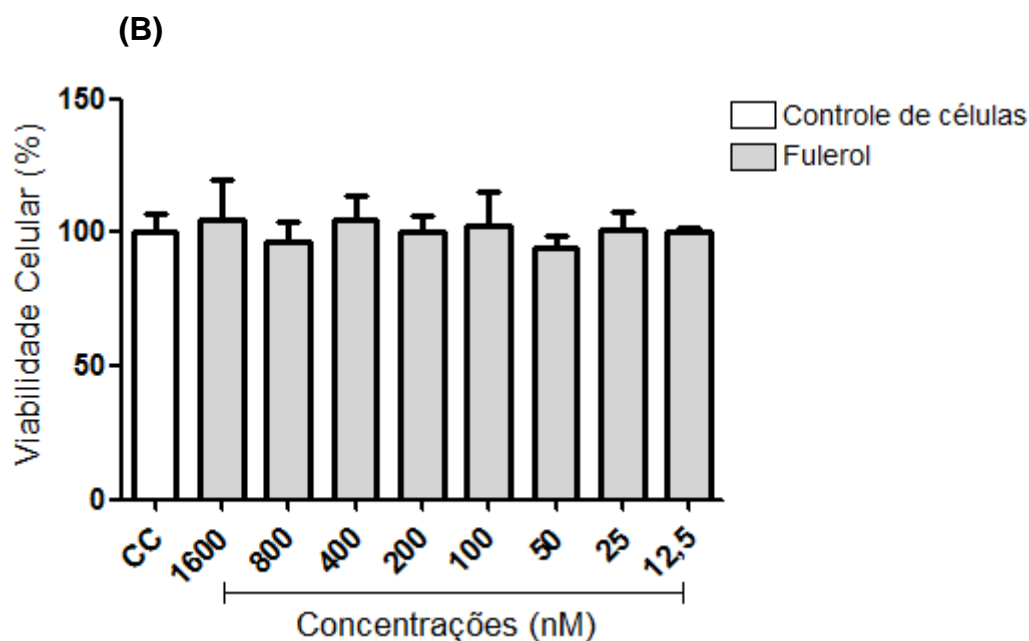
Após a multiplicação do ZIKV em células C6/36, linhagem de células permissível e susceptível a esse vírus, o sobrenadante celular foi coletado e clarificado. O título viral, determinado a partir da equação (1), foi de 5×10^{10} UFP/mL.

6.2 ANÁLISE DO EFEITO CITOTÓXICO DO FULEROL EM CÉLULAS VERO E U-87MG

O ensaio de citotoxicidade foi empregado na fase inicial de desenvolvimento do trabalho a fim de determinar os danos celulares causados pelo composto e a definir as concentrações de trabalho. A viabilidade celular das células Vero e U-87MG, após tratamento com o fullerol, podem ser observadas na Figura 14.

Figura 14: Viabilidade celular por MTT após tratamento com o fullerol por 48 horas. (A) As células Vero foram tratadas com fullerol nas concentrações de 1560, 780, 390, 195, 98, 49, 24,5 e 12,25 nM. (B) As células U-87MG foram tratadas com fullerol nas concentrações de 1600, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 nM. Após 48 horas avaliou-se a citotoxicidade pelo ensaio colorimétrico de MTT. As células tratadas não apresentaram diferença estatística em relação ao controle para $p < 0,05$, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.





Fonte: o autor.

O fulerol não apresentou citotoxicidade nas células Vero e U-87MG para as concentrações testadas, uma vez que a viabilidade celular dos poços tratados não apresentou diferença estatística em relação ao controle celular. Esse resultado condiz com dados encontrados na literatura, em que Yang et al. (2014) testaram concentrações de até 10.000 nM de fulerol em células primárias de disco intervertebral e não relataram efeito citotóxico. Voronov et al. (2018) avaliaram concentrações de fulerol de 250 µg/mL (~243.000 nM) em células estromais mesenquimais, também não apresentando citotoxicidade. Injac et al. (2008) demonstraram que o fulerol não apresenta citotoxicidade em células HepG2 para a maior concentração testada (44 µg/mL ~ 42.000 nM). Ainda, Ramos (2014) demonstrou que para concentrações de até 0,12 mg/mL (~166.000 nM) o fulerol não apresentou efeito citotóxico em macrófagos de cultura primária.

A partir desse resultado foi possível determinar que as concentrações de interesse poderiam ser utilizadas sem causar danos celulares que levassem à perda do metabolismo celular.

6.3 ANÁLISE DA CAPACIDADE DE ABSORÇÃO DE RADICAIS OXIGENADOS DO FULEROL

O ensaio de capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC) pelo fulerol foi realizado a fim de determinar as concentrações com maior potencial antioxidante.

A partir desse método simples e sensível foi possível se medir a capacidade do fulerol em sequestrar radicais peróxido gerados a partir da fonte radicalar AAPH a 37°C e os valores de fluorescência obtidos foram calibrados a partir de uma curva padrão de trolox (CAO et al., 1993). Para isso foram testadas algumas concentrações candidatas a fim de se determinar aquela que possuía maior potencial antioxidante. Os valores encontrados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Quantificação da capacidade de absorção de radicais oxigenados (ORAC) do fulerol em equivalentes de Trolox.

Concentração de Fulerol (nM)	ORAC (μMET/mL)
400	0,025
200	5,125
100	8,5
50	18,25
25	136,25
12,5	372,5
6,25	430

Fonte: o autor.

Os resultados são expressos por equivalentes de trolox, ou seja, correspondeu à quantidade de trolox em μM que tem a mesma atividade antioxidante de um mililitro da solução testada. Com isso, quanto maior o valor de ORAC obtido, maior a atividade de sequestro de espécies reativas pelo composto (CAO et al., 1993).

Como pode ser observado, as menores concentrações testadas apresentaram maior capacidade de absorção de radicais oxigenados, o que já era esperado, uma vez que em maiores concentrações pode ocorrer a formação de cristais a partir da aglomeração do fulerol, fazendo com que ele perca seu potencial de sequestro de espécies reativas (VRANES et al., 2017; KOVAC et al., 2018).

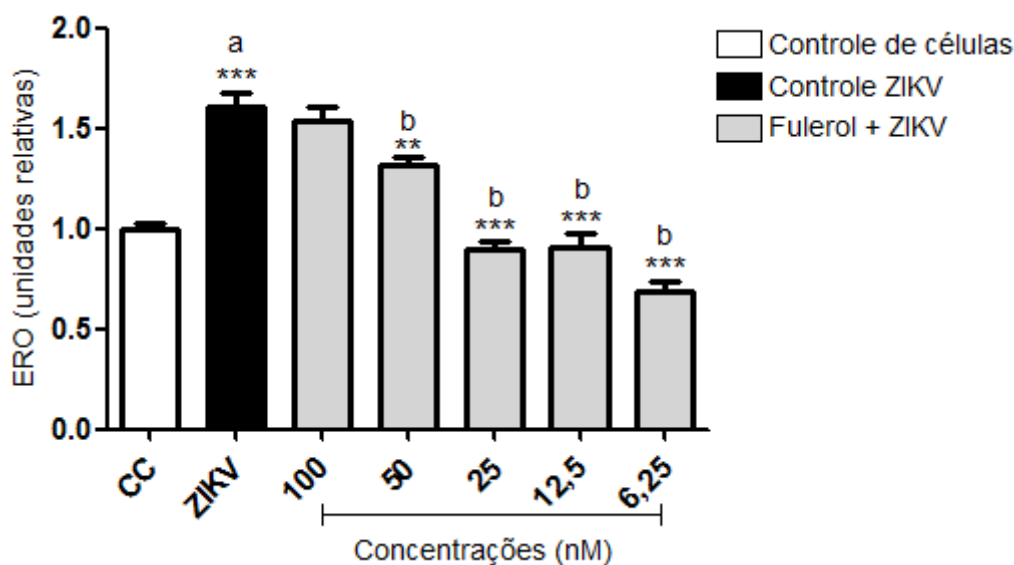
Além disso, os valores de ORAC obtidos foram muito relevantes quando comparados na literatura com obtidos para diferentes compostos. Um exemplo é de substâncias que foram testados como antioxidantes contra o vírus da chikungunya, os valores de ORAC obtidos para essas substâncias foram semelhantes aos obtidos para o fulerol (LEDOUX et al., 2018). Para nanotubos de carbono, foram demonstrados valores de ORAC de 0,17-5,02 em equivalentes de trolox, valores inferiores comparados ao fulerol (SHULTZ et al., 2009).

