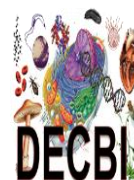




UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS



MARIA LAURA MAXIMIANO DIAS GOMES

Avaliação do efeito do Fullerol na redução do estresse oxidativo em células infectadas por *Zika virus*

Ouro Preto
2024

MARIA LAURA MAXIMIANO DIAS GOMES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FULEROL NA REDUÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉLULAS INFECTADAS POR ZÍKA VIÍRUS**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharelado em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Ciências da Saúde
Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva

Co Orientador: Me. Wellington Carvalho Malta

Ouro Preto

2024



FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Laura Maximiniano Dias Gomes

Avaliação do efeito do Fulerol na Redução do estresse oxidativo em células infectadas por Zika virus

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas

Aprovada em 18 de abril de 2024

Membros da banca

Dr. Breno de Mello Silva - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Me. Wellington Malta de Carvalho - Co-orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Adriana Cotta Cardoso Reis - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra. Renata Tupinambá Branquinho - Universidade Federal de Ouro Preto

Breno de Mello Silva, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 06 de maio de 2024



Documento assinado eletronicamente por **Breno de Mello Silva, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 06/05/2024, às 21:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0708052** e o código CRC **5A4C9F0E**.

Agradecimentos

É com grande satisfação e gratidão que expresso meus mais sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, agradeço por sentir a presença de Deus em todos os momentos dessa jornada. Agradeço também à minha família pelo amor incondicional, compreensão e apoio durante toda a minha caminhada acadêmica, sem o suporte de vocês, esta conquista não seria possível, em especial minha mãe Aparecida, meu pai Evandro e meu irmão Miguel.

Agradeço ao meu orientador/professor Breno, pela sua orientação, paciência e dedicação ao longo deste processo. Ao meu coorientador Wellington por todo seu conhecimento, incentivo e apoio, que foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo. Agradeço também a todos os colegas do laboratório LBTM, em especial a duas pessoas que foram peças fundamentais para formar todo o conhecimento que tenho hoje: Orlando e Bruna. Também agradeço ao Pedro, pela ajuda nos experimentos, e meu amigo Rodrigo por fornecer as ferramentas necessárias para o desenvolvimento do trabalho.

Igualmente agradeço ao ICEB, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, que possibilitou todas as pesquisas realizadas durante a minha graduação, e a Universidade Federal de Ouro Preto pelo ensino público de qualidade.

Expresso minha gratidão ao meu namorado João César, e aos meus amigos Clara, Igor, João, Giovana, Vitória e Mirelly, que estiveram ao meu lado durante esse processo, deixando tudo mais leve e sendo um verdadeiro refúgio nos momentos mais difíceis. Aos BIOmigos Luiz, Elder e Laura que foram muito mais do que simples colegas de turma e estudo, foram fonte de apoio, inspiração e amizade. Um agradecimento especial aos meus amigos de longa data: Vick, Marina, Tiago, Vitória e Bruna, pois a amizade de vocês é um dos meus bens mais preciosos, e que ela continue a prosperar e a fortalecer ao longo dos anos, assim como tem sido até hoje.

Não poderia deixar de agradecer a minha segunda casa em Ouro Preto, a República Rosa Xiclete, e a todas que moram ali, desde a Pequena até as atuais. Obrigada por todos os momentos de alegrias e conforto, em especial as meninas que chegaram pra mudar minha vida pra melhor: Benzé, Tesla e Tudi.

Por fim, dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim e me motivaram a alcançar meus objetivos acadêmicos e profissionais. Que este estudo possa contribuir de alguma forma para o avanço do conhecimento em nossa área.

Resumo

A febre do zika é uma doença aguda grave causada pelo *Zika virus*, pertencente à família *Flaviviridae*, que é transmitido especialmente pela picada de mosquitos da espécie *Aedes aegypti*. Em ensaios in vitro, observa-se que após a infecção, ocorre uma elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) como estratégia de combate celular. No entanto, simultaneamente à produção de EROs, as células produzem enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a Catalase (CAT), para compensar a produção de EROs, pois, esse excesso pode levar ao estresse oxidativo da célula. Neste contexto, entender a dinâmica da produção de EROs em células infectadas, bem como a resposta antioxidante celular é importante para compreender a importância dessa resposta na replicação viral para que novas abordagens terapêuticas possam ser desenvolvidas. Sobretudo, compostos antioxidantes como o fulerol, uma esfera de carbonos ligados a hidroxilas, que tem a função de capturar EROs gerados pela infecção. Dados preliminares do nosso grupo de pesquisa têm sugerido que o fulerol é capaz de restaurar o equilíbrio redox e reduzir a replicação viral. Portanto, neste trabalho, avaliamos a produção de EROs e a ação de enzimas antioxidantes em células infectadas com ZIKV, analisando a citotoxicidade do fulerol no modelo celular, a dosagem de ROS intracelular, análise da SOD, além de outros testes. Foram obtidos resultados promissores, que mostraram a eficácia do composto ao diminuir a atividade das EROs, normalizar a atividade da via NFR-2/ARE, bem como os efeitos do fulerol nesse contexto para corroborar e aprimorar os resultados anteriormente obtidos.

Palavras chaves: ZIKA VIRUS; ESTRESSE OXIDATIVO; ANTIOXIDANTES; FULEROL

Abstract

Zika fever is a severe acute illness caused by the *Zika virus*, belonging to the Flaviviridae family, which is transmitted primarily by the bite of *Aedes aegypti* mosquitoes. In in vitro assays, an increase in levels of reactive oxygen species (ROS) is observed following infection as a cellular defense strategy. However, simultaneously with ROS production, cells produce antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) to counterbalance ROS production, as excess ROS can lead to cellular oxidative stress. Understanding the dynamics of ROS production in infected cells, as well as the cellular antioxidant response, is important for comprehending the significance of this response in viral replication so that new therapeutic approaches can be developed. Particularly, antioxidant compounds like fullerene, a carbon sphere linked to hydroxyls, which function to scavenge ROS generated by infection. Preliminary data from our research group have suggested that fullerene is capable of restoring redox balance and reducing viral replication. Therefore, in this study, we evaluated ROS production and the action of antioxidant enzymes in ZIKV-infected cells, analyzing the cytotoxicity of fullerene in the cellular model, intracellular ROS dosage, SOD analysis, among other tests. Promising results were obtained, showing the effectiveness of the compound in decreasing ROS activity, normalizing the activity of the NFR-2/ARE pathway, as well as the effects of fullerene in this context to corroborate and enhance previously obtained results.

Key words: ZIKA VIRUS; OXIDATIVE STRESS; ANTIOXIDANTS; FULLEROL

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo de multiplicação dos flavivírus.....	11
Figura 2: Principais vias de geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	15
Figura 3: Viabilidade celular após tratamento com fulerol por 48horas em células VERO e MRC-5	27
Figura 4: Viabilidade celular após tratamento com fulerol por 48horas em células J774A.1.....	28
Figura 5: Efeito na produção de EROs em células VERO após infecção com ZIKV tratadas com fulerol.....	29
Figura 6: Produção de EROs após tratamento com diferentes esquemas terapêuticos de Fulerol em infectada com ZIKV e CHIKV por 24 horas.....	30
Figura 7: Atividade antioxidante de diferentes esquemas terapêuticos de Fulerol [3,125nM] em J774A.1 infectada com ZIKV por 24 horas.....	31
Figura 8: Atividade transcricional de NRF-2 em células VERO infectadas com ZIKV após tratamento com fulerol.....	32
Figura 9: Atividade de SOD em J774A.1 infectada com ZIKV.....	33
Figura 10: Dosagem da peroxidação lipídica por TBARs em J774A.1 infectada com ZIKV.....	34
Figura 11: Dosagem da peroxidação lipídica por TBARs em J774A.1 infectada com ZIKV.....	34

Sumário

1. INTRODUÇÃO	7
1.1 ARBOVÍRUS	7
1.2 FAMÍLIA FLAVIVIRIDAE, GÊNERO FLAVIVÍRUS	8
1.2.1 <i>O Zika virus</i>	10
1.2.2 <i>Diagnóstico, tratamento e profilaxia</i>	10
1.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E ESTRESE OXIDATIVO	11
1.3.1 <i>Sistemas de defesa antioxidantes</i>	14
1.4 FULEROL	14
2. OBJETIVO	16
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 CÉLULAS C6/36, J774A.1 E VERO	17
3.2 ORIGEM E MULTIPLICAÇÃO DO ZIKV	18
3.3 TITULAÇÃO DO ESTOQUE VIRAL	18
3.4 FULEROL	19
3.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	19
3.6 ENSAIO DE DOSAGEM DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO INTRACELULAR	20
3.7 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	21
3.8 NÍVEIS DE SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	22
3.9 PROTEÍNA CARBONILADA	23
3.10 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS	24
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
5. CONCLUSÃO	33