Considerando o resultado obtido foi possível inferir o potencial antioxidante do fulerol e as concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 nM foram selecionadas para dar continuidade aos experimentos, uma vez que foram nessas concentrações que se encontraram valores de ORAC mais efetivos.

6.4 EFEITO DA PRODUÇÃO DE ERO APÓS TRATAMENTO COM FULEROL

Após a determinação do potencial antioxidante do fulerol, realizou-se o ensaio de dosagem de ERO para avaliar se este teria atividade antioxidante frente a infecções pelo ZIKV. Para isso, as células U-87MG foram infectadas com ZIKV (MOI 1) e tratadas com o fulerol por 24 horas. O efeito na produção de ERO pode ser observado na Figura 15.

Figura 15: Efeito na produção de ERO em células U-87 MG infectadas com ZIKV após tratamento com fulerol. As células U-87MG foram infectadas com ZIKV (MOI 1) com adição de meio de cultura contendo 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 nM de fulerol. Após 24 horas adicionou-se a sonda carboxi-H2DCFDA e mediu-se a intensidade de fluorescência. Onde 'a' representa a diferença estatística entre o controle de células e as células infectadas com ZIKV e 'b' representa diferença estatística entre as células infectadas com ZIKV e as células infectadas com ZIKV e tratadas com fulerol utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) representa $p > 0,001$; (**) $p > 0,01$.



Fonte: o autor.

Como pode ser observado, a infecção pelo ZIKV aumentou significativamente os níveis de ERO intracelular, um aumento de 60% em relação ao controle de células. Esse efeito já foi demonstrado anteriormente para vírus da mesma família, como DENV, JEV, WNV, TBEV e HCV (CAMINI et al., 2017; ZANGH, RONG, LI, 2019). Em um primeiro momento, os níveis elevados de ERO funcionam como um mecanismo primário de defesa

celular, no entanto, com o avanço da multiplicação viral o acúmulo de ERO causa um desequilíbrio na homeostase redox podendo resultar em um estresse oxidativo celular, causando efeitos deletérios. Além disso, já foi demonstrado que alguns vírus se multiplicam melhor em células em estresse oxidativo (RESHI et al., 2014; CAMINI et al., 2017).

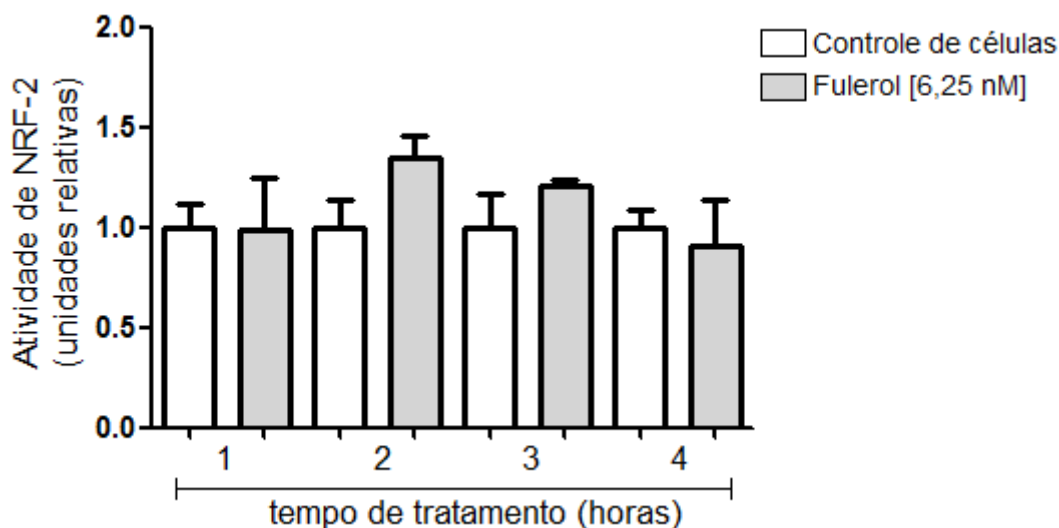
Ao se tratar as células infectadas com o ZIKV, pode-se observar um declínio no acúmulo de ERO intracelular. As células tratadas apresentaram uma diminuição de unidades relativas de ERO de 17, 44, 43 e 57% para as concentrações de 50, 25, 12,5 e 6,25 nM, respectivamente, em relação as células infectadas e não tratadas. Esse resultado demonstrou que o fulerol foi capaz de reduzir as ERO no contexto da infecção pelo ZIKV.

6.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE NRF-2/ARE APÓS TRATAMENTO COM FULEROL

Uma vez que o estresse oxidativo é caracterizado tanto pelo aumento das ERO quanto pela depleção do sistema antioxidante, foi avaliado o efeito do fulerol na atividade transcricional dos elementos de resposta anti-oxidante (AREs).

Foi demonstrado na literatura que o aumento da atividade transcricional dessa via com drogas terapêuticas aumentaria a expressão das enzimas antioxidantes que, por sua vez, conseguiriam controlar o aumento das ERO, mantendo a homeostase redox e com isso evitar o estresse oxidativo e os danos causados. Portanto, compostos que são capazes de modular positivamente essa via seriam candidatos para o tratamento antiviral (LEE, 2018). Dessa forma, foi avaliado se o fulerol era capaz de ativar a via de NRF-2 em condições celulares basais. Para isso utilizaram-se as células U-87MG e a concentração de fulerol escolhida para esse ensaio foi a de 6,25 nM, concentração mais relevante, uma vez que foi a que reduziu o maior número de ERO (Figura 15). Os dados obtidos são apresentados na Figura 16.

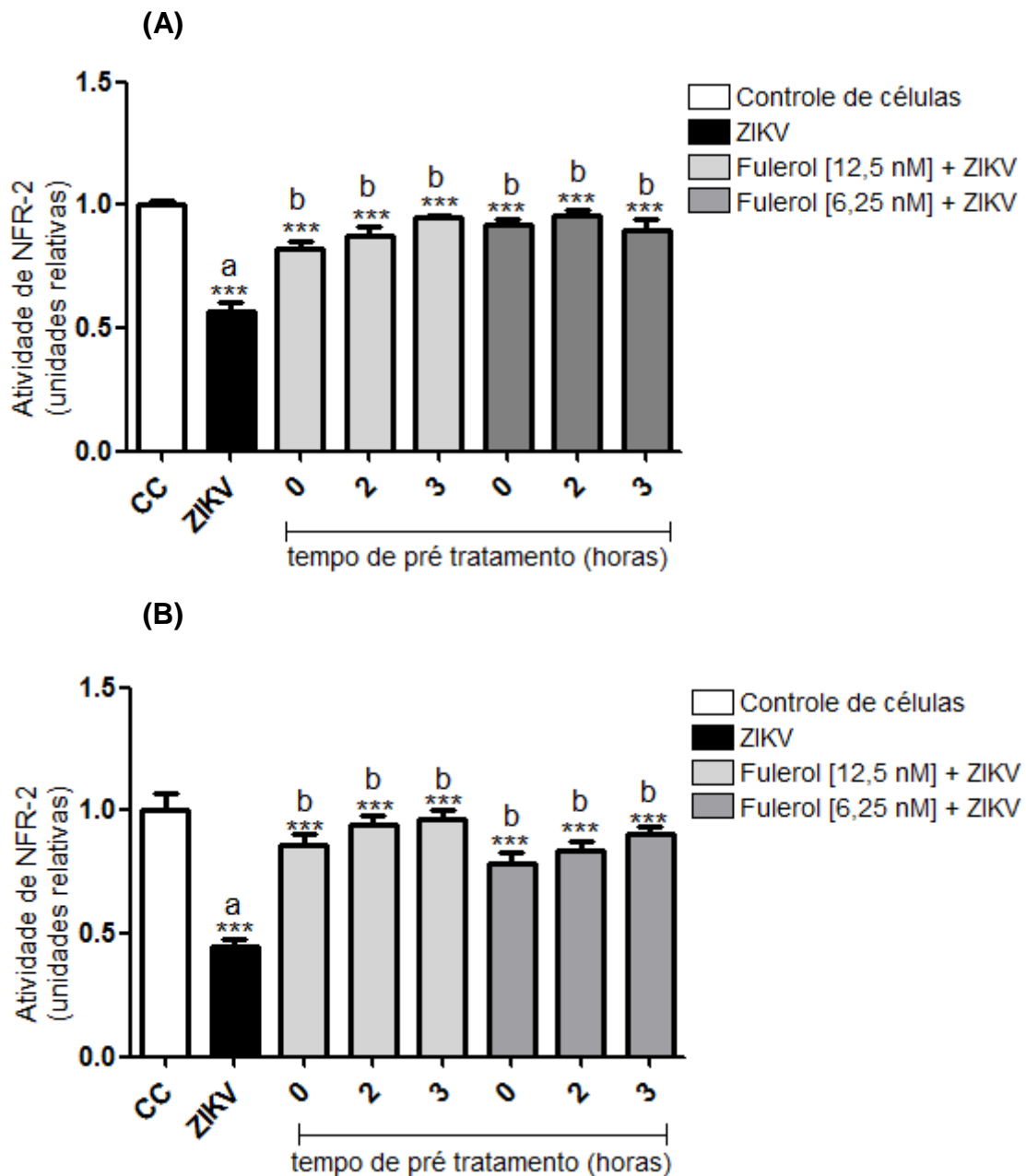
Figura 16: Atividade de NRF-2 em células U-87MG após tratamento com fulerol. As células U-87MG foram tratadas com 6,25 nM de fulerol adicionado ao meio de cultura por 1, 2, 3 e 6 horas. Após os tempos de tratamento as células foram lisadas e mediu a atividade repórter de luciferase para NRF-2 por ensaio de dual luciferase. Não houve diferença estatística entre as células tratadas com fulerol e o controle de células para $p < 0,05$, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.



Fonte: o autor.

Nota-se que não houve diferença estatística entre o controle celular e as células tratadas com o fulerol em relação à ativação transcricional de ARE. Porém, é possível observar uma tendência no aumento da atividade transcricional nos tratamentos de 2 e 3 horas, 22 e 20%, respectivamente. Com isso, foi avaliado nos experimentos posteriores se a realização de um pré-tratamento das células poderia aumentar o potencial de ação do fulerol frente a infecção pelo ZIKV. Para isso, células U-87MG foram infectadas com ZIKV por 12 e 24 horas e pré-tratadas com fulerol por 0, 2 e 3 pré-infecção. As concentrações de fulerol selecionadas foram as de 12,5 e 6,25 nM. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 17.

Figura 17: Atividade transcricional de NRF2 em células U-87MG após pré-tratamento com fulerol seguido de infecção pelo ZIKV. As células U-87MG foram tratadas com 12,5 e 6,25 nM de fulerol adicionado ao meio de cultura por 0, 2 e 3 horas seguidos da infecção pelo ZIKV (MOI 1) por (A) 12 horas e (B) 24 horas. Após os tempos de tratamento as células foram lisadas e mediu a atividade transcricional de NRF2 por ensaio de luciferase. Onde 'a' representa a diferença estatística entre o controle de células e as células infectadas com ZIKV e 'b' representa diferença estatística entre as células infectadas com ZIKV e as células infectadas com ZIKV e tratadas com fulerol utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) representa $p > 0,001$.



Fonte: o autor.

Ao comparar o controle celular com as células infectadas com ZIKV é possível observar uma diminuição na atividade transcricional de ARE/NRF-2, reduções significativas, uma vez que com 12 horas de infecção houve uma diminuição de 44% (A) e

em 24 horas de 56% (B). Essa modulação negativa também foi observada para o HCV, onde a proteína não estrutural NS3 se liga as proteínas maf, fazendo com que NFR-2 não se ligue a ARE, inibindo a transcrição dos genes das enzimas antioxidantes celulares (CARVAJAL-YEPES et al., 2011). Esse resultado sugere que o ZIKV pode modular negativamente essa via a fim de favorecer sua multiplicação.

Durante o tratamento das células infectadas com ZIKV pelo fulerol, observa-se que ocorreu uma normalização da atividade transcricional, uma vez que os valores obtidos após o tratamento são próximos ao do controle celular e não apresentaram diferença estatística.

Em (A) observa-se que para a concentração de 12,5 nM com tratamento simultâneo a infecção houve um aumento de 46% de atividade em relação ao infectado, com 2 horas de pré-tratamento 54%, e para 3 horas de pré-tratamento 67%. Já para a concentração de 6,25 nM com tratamento simultâneo a infecção ocorreu 65% de aumento, com 2 horas de pré-tratamento 69% e 3 horas de pré-tratamento 62%. Em (B) observa-se que para a concentração de 12,5 nM com tratamento simultâneo a infecção houve um aumento de 91% de atividade em relação ao infectado, com 2 horas de pré-tratamento 110%, e para 3 horas de pré-tratamento 116%, já para a concentração de 6,25 nM com tratamento simultâneo a infecção ocorreu 75% de aumento, com 2 horas de pré-tratamento 86% e 3 horas de pré-tratamento 102%.

O pré-tratamento mostrou uma tendência em potencializar o resultado, porém novamente não apresentou diferença estatística com o tratamento simultâneo a infecção (tempo 0).

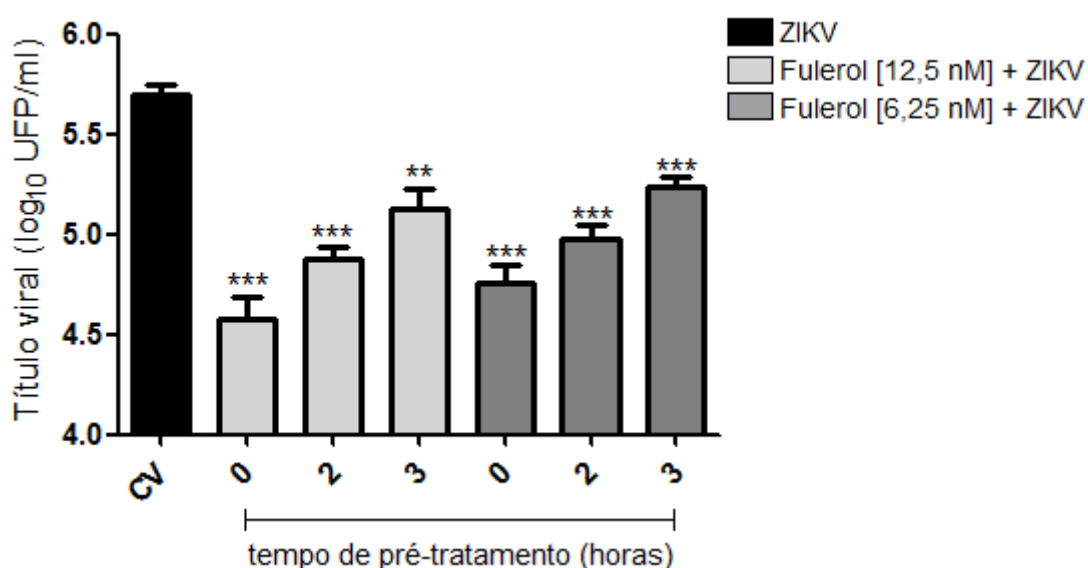
Como ainda não se sabe como o ZIKV consegue modular essa via de sinalização, não é possível inferir o mecanismo de ação pelo qual o fulerol consegue normalizar essa via, uma vez que os resultados sugerem que ele aja apenas como um sequestrador de ERO e não diretamente na via. No entanto, após o tratamento, observa-se que as células voltaram às suas condições basais, sugerindo novamente o potencial desse agente antioxidante no combate aos danos oxidativos no cenário da infecção viral.