1. Introdução

1.1 Arbovírus

A infecção pelo *Zika virus* (ZIKV) tem sido associada a uma série de complicações de saúde, incluindo danos ao sistema nervoso, microcefalia em bebês e complicações neurológicas em adultos. Uma das formas pelas quais o ZIKV causa danos é através da indução do estresse oxidativo nas células hospedeiras. O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante das células, levando a danos celulares e inflamação.

Os arbovírus, abreviação de *arthropod-borne viruses*, são um grupo diversificado de vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos e carrapatos, e que vem representando uma importante ameaça à saúde pública global nas últimas décadas. Hoje em dia, eles constituem o maior grupo conhecido de vírus, com mais de 500 membros registrados no “*International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates*”, e pelo menos 140 causam doenças em humanos (CDC, 2020). Esses vírus são responsáveis por causar problemas em humanos e animais, incluindo febres hemorrágicas, encefalites e doenças virais como a dengue, febre amarela, zika, chikungunya e encefalite transmitida por carrapatos. A transmissão dos arbovírus ocorre quando um artrópode vetorial, como um mosquito ou carrapato, se alimenta de um hospedeiro infectado e depois transmite o vírus para outro hospedeiro durante uma alimentação subsequente. Após a ingestão do sangue infectado, o vírus se replica nas células do artrópode vetor. Dependendo do tipo de arbovírus e do vetor específico envolvido, o vírus pode se disseminar para várias partes do corpo do vetor, como as glândulas salivares em mosquitos. (KAUFFMAN, EB.; KRAMER, LD., 2017).

Quando o artrópode vetor infectado se alimenta novamente, ele pode transmitir o vírus para um novo hospedeiro vertebrado, injetando saliva durante a picada. O vírus presente na saliva do vetor entra na corrente sanguínea do novo hospedeiro, estabelecendo assim uma nova infecção. Em muitos casos, os arbovírus podem ser amplificados em populações de hospedeiros vertebrados, onde são replicados em altas concentrações. Isso pode aumentar a probabilidade de transmissão para outros vetores quando se alimentam desses hospedeiros amplificadores. O ciclo de transmissão continua à medida que os artrópodes vetores infectados continuam a se alimentar de hospedeiros vertebrados e a transmitir o vírus. Isso pode levar à disseminação geográfica do vírus e à manutenção do ciclo de transmissão em populações de artrópodes e

hospedeiros (Kramer, & Ciota.,2015). Esse ciclo de transmissão entre vetores e hospedeiros vertebrados é fundamental para a manutenção e propagação desses vírus na natureza. Em seu trabalho, Braack et al., 2018 mostra a relação do homem com o aumento das arboviroses, visto que o aumento populacional, da cidade, e de viagens internacionais, acabam facilitando a propagação do vírus em pouco tempo.

Os arbovírus possuem genomas variados, que podem ser compostos por RNA de cadeia simples ou dupla, e geralmente são relativamente pequenos em comparação com outros tipos de vírus. Seus genomas codificam proteínas essenciais para sua replicação, montagem e interação com o hospedeiro (Moudy, R. M., & Meagher, M. W. (2021). Os arbovírus, pertencem a várias famílias virais, sendo as principais: Família *Flaviviridae*, que abrange vários arbovírus importantes, como o vírus da febre amarela, vírus da dengue, vírus Zika e vírus da encefalite japonesa. A família *Togaviridae*, que inclui o gênero *Alphavirus*, contendo os vírus Mayaro, encefalite equina oriental e Chikungunya, a Família *Peribunyaviridae*, a qual pertence o vírus Oropouche (FIGUEIREDO., 2007). No presente estudo, utilizaremos o ZIKV, pertencente à família *Flaviviridae*.

1.2 Família *Flaviviridae*, Gênero *Flavivírus*

A família *Flaviviridae*, é uma família de vírus envelopados, com genoma de RNA de fita simples, e polaridade positiva.

Esta família é formada por quatro gêneros principais: *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e os *Flavivirus*, que inclui vírus de importância para a saúde pública, tais como o *Dengue vírus*, *Zika virus*, *Yellow fever virus*, dentre outros (Leur et al., 2021).

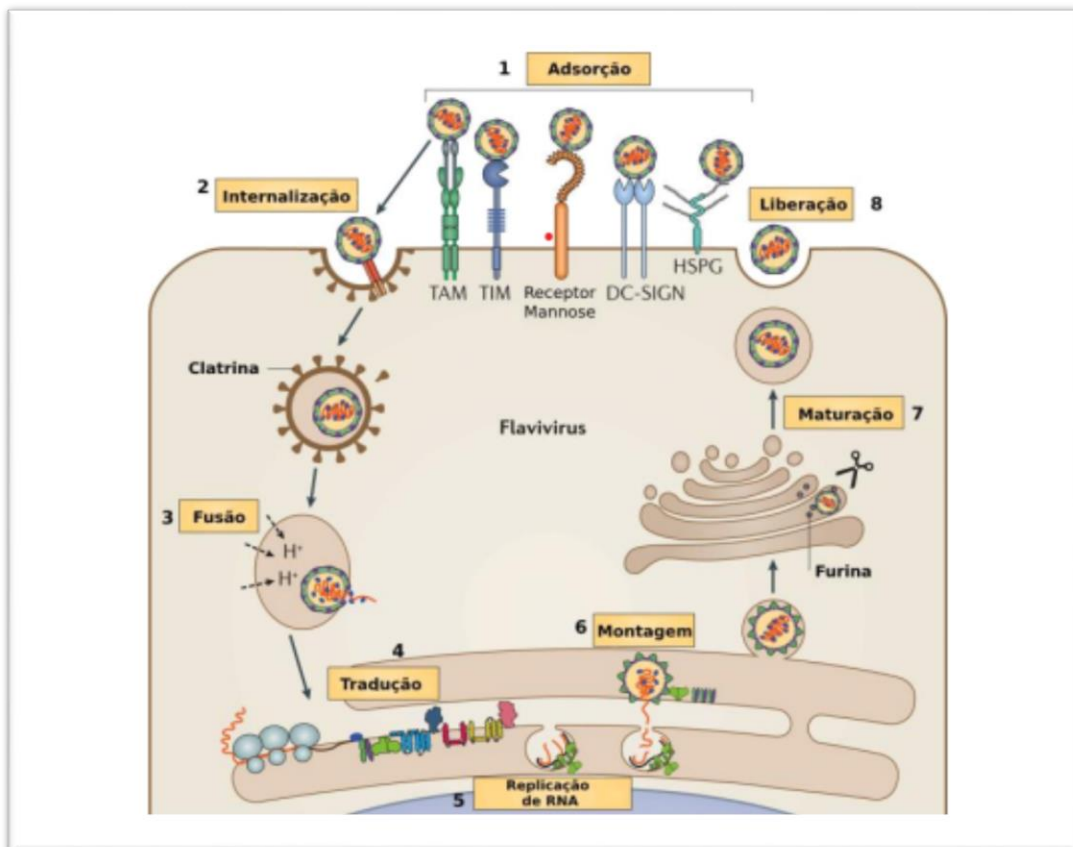
O gênero *Flavivírus* é formado por 65 espécies de vírus, cujo tamanho variam de 40 a 50 nanômetros de diâmetro, eles possuem duas glicoproteínas de superfície importantes em sua membrana, conhecidas como proteína de envelope (E) e proteína de membrana (M). (Westaway et al., 1985). A proteína E, é a principal responsável pela interação do vírus com as células hospedeiras, e é essencial para a entrada viral, a proteína M também desempenha um papel na montagem dos vírions, já a proteína do capsídeo (C), é composta por proteínas estruturais que formam um invólucro que protege o material genético viral. (Westaway et al., 1985).

Ao se ligar à superfície da célula, há uma interação entre as proteínas virais e os receptores presentes na membrana celular e induz um processo de endocitose, em seguida, após a redução do pH após a fusão com lisossomos, ocorre uma fusão das membranas da partícula viral e dos

endossomos que resultam liberação do capsídeo no citoplasma, a seguir, o material genético é traduzido na superfície do retículo endoplasmático, nessa organela, vai se traduzir uma poliproteína que em seguida é clivada por proteases celulares e celulares, desta clivagem são geradas as proteínas estruturais mencionadas anteriormente e proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que participam nos processos de replicação e evasão viral (Zhao et al., 2021).