6.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIVIRAL APÓS TRATAMENTO COM FULEROL

Como foi sugerido pelo resultado anterior, o ZIKV pode se aproveitar do estado oxidativo das células para se multiplicar, com isso foi avaliado se o tratamento com o fulerol seria capaz de reduzir o título viral. Para isso, células U-87MG foram pré-tratadas

com fulerol por 0, 2 e 3 horas e infectadas com ZIKV (MOI 1) por 24 horas. Após o tempo de incubação os sobrenadantes foram recolhidos e titulados em células VERO. Os títulos virais em unidades logarítmicas e a redução da carga viral após tratamento com o fulerol encontram-se na Figura 18.

Figura 18: Efeito do tratamento do fulerol na multiplicação viral em células U-87MG infectadas com ZIKV. As células U-87MG foram pré-tratadas com fulerol por 0, 2 e 3 horas seguido da infecção com ZIKV (MOI 1) por 24 horas. Os sobrenadantes das células foram coletados e titulados em células VERO e após 72 horas foram reveladas. Todos os tempos e concentrações apresentaram diferença estatística em relação ao controle de vírus utilizando o one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (***) representa $p > 0,001$; (**) $p > 0,01$.



Fonte: o autor.

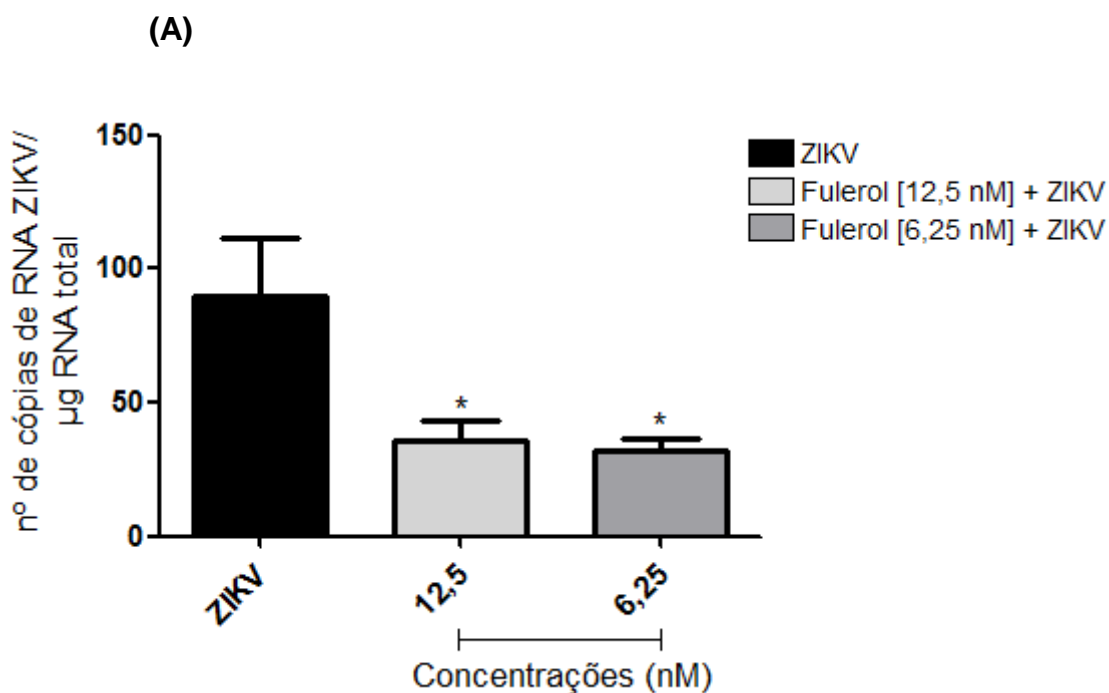
O título viral obtido para o ZIKV foi de $5,12 \times 10^5$. Após o tratamento com o fulerol observou-se uma redução no título viral para todas as concentrações. Como pode ser observado na Figura 18 houve uma redução significativa na produção de ZIKV, mostrando o potencial do fulerol como antiviral, possivelmente devido ao mecanismo antioxidante. Na concentração de 12,5 nM, o tempo 0 apresentou uma redução de 93% de produção viral, no tempo de pré-tratamento de 2 horas 84% e no tempo 3 horas 70% de redução. Já na concentração de 6,25 nM no tempo 0 a redução foi de 87%, e nos tempos 2 e 3 horas de pré-tratamento uma redução de 83 e 65%, respectivamente.

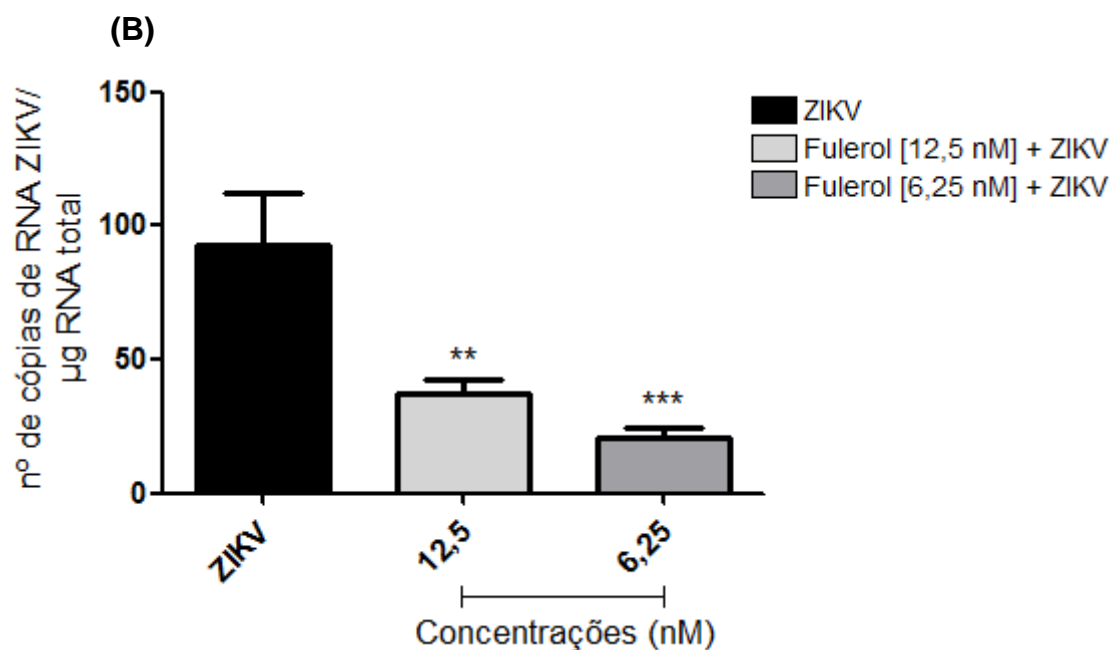
O resultado demonstrou que o pré-tratamento não foi eficaz para redução da carga viral, as reduções mais significativas foram observadas com o tempo 0, em que o vírus e fulerol eram adicionados simultaneamente. Uma possível explicação para esse resultado

é o tempo de vida do fulerol dentro da célula, esse dado ainda não é conhecido na literatura. Outra explicação é que o fulerol esteja “sequestrando” as espécies reativas do próprio metabolismo celular antes do momento da infecção, e no momento de maior produção de ERO pelo ZIKV ele já esteja com uma alta taxa de oxidação, diminuindo sua eficiência durante a infecção.