Todas estas proteínas exercem funções na replicação do genoma viral, na montagem das partículas. Os vírus imaturos seguem pela via de secreção celular e são liberados no meio extracelular na sua forma madura. A esquematização do ciclo de multiplicação dos flavivírus pode ser observada na Figura 1.

Figura 1: 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

1.2.1 O Zika virus

A febre do zika é uma doença endêmica de países tropicais, como o Brasil, é transmitida por um vetor artrópode, da família *Culicidae* e gêneros *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. O vírus Zika foi identificado pela primeira vez em macacos na Floresta Zika, em Uganda, em 1947, durante um estudo sobre a febre amarela, o primeiro caso documentado em humanos ocorreu em 1952 na Nigéria, desde então, o vírus Zika tem sido associado a surtos esporádicos em várias regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e Pacífico (DUFFY et al., 2009).

O vírus Zika ganhou maior atenção global após um surto na Ilha Yap, na Micronésia, em 2007, onde foram registrados muitos casos da doença, o vírus se espalhou para outras ilhas do Pacífico e, posteriormente, para as Américas, onde ocorreram surtos significativos em vários países, incluindo Brasil, Colômbia, El Salvador e outras nações da América Latina e Caribe, os primeiros casos de Zika nas Américas foram registrados no Brasil em 2015 (DUFFY et al., 2009). Desde então, o vírus se espalhou rapidamente para outros países da região e também foi associado a casos de microcefalia congênita em recém-nascidos de mães infectadas durante a gravidez, bem como a outros distúrbios neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barré, além disso, a febre geralmente também é caracterizada por sintomas leves que podem incluir febre baixa, dor nas articulações, dor de cabeça, conjuntivite não purulenta, erupção cutânea maculopapular e sintomas inespecíficos semelhantes aos da gripe. (BHARDWAJ, U et al., 2021).

1.2.2 Diagnóstico, tratamento e profilaxia

O diagnóstico do vírus Zika é baseado na história clínica do paciente, sinais e sintomas característicos da doença, além de exames laboratoriais específicos. Os sintomas comuns incluem febre baixa, erupção cutânea, conjuntivite, dor nas articulações e dor de cabeça, no entanto, esses sintomas são inespecíficos e podem ser confundidos com outras arboviroses, como dengue e Chikungunya (KARKHAH, A et al., 2018.). As técnicas de diagnóstico incluem a detecção de RNA viral por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em amostras de sangue, urina ou saliva, e a sorologia para detecção de anticorpos específicos contra o vírus Zika, testes de diagnóstico rápido baseados em técnicas imunocromatográficas também estão disponíveis para a detecção de anticorpos específicos contra o vírus Zika, esses testes são rápidos, simples de executar e podem ser realizados no local de atendimento ao paciente, permitindo resultados

rápidos em ambientes com recursos limitados. O diagnóstico preciso do vírus Zika é essencial para orientar o tratamento adequado, monitorar a disseminação da doença e implementar medidas de controle e prevenção. Os métodos de diagnóstico disponíveis, desempenham um papel crucial na detecção e caracterização da infecção pelo Zika, bem como são essenciais para o prognóstico da doença (Lanciotti, 2008).

A profilaxia do vírus Zika é uma parte essencial das estratégias de saúde pública para prevenir a disseminação da doença. Várias medidas de profilaxia são recomendadas para reduzir o risco de infecção, como o controle de mosquitos Aedes, responsáveis pela transmissão do vírus Zika, isso inclui a eliminação de criadouros de mosquitos, como recipientes de água parada, limpeza de áreas de reprodução de mosquitos e uso de inseticidas para reduzir a população de mosquitos adultos, o uso de repelentes de insetos também é recomendado para reduzir as picadas de mosquitos. Repelentes contendo DEET, icaridina ou óleo de eucalipto citriodora são mais eficazes na proteção contra o Aedes. (FAUCI et., al 2016)

A educação da população sobre as medidas de prevenção do vírus Zika também desempenha um papel crucial na redução do risco de infecção, para mulheres grávidas ou aquelas que planejam engravidar, medidas adicionais de proteção são recomendadas, isso inclui o uso de preservativos para prevenir a transmissão sexual do vírus e, evitar viagens para áreas com transmissão ativa do Zika durante a gravidez (World Health Organization, 2016). Atualmente, não há tratamento específico para a infecção pelo vírus Zika, isso se deve principalmente à complexidade do vírus e à falta de conhecimento detalhado sobre sua biologia e patogênese, tornando difícil a elaboração de imunizantes eficazes e seguros (MORABITO, K M.; GRAHAM, B S., 2017).