Para confirmação dos resultados obtidos por titulação, foi realizado um ensaio de qRT-PCR para análise da redução do número de cópias de RNA viral após tratamento com o fulerol (Figura 19). Como o pré-tratamento não se mostrou eficiente, o mesmo não foi considerado para o próximo experimento.

Figura 19: Efeito da redução de genoma viral em células U-87MG infectadas com ZIKV após tratamento com fulerol. As células U-87MG foram tratadas com fulerol nas concentrações de 12,5 e 6,25 nM seguido da infecção com ZIKV (MOI 1) por 24 horas. O RNA total das células e do sobrenadante foi extraído e o RNA viral quantificado por TaqMan® qRT-PCR. Em (A) pode-se observar a quantificação de RNA viral do sobrenadante celular e em (B) a quantificação do lisado celular. Todas as concentrações apresentaram diferença estatística em relação ao controle de vírus utilizando o one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (*) representa $p > 0,1$.





Fonte: o autor.

Tanto no sobrenadante como no lisado celular, foi possível observar uma diferença considerável entre o número de cópias de genoma viral do controle viral e os tratamentos com fulerol. Em (A) é possível observar o número de cópias de RNA para o sobrenadante, onde a concentração de 12,5 nM apresentou uma redução de 60% e a concentração de 6,25 nM uma redução de 65%. Em (B) a concentração de 12,5 nM mostrou uma redução de 56% e a de 6,25 uma redução de 75%, apontando um padrão de similaridade para o resultado encontrado na titulação viral.

Na literatura foi encontrado apenas um estudo que tratou ZIKV no contexto de estresse oxidativo. Vasireddi et al. (2019) mostraram que ao tratar células Vero e JEG-3 infectadas com ZIKV com uma formulação de aminoácidos específicos de forma livre (FFAAP) capazes de sintetizar glutathiona intracelular, uma das defesas antioxidantes mais conservadas em todas as espécies, ocorreu uma inibição de 90% da multiplicação viral, corroborando com os ótimos resultados encontrados para o fulerol.

Além disso, esses resultados reforçam a suposição que o ZIKV multiplica-se melhor em condições de estresse oxidativo e o tratamento com agentes antioxidantes diminui consideravelmente a produção viral. Sendo assim, o tratamento de infecções por ZIKV com antioxidantes se torna uma alternativa promissora.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Após a realização deste estudo, foi possível concluir que o fulerol apresenta atividade antioxidante contra a infecção causada pelo ZIKV nas concentrações de 12,5 e 6,25 nM. A partir de sua ação antioxidante, ocorreu uma redução significativa na multiplicação do vírus, com inibição de até 90% da carga viral, contribuindo para a hipótese de que o ZIKV multiplica melhor em condições de estresse oxidativo. Os resultados sugerem que o fulerol não age modulando vias de sinalização e que não tem ação direta sobre o vírus, seu princípio de ação possivelmente é apenas o de sequestro de espécies reativas. Com isso, o fulerol se mostra uma substância potencial para o tratamento de infecções pelo ZIKV.

Como vários vírus causam estresse oxidativo, como revisado neste trabalho, modulando positivamente a multiplicação viral, sugere que o fulerol possa agir de forma semelhante para outros vírus, atuando como uma substância de amplo espectro, se tornando um potente antiviral.

Este trabalho sugere como perspectivas a avaliação do fulerol em concentrações abaixo das testadas neste trabalho, uma vez que o seu potencial antioxidante frente a infecções pelo ZIKV pode ser potencializado em menores concentrações. Avaliar o efeito do fulerol como tratamento após a infecção. Investigar o mecanismo de ação do fulerol e a modulação de outros fatores transcricionais. Além disso, avaliar a ação do fulerol *in vivo* frente a infecções pelo ZIKV, assim como a avaliação de sua atividade antioxidante no contexto de outras viroses.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, 2017.

AHMED, S. M.; LUO, L.; NAMANI, A.; WANG, X. J.; TANG, X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, v. 1863, n.2, p. 585-597, 2017.

AL-ALIMI, A. A.; ALI, S. A.; AL-HASSAN, F. M.; IDRIS, F. M.; TEOW, S. Y.; MOHD YUSOFF, N. Dengue virus type 2 (DENV2) induced oxidative responses in monocytes from glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient and G6PD normal subjects. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 3, 2014.

AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 90, p. 7915–7922, 1993.

ANDRADE JÚNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. H. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

ATKINSON, B.; HEARN, P.; AFROUGH, B.; LUMLEY, S.; CARTER, D.; AARONS, E. J., SIMPSON, A. J.; BROOKS, T. J.; HEWSON, R. Detection of zika virus in semen. *Emerging Infectious Diseases*, v. 22, n. 5, 2016.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. P. DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARRETO-VEIRA, D. F.; JACOME, F. C.; SILVA, M. A. N.; CALDAS, G. C.; FILIPPIS, A. M. B.; SEQUEIRA, P. C.; SOUZA, E. M.; ANDRADE, A. A.; MANSO, P. P. A.; TRINDADE, G. F.; LIMA, S. M. B.; BARTH, O. M. Structural investigation of C6/36 and Vero cell cultures infected with a Brazilian Zika virus. *PLoS one*, v. 12, n. 9, 2017.

BEAVER, J. T.; LELUTIU, N.; HABIB, R.; SKOUNTZOU, I. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Frontiers in Immunology*, v.6, n. 1640, p. 1-17, 2018.

BENDER, D.; HILDT, E. Effect of Hepatitis Viruses on the Nrf2/Keap1-Signaling Pathway and Its Impact on Viral Replication and Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.*, v.20, n. 18, p. 4659, 2019.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCY, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico da Doenças Transmitidas pelo Aedes. Dengue, Chikungunya e Zika Nº 159, Semana Epidemiológica 51. Data da atualização: 16/12/2019

BRASIL P., NIELSEN, K. S. More pieces to the microcephaly-Zika virus puzzle in Brazil, *Lancet Infect Dis*, v. 16, n. 2, p. 1307-1309, 2016.

CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S. O.; SAMPAIO, S. A.; FILIPPIS, I.; FABRI, A.; ARAUJO, E. S. M.; SEQUEIRA, P. C.; MENDONÇA, M. C. L.; OLIVEIRA, L.; TSCHOEKE, D. A.; SCHRAGO, C. G.; THOMPSON, F. L.; BRASIL, P.; SANTOS, F. B.; NOGUEIRA, R. M. R.; TANURI, A.; FILIPPIS, A. M. B. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis*, v. 16, n. 6, p. 1-8, 2016.

CALVETE, C. L.; CASEIRO, M. M.; SOUZA, C. B. Biotecnologia: transformação bacteriana por método de choque térmico. *Revista UNILUS Ensino e Pesquisa*, v. 12, n. 26, 2015.

CAMINI, F. C.; CAETANO, C. C. S.; ALMEIDA, L. T.; MAGALHÃES, C. L. B. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Arch Virol*, v. 162, p. 907–917, 2017.

CAMINI, F. C.; SILVA, T. F.; CAETANO, C. C. S.; ALMEIDA, L. T.; FERRAZ, A. C.; VITORETI, V. M. A.; SILVA, B. M.; SILVA, S. Q.; MAGALHÃES, J. C.; MAGALHÃES, C. L. B. Antiviral activity of silymarin against Mayaro virus and protective effect in virus-induced oxidative stress. *Antiviral Research*, v. 158, p. 8–12, 2018.

CAMPOS, M. T. G.; LEME, F. O. P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. *Pubvet*, v.12, n.1, p.1-8, 2018.

CAMPOS, T. L.; DURÃES-CARVALHO, R.; REZENDE, A. M.; CARVALHO, O.V.; KOHL, A.; WALLAU, G. L.; PENA, L. J. Revisiting Key Entry Routes of Human Epidemic Arboviruses into the Mainland Americas through Large-Scale Phylogenomics. *International Journal of Genomics*, v. 2018, p. 1-9, 2018.

CANNING, P.; SORRELL, F. J.; BULLOCK, A. N. Structural basis of Keap1 with Nrf2. *Radic livre. Biol. Med.*, v. 88, p. 101-107, 2015.

CAO, G.H.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbency capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med.* v.14, p.303- 311, 1993.

CARVAJAL-YEPES, M.; HIMMELSBACH, K.; SCHAEGLER, S.; PLOEN, D.; KRAUSE, J.; LUDWIG, L.; WEISS, T.; KLINGEL, K.; HILDT, E. Hepatitis C virus impairs the induction of cytoprotective Nrf 2 target genes by delocalization of small Maf proteins. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 11, p. 8941– 8951, 2011.

CDC – CENTERS OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Zika virus*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/zika/>>. Acesso em: 30 de outubro de 2019.

CHAN, J. F.; CHOI, G. K.; YIP, C. C.; CHENG, V. C.; YUEN, K. Y. Zika fever and congenital Zika syndrome: An unexpected emerging arboviral disease. *J Infect*, v. 72, p. 507–524, 2016.

- CHEN, T. H.; TANG, P.; YANG, C. F.; KAO, L. H.; LO, Y. P.; CHUANG, C. K.; SHIH, Y. T.; CHEN, W. J. Antioxidant defense is one of the mechanisms by which mosquito cells survive dengue 2 viral infection. *Virology*, v. 410, n. 2, p. 410-417, 2011.
- CHENG, Y. L.; LIN, Y. S.; CHEN, C. L.; TSAI, T. T.; TSAI, C. C.; WU, Y. W.; OU, Y. D.; CHU, Y. Y.; WANG, J. M.; YU, C. Y.; LIN, C. F. Activation of Nrf2 by the dengue virus causes an increase in CLEC5A, which enhances TNF- α production by mononuclear phagocytes. *Scientific Reports*, v. 26, n.6, 2016.
- DE OLIVEIRA, W. K.; CORTEZ-ESCALANTE, J.; DE OLIVEIRA, W. T. G. H.; CARMO, G. M. I.; FRANÇA, G. V. A. Increase in reported prevalence of microcephaly in infants born to women living in areas with confirmed Zika virus transmission during the first trimester of pregnancy – Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly*, v. 65, n. 9, p. 242-247, 2016.
- DERAMAUDT, T. B.; DILL, C.; BONAY, M. Regulation of oxidative stress by Nrf2 in the pathophysiology of infectious diseases. *Med Mal Infect*, v. 43, n. 3, p. 100-107, 2013.
- DONALD, C. L.; BRENNAN, B.; CUMBERWORTH, S. L.; REZELJ, V. V.; CLARK, J. J.; CORDEIRO, M. T.; FRANÇA, R. F. O. F. ; PENA, L. J.; WILKIE, G. S.; ANA DA SILVA FILIPE, A. S.; DAVIS, C.; HUGHES, J.; VARJAK, M.; SELINGER, M.; ZUVANOV, L.; ANIA M. OWSIANKA, A. M.; PATEL, A. H.; JMCLAUCHLAN, J.; LINDENBACH, B. D.; FALL, G.; SALL, A. A.; ROMAN BIEK, B.; REHWINKEL, J.; SCHNETTLER, E.; KOHL, A. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 10, 2016.
- DUGAN, L.L.; GABRIELSEN, J.K.; YU, S.P.; LIN, T.S.; CHOI, D.W. "Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons". *Neurobiology of Disease*, v. 3, p. 129-135, 1996.
- DULBECCO, R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc Natl Acad*, v.38, p.747-752, 1952.
- FAYE, O.; FREIRE, C. C. M.; IAMARINO, A. FAYE, O.; OLIVEIRA, J. V. C.; DIALLO, M.; ZANOTTO, P. M. A.; SALL, A. Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PloS Neglected Tropical Disease*, v. 8, n. 1, p. 2636, 2014.
- FERGUSON, N. M.; CUCUNUBÁ, Z. M.; DORIGATTI, I.; NEDJATI-GILANI, G. L.; DONNELLY, C. A.; BASÁÑEZ, M. G.; NOUVELLET, P.; LESSLER, J. Countering the Zika epidemic in Latin America. *Science*, v. 353. V. 6297, p. 353-354, 2016.
- FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISS, E. Zika virus: an uptade. *Microbes and Infection*, 2019.
- FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, v.1, p. 32-39, 2007.
- FOLEY, S.; CROWLEY, C.; SMAIHI, M.; BONFILS, C.; ERLANGER, B.F.; SETA, P.; LARROQUE, C. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 294, p.116–119, 2002.
- FORMAN, H.J. Use and abuse of exogenous H₂O₂ in studies of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 42, p. 926–932, 2007.

- GÖERTZ, G. P.; ABBO, S. R.; FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. Functional RNA during Zika virus infection. *Virus Research*, v. 254, p. 41-53, 2018.
- GOLDSMITH, C. CDC - Public Health Image Library (PHIL), Disponível em: <<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=20487>>, 2016.
- GLORIEUX, C.; ZAMOCKY, M.; SANDOVAL, J. M.; VERRAX, J.; CALDERON, P. B. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 87, p. 84–97, 2015.
- HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect.*, v. 102, p. 5–12, 1994.
- HASAN, S.; SAEED, S.; PANIGRAHI, R.; CHOUDHARY, R. Zika Virus: A Global Public Health Menace: A Comprehensive Update. *J Int Soc Prev Community Dent.*, v.9, n.4, p. 316–327, 2019.
- HOSAKOTE, Y. M.; JANTZI, P. D.; ESHAM, D. L.; SPRATT, H.; KUROSKY, A.; CASOLA, A.; GAROFALO, R. P. Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 183, n. 11, p. 1550-1560, 2011.
- HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 16, p. 4437-4444, 2002.
- IAVICOLI, I.; LESO, V.; FONTANA, L.; CALABRESE, E.J. Nanoparticle exposure and hormetic dose–responses: An update. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 805, n. 2019, 2018.
- INDUKURI, H.; CASTRO, S. M.; LIAO, S. M.; FEENEY, L. A.; DORSCH, M.; COYLE, A. J.; GAROFALO, R. P.; BRASIER, A. R.; CASOLA, A. Ikkepsilon regulates viral-induced interferon regulatory factor-3 activation via a redox-sensitive pathway. *Virology*, v. 353, n. 1, p. 155–165, 2006.
- INJAC, R.; PERSE, M.; OBERMAJER, N.; DJORDJEVIC-MILIC, V.; PRIJATELJ, M.; DJORDJEVIC, A.; CERAR, A. STRUKELJ, B. Potential hepatoprotective effects of fullerol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials*, v. 29, p. 3451–3460, 2008.
- KIM, J. H.; YU, S.; CHEN, J. D.; KONG, A. N. The nuclear cofactor RAC3/AIB1/SRC-3 enhances Nrf2 signaling by interacting with transactivation domains. *Oncogene*, v.32, n. 4, p. 514-527, 2013.
- KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. 9^a ed. Amsterdam: Elsevier, 1327 p., 2012.
- KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *Virology*. 6^a ed., 2013.
- KOVAC, T.; BORISEV, I.; CREVAR, B.; KENJERIC, F. C.; KOVAC, M.; STRELEC, I.; EZEKIEL, C. N.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; ŠARKANJ, B. Fullerol C60(OH)24

nanoparticles modulate aflatoxin B1 biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Scientific Reports*, v. 8, n.1, 2018.