1.3 Espécies reativas de Oxigênio (EROS) e estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROS) são moléculas altamente reativas que contêm oxigênio, como os radicais livres, peróxidos e superóxidos (RIBEIRO et al., 2015). Elas desempenham um papel importante no sistema imunológico, como uma defesa a infecções, como a do ZIKV. Quando um organismo é infectado por um vírus, o sistema imunológico é ativado para combater a infecção, e então as espécies reativas de oxigênio são produzidas pelas células do sistema, como os macrófagos e neutrófilos. Em mamíferos, elas são produzidas de forma enzimática e não enzimática, as enzimas mais importantes são as NADPH oxidases (adenine 11 dinucleotide phosphate oxidase), mas outras também são responsáveis por essa

produção como Ciclo-oxigenases, citocromo P450, lipoxigenases, óxido nítrico sintase, e xantina oxidase, e redutases (PILLAI et al., 2019).

A geração regulada dessas moléculas altamente reativas tem a capacidade de danificar o material genético viral, inativar partículas virais, regular citosinas e fatores de crescimento e modular a resposta imunológica (AGUIRRE; LAMBETH, 2010; GEISZT; LETO, 2004). Além disso, as EROs desempenham um papel importante na ativação de vias de sinalização intracelular, uma vez que são produzidas por células quando estimuladas, tem ação na célula onde é produzida ou em células próximas, e quando removidas do meio, revertem o sinal (RIBEIRO et al., 2006). Essas vias de sinalização promovem a expressão de genes antivirais e a produção de citocinas pró-inflamatórias, essenciais para coordenar a resposta imune adaptativa.

O Ânion Radical superóxido, que é um radical livre originado da adição de um elétron ao oxigênio molecular, é uma das três principais espécies reativas de oxigênio. Sua formação se dá de forma natural na maioria das células que precisam de oxigênio para respirar. O segundo, o radical hidroxila, é o mais reativo e oxidante em sistemas biológicos, é gerado pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss, na presença de um metal de transição, como o ferro (Fe) ou cobre (Cu) (Pastor et al., 2000). Por fim, há também o Peróxido de hidrogênio, que apesar de não ser um radical livre, é um metabólito deletério do oxigênio, participa como intermediário na reação que produz o radical hidroxila, além de possuir vida longa e ser capaz de atravessar membranas (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001) (Figura 2).