KOVEL, E. S.; SACHKOVA, A. S.; VNUKOVA, N. G.; CHURILOV, G. N. KNYAZEVA, E. M. KUDRYASHEVA, N. S. Antioxidant Activity and Toxicity of Fullerenols via Bioluminescence Signaling: Role of Oxygen Substituents. *International Journal of Molecular Science*, v. 20, n. 2324, 2019.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr.*, v. 16, n. 4, p. 433-441, 2003.

LADEIRA, M. S. Nanotecnologia aplicada ao sistema cardiovascular. Efeito do fullerol no estresse oxidativo. (Tese). Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, 2016.

LAI, H.S.; CHEN, W.J.; CHIANG, L.Y. Free radical scavenging activity of fullerol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs. *World Journal of Surgery*, v. 24, p.450–454, 2000.

LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; VELEZ, J. O.; LAMBERT, A. J.; JOHNSON, A. J.; STANFIELD, S. M.; DUFFY, M. R. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*, v. 12, n. 8, p. 1232-1239, 2008.

LEE, C. Therapeutic Modulation of Virus-Induced Oxidative Stress via the Nrf2-Dependent Antioxidative Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, p. 1-26, 2018.

LEDOUX, A.; CAO, M; JANSEN, O.; LUCIA, M. CAMPOS . P. E.; PAYET, B.; CLERC, P.; GRONDIN, I.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; HERMANN, T.; LITAUDON, M.; VANDERHEYDT, C.; DELANG, L.; NEYTS, J.; LEYSSEN, P.; FREDERICH, M.; SMADJA, J. Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands. *Int J Antimicrob Agents*, v. 52, n.5, p. 622-628, 2018.

LI, W.; JAIN, M. R.; CHEN, C.; YUE, X.; HEBBAR, V.; ZHOU, R.; KONG, A. N. Nrf2 Possesses a redox-insensitive nuclear export signal overlapping with the leucine zipper motif. *J Biol Chem*, v. 280, n. 31, 2005.

LI, W.; YU, S. W.; KONG, A.-N.T. Nrf2 Possesses a Redox-sensitive Nuclear Exporting Signal in the Neh5 Transactivation Domain. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, p. 27251–27263, 2006.

LIN, Y. L.; LIU, C. .C.; CHUANG, J. I.; LEI, H. Y.; YEH, T. M.; LIN, Y. S.; HUANG, Y. H.; LIU, H. S. Involvement of oxidative stress, NF-IL-6, and RANTES expression in dengue-2-virus-infected human liver cells. *Virology*, v. 276, n. 1, p. 114–126, 2000.

LIU, B.; CHEN, Y.; ST CLAIR, D. K. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 44, p. 1529–1535, 2008.

- LIU, H.; YANG, X.; ZHANG, Y.; DIGHE, A.; LI, X.; CUI, Q. Fullerol antagonizes examethasone-induced oxidative stress and adipogenesis while enhancing osteogenesis in a cloned bone marrow mesenchymal stem cell. *J Orthop Res*, v.30, n.7, p. 1051-1057, 2012.
- LO, D.; PARK, B. Modeling the spread of the Zika virus using topological data analysis. *PLoS ONE*, v. 13, n.2, 2018.
- MARDEKIAN, S.K.; ROBERTS, A. L. Diagnostic options and challenges for dengue and chikungunya viruses. *Biomed Res Int.*, v. 2015, p. 1-8, 2015.
- MARTELLI, F.; FRANCIS MORAIS FRANCO NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. *Cienc. Cult.*, v. 66, n. 3, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v.65, n. 1-2, p.55-63, 1983.
- MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 10, p. 595–596, 2014.
- NARAYANAN, A.; AMAYA, M.; VOSS, K.; CHUNG, M.; BENEDICT, A.; SAMPEY, G.; KEHN-HALL, K.; LUCHINI, A.; LIOTTA, L.; BAILEY, C.; KUMAR, A.; BAVARI, S.; HAKAMI, R. M.; KASHANCHI, F. Reactive oxygen species activate NF κ B (p65) and p53 and induce apoptosis in RVFV infected liver cells. *Virology*, v. 449, p. 270-286, 2014.
- NEUFELDT1, C. J.; CORTESE, M.; ACOSTA, E. G.; BARTENSCHLAGER, R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nature Reviews | Microbiology*, v. 16, p. 125-142, 2018.
- NIOI, P.; NGUYEN, T.; SHERRATT, P. J.; PICKETT, C. B. The Carboxy-Terminal Neh3 Domain of Nrf2 Is Required for Transcriptional Activation. *Mol Cell Biol*, v. 25, n.24, p. 10895–10906, 2005.
- NISHIMURA, A.; MORITAI, M. NISHIMURA, H.; SUGINO, Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 20, p. 6169, 1990.
- OLAGNIER, D.; PERI, S.; STEEL, C.; VAN MONTFOORT, N.; CHIANG, C.; BELJANSKI, V.; SLIFKER, M.; HE, Z.; NICHOLS, C. N.; LIN, R.; BALACHANDRAN, S.; HISCOTT J. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 12, 2014.
- OLIVEIRA, M.S. ENAGIS-MAY: Uma proposta de ensaio de aglutinação indireta para detectar no sangue imunoglobulinas contra Mayaro vírus. (Dissertação) Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- O'REILLY K. M.; LOWE, R.; EDMUNDS, W. J.; MAYAUD, P.; KUCHARSKI, A., EGGO, R. M.; FUNK, S.; BATHIA, D.; KHAN, K.; KRAEMER, M. U. G.; WILDER-SMITH, A.; RODRIGUES, L. C.; BRASIL, P.; MASSAD, E.; JAENISCH, T.; CAUCHEMEZ, S.;

BRADY, O. J.; TAKOB, L. Projecting the end of the Zika virus epidemic in Latin America: a modelling analysis. *BMC Med*, v.16, n.1, 2018.

PASTOR, N.; WEINSTEIN, H.; JAMISON, E., BRENOWITZ, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.*, v. 304, n.1, p.55-68, 2000.

PITTS, J. D.; LI, P. C.; WISPELAERE, M.; YANG, P.L. Antiviral activity of N- (4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) against Zika virus. *Antiviral Research*, v. 147, p. 124–130, 2017.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

RAMOS, G. S. Atividade Antileishmania do fulerol e efeito hepatoprotetor na quimioterapia antimonial em modelo murino de Leishmaniose Visceral. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Dissertação) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2014.

RESHI, M. L.; SU, Y.-C.; HONG, J.-R. RNA viruses: ROS-mediated cell death. *Int J Cell Biol*, v. 2014, p. 1-16, 2014.

ROY, J.; GALANO, J. M.; DURAND, T.; LE GUENNEC, J. Y.; LEE, J. C. Y. Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses. *The FASEB Journal*, v. 31, n. 9, p. 3729–3745, 2017.

SCATURRO, P.; CORTESE, M.; CHATEL-CHAIX, L.; FISCHL, W.; BARTENSCHLAGER, R. Dengue virus non-structural protein 1 modulates infectious particle production via interaction with the structural proteins. *PLoS Pathog*, v. 11, n. 11, 2015.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v. 10, p. 308-313, 2004.

SEET, R. C.; LEE, C. Y. J.; LIM, E. C.; QUEK, A. M.; YEO, L. L.; HUANG, S. H.; HALIWELL, B. Oxidative damage in dengue fever. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 47, n. 4, p. 375–380, 2009.

SCHULTZ, L. R. M.; MOORE, V. C.; LEONARD, A. D.; B. PRICE, B. K.; KOSYNKIN, D. V.; LU, M.; PARTHA, R.; CONYERS, J. L.; TOUR, J. M. Antioxidant Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 131, n. 11, 3934-3941, 2009.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, v. 4, p. 180-183, 2015.

SILVA, E.; SOUZA, J.; ROGEZ, H.; REES, J.-F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SIMMONDS, P.; BECHER, B.; BUKH, J.; GOULD, E. A.; MEYERS, G.; MONATH, T.; MUERHOFF, S.; PLETNEV, A.; RICO-HESSSE, R.; SMITH, D.B.; STAPLETON, J.T.; ICTV

REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*, Journal of General Virology, 98:2–3, 2017.