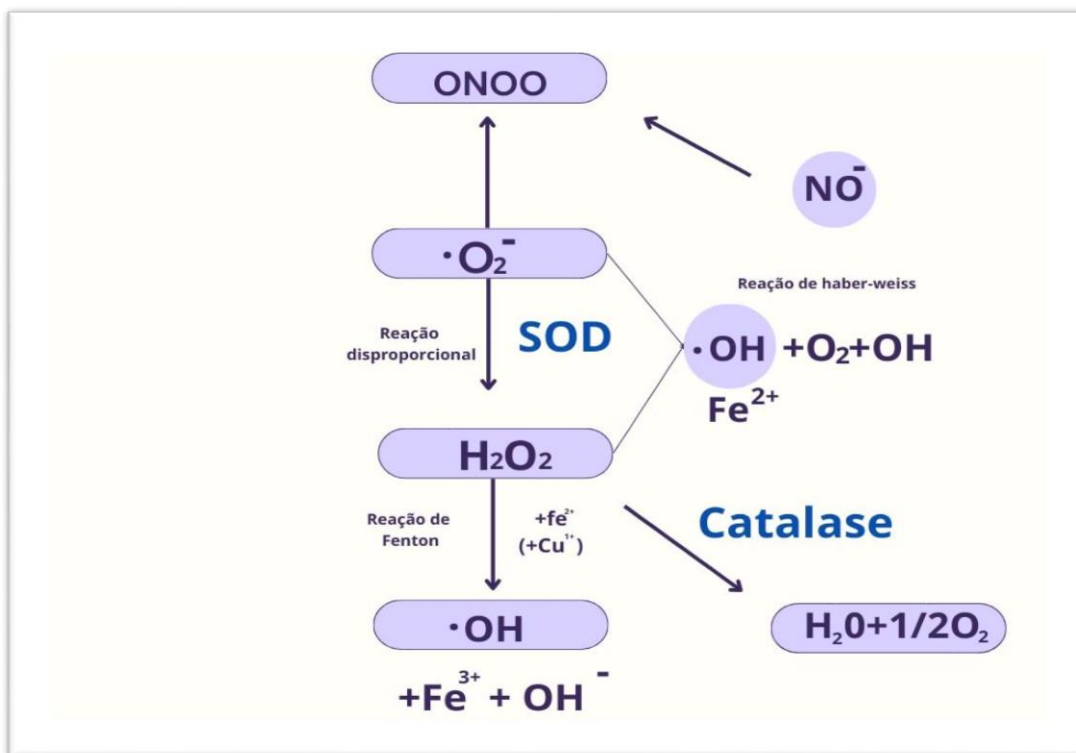
Quando presentes em quantidades substanciais, as espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenham um papel crucial como moléculas de sinalização celular, oferecendo proteção às células, no entanto, a produção excessiva de EROs pode acarretar no estresse oxidativo que pode ser prejudicial para as células, levando a peroxidação das macromoléculas biológicas como os ácidos nucleicos, resultando em degeneração do DNA, lipídios, ocasionando oxidação lipídica, e proteínas, levando à degeneração das proteínas da membrana. Além disso, também pode causar danos ao material genético, tecidos do corpo, e até levar à morte celular (silva et. al 2011).

Esses danos oxidativos podem desencadear uma cascata de eventos que contribuem para a patogênese da doença, incluindo inflamação exacerbada, disfunção endotelial, lesão tecidual e apoptose celular, além disso, o estresse oxidativo induzido pela infecção por Flavivírus pode suprimir a resposta imune do hospedeiro, comprometendo a capacidade do organismo de

combater a infecção de forma eficaz, isso pode resultar em uma resposta imune inadequada, prolongando a duração e a gravidade da infecção viral.

Para compensar a produção de EROS, a célula utiliza mecanismos de defesa antioxidantes para evitar a ação prejudicial das espécies reativas. Os antioxidantes são moléculas que ajudam a neutralizar as EROS e protegem as células do estresse oxidativo, esse sistema se divide em enzimático e não-enzimático. Alguns exemplos de antioxidantes não enzimáticos são o ácido ascórbico, o tocoferol, ubiquinonas, ácido úrico, ácido α -lipoico, zinco, taurinas, hipotaurinas, glutationas, betacaroteno e caroteno (Maia, 2006; Nordberg e Arnér, 2001). Os antioxidantes enzimáticos, também são conhecidos como antioxidantes naturais, se podem citar duas principais, Superóxido dismutase (SOD) e a Catalase (CAT).

Figura 2: Principais vias de geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs): O processo de redução sequencial do oxigênio resulta na formação de EROs, destacando-se a superóxido dismutase (SOD) na conversão do superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). A enzima catalase é responsável pela decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. São apresentadas as ocorrências de desproporção, Harber-Weiss e Fenton. As principais EROs incluem ânion superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e peroxinitrito (ONOO^-).



Fonte: Adaptado de KAYAMA *et al.*, 2015

1.3.1 Sistemas de defesa antioxidantes

O sistema de defesa antioxidante é uma rede complexa de mecanismos e moléculas que trabalham em conjunto para proteger as células contra os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e outros oxidantes. A enzima superóxido dismutase desempenha um papel fundamental na proteção das células contra os danos causados pelos radicais livres, especialmente o ânion radical superóxido (O_2^-), que é uma espécie reativa de oxigênio altamente tóxica. A SOD então, dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é menos tóxico do que o ânion superóxido e pode ser mais facilmente neutralizado por outras enzimas antioxidantes, como a catalase e a glutatona peroxidase. Já a enzima Catalase, é responsável por acelerar a decomposição do peróxido de hidrogênio em água (H_2O) e oxigênio (O_2), além disso, também impede a formação do radical $OH\cdot$ (HALLIWELL, 2007). A CAT, localiza-se no peroxissoma, organela responsável pela desintoxicação celular e oxidação de ácidos graxos de cadeia longa.