TAPPE, D.; NACHTIGALL, S.; KAPAUN, A.; SCHNITZLER, P.; GÜNTHER, S.; SCHMIDT-CHANASIT, J. Acute Zika Virus Infection after Travel to Malaysian Borneo. Emerging Infectious Diseases, v. 21, n. 5, p. 911-913, 2015.

TERZIAN, A. C. B.; ZINI, N.; SACCHETTO, L.; ROCHA, R. F.; PARRA, M. C. P.; SARTO, J. L.; DIAS, A. C. F.; COUTINHO, F.; RAYRA, J.; SILVA, R. A.; COSTA, V. V.; FERNANDES, N. C. C. A.; RÉSSIO, R.; DIAZ-DELAGO, J.; GUERRA, J.; CUNHA, M. S.; CATÃO-DIAS, J. L.; BITTAR, C.; REIS, A. F. N.; SANTOS, I. N. P. S.; FERREIRA, A. C. M.; CRUZ, L. E. A. A.; RAHA, P.; ULLMANN, A.; MALOSI, C.; ARAÚJO, J. P.; WIDEN, S.; REZENDE, M.; MELLO, E.; PACCA, C. C.; KRON, E. G.; TRINDADE, G.; DRUMOND, B.; NETO-CHIARAVALLI, F.; VASILAKIS, N.; TEIXEIRA, M. M.; NOGUEIRA, M. L. Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. Scientific Reports, v.8, n. 16034, p. 1-15, 2018.

TIAN, Y.; JIANG, W.; GAO, N. ZHANG, J.; CHEN, W.; FAN, D.; ZHOU, D.; AN, J. Inhibitory effects of glutathione on dengue virus production. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 397, n. 3, p. 420–424, 2010.

TORRES, V.M.; SRDJENOVIC, B.; JACEVIC, V.; SIMIC, V.D.; DJORDJEVIC, A.; SIMPLICIO, A.L. Fullerol C60(OH)24 prevents doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. Pharmacological Reports, v. 62, p. 707-718, 2010.

TRICARICO, P. M.; CARACCIOLO, I.; CROVELLA, S.; D'AGARO, P. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U-87MG. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 492, n. 4, p. 597-602, 2017.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact., v. 160, p. 1–40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. Química Nova, 30, 1323-1338, 2007.

VASIREDDIA, M.; CRUMB, A.; MAYC, H.; KATZA, D.; HILLIARDA, J. A novel antiviral inhibits Zika virus infection while increasing intracellular glutathione biosynthesis in distinct cell culture models. Antiviral Research, v. 161, p. 46–52, 2019.

VIZZOTTO, E. Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante. Disciplina de Fundamentos Bioquímicos dos Transtornos Metabólicos, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.

VORONOV, I. I.; MARTYNYENKO, V. M.; CHERNYAK, A. V.; BALZARINI, J.; SCHOLS, D.; TROSHIN, P. A. Synthesis and Antiviral Activity of Water-Soluble Polycarboxylic Derivatives of [60]Fullerene Loaded with 3,4-Dichlorophenyl Units. Chem. Biodiversity, v. 15, 2018.

VRANES, M.; BORIS, I.; TOT, A.; ARMAKOVIC, S.; ARMAKOVIC, S.; JOVIC, D.; GADZURIC, S.; DJORDJEVIC, A. Self-assembling, reactivity and molecular dynamics of fullereneol nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2016.

WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. *Lancet Infect. Dis.*, v. 16, p. 119-126, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Zika: We must be ready for the long haul, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/commentaries/detail/zika-we-must-be-ready-for-the-long-haul>>.

YANG, X.; JIN, L.; YAO, L.; HSHEN, F.; LI, X. Antioxidative nanofullerol prevents intervertebral disk degeneration. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 2429-2430, 2018.

YE, Q.; LIU, Z. Y.; HAN, J. F.; JIANG, T.; LI, X. F.; QIN, C. F. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. *Infect Genet Evol.*, v. 43, p. 43-49, 2016.

ZANLUCA, C.; DE MELO, V. C. A.; MOSIMANN, A. L. P.; DOS SANTOS, G. I. V.; DOS SANTOS, C. N. D.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110: 569-572, 2018.

ZHANG, D. D.; LO, S. C.; CROSS, J. V.; TEMPLETON, D. J.; HANNINK M. YOKOYAMA, M. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell. Biol.*, v. 24, p. 10941-10953, 2004.

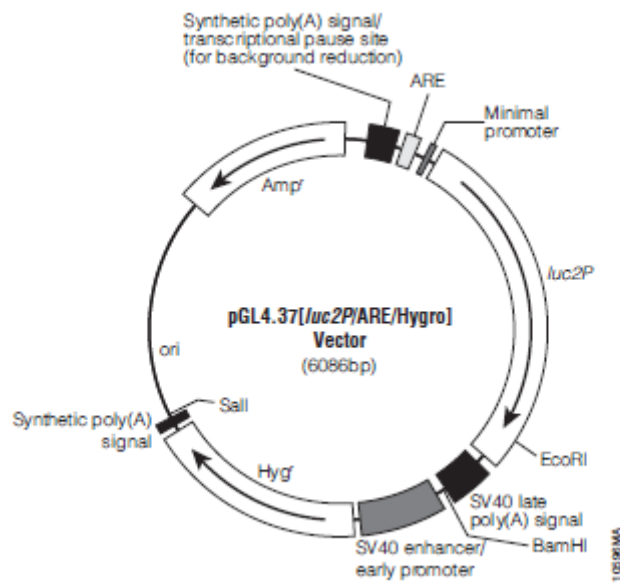
ZHANG, X.; JIA, R.; SHEN, H.; WANG, M. YIN, Z.; CHENG, A. Structures and functions of the envelope glycoprotein in Flavivirus infection. *Viruses*, v. 9, n. 11, 2017.

ZHANG, X.; SHENG, J.; AUTIN, S. K.; HOORNWEG, T. E.; SMIT, J. M. KUNH, R. J. DIAMOND, M. S.; ROSSMANN, M. G. Structure of acidic pH dengue virus showing the fusogenic glycoprotein trimers. *J. Virology*, v. 89, p. 743–750, 2015.

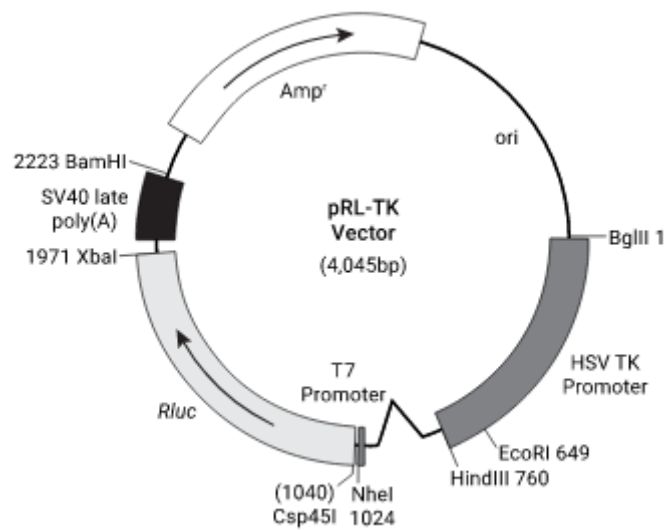
ZHANG, Z.; RONG, L.; LI, Y. P. Flaviviridae Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, p. 1-17, 2019.

ANEXOS

Anexo 1: Mapa genético do vetor pGL4.37 (Repórter da via de NRF-2/ARE)



Anexo 2: Mapa genético do vetor pRL-TK



Anexo 3: Prêmio de melhor apresentação oral no II Simpósio de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia



Anexo 4: Prêmio destaque na categoria pôster na IV Mostra de Pós-Graduação do Encontro de Saberes