Os antioxidantes de origem não enzimática podem surgir endogenamente, como no caso da glutatona, ou serem obtidos por meio da alimentação, incluindo vitaminas como a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol), carotenoides, antocianinas, polifenóis e ácido úrico (Halliwell et al., 1994; Lushchak, 2014).

Como visto, as espécies reativas de oxigênio, apesar de serem de extrema importância para combater qualquer fator que possa ser prejudicial à célula, como a infecção por partículas virais, necessita-se de enzimas antioxidantes, quando esse sistema antioxidante não está conseguindo ser suficiente para compensar a ação das espécies reativas, a célula sofre um estresse oxidativo, que pode levar ao aumento de resposta inflamatória e morte celular. Diante disso, o uso de materiais com propriedades antioxidantes é importante para manter o equilíbrio redox (KIM, et al., 2021; CAMINI, et al., 2018; PEREIRA, S.H., 2020.).

1.4 Fullerol

O fullerol, também conhecido como fulereno hidrossolúvel, é uma molécula derivadas do fulereno, uma forma alotrópica de carbono que possui uma estrutura geométrica esférica ou cilíndrica, compostas por átomos de carbono ligados de forma hexagonal e pentagonal, formando uma rede tridimensional fechada. Atualmente, eles estão sendo amplamente utilizados na medicina e na biotecnologia devido às suas propriedades antioxidantes, sobretudo em concentrações baixas (SEMENOV, K. N. *et al.*, 2016).

O fulereno mais conhecido é o C₆₀, que possui 60 átomos de carbono e uma forma semelhante a uma bola de futebol. Já o fulerol [C₆₀OH₍₂₂₋₂₄₎] é um derivado do fulereno, no qual os átomos de hidrogênio presentes na superfície dos fulerenos são substituídos por grupos hidroxila (-OH). O fulerol tem despertado interesse devido às suas propriedades antioxidantes, estabilidade química, baixa citotoxicidade e alta capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio. Além disso, sua estrutura molecular única permite que o fulerol atue como um agente de entrega eficaz, capaz de transportar cargas terapêuticas para tecidos específicos do corpo, proporcionando uma abordagem direcionada e eficiente para o tratamento de doenças (GREBINYK *et al.*, 2019).

Estudos já demonstraram sua ação antiviral e seu potencial em modular a via do Fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NRF-2) (DING, M. *et al.*, 2020; PEREIRA, S.H., 2020).

O papel do sistema redox na patogênese viral ganha relevância, uma vez que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na progressão da infecção. A falta de estratégias terapêuticas eficazes para o tratamento da doença do *Zika virus*, representa um desafio significativo para a saúde pública. Sendo assim, o Fulerol, vem como uma estratégia potencial na terapêutica para atenuar o estresse oxidativo induzido pela infecção do *Zika virus*. Portanto, sua administração durante a infecção pelo *Zika vírus* pode ajudar a modular a resposta inflamatória e reduzir a gravidade dos sintomas associados à doença. Sendo assim, investigar o efeito dessa molécula pode fornecer resultados importantes para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e intervenções preventivas para a infecção do *Zika virus*, contribuindo assim para melhorar os resultados clínicos e reduzir o impacto da doença na saúde pública global.

2. Objetivo

Avaliar o efeito do Fullerol em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo vírus do Zika, em células.

2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer e titular as alíquotas do ZIKV para estudo.
- Determinar a citotoxicidade do fullerol em células J774A.1.
- Avaliar os níveis de EROS em células Infectadas por ZIKV e avaliar os efeitos do tratamento com fullerol.
 - Quantificar os níveis de biomarcadores de dano a peroxidação de proteínas (proteína carbonilada).
 - Determinar os níveis de peroxidação lipídica por TBARS (Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).
 - Avaliar a atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD)

3. Materiais e Métodos

3.1 Células C6/36, J774A.1 e VERO

Células da linhagem C6/36, aderentes de mosquitos *Aedes Albopictus*, obtidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC), cultivadas em meio *Leibowitz* (L15) (Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e antibióticos Penicilina/Estreptomicina (200 U/mL) (Sigma-Aldrich) e Anfotericina B (2,5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), incubadas a 28°C em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD). A linhagem foi utilizada para replicação do vírus Zika, devido sua susceptibilidade (DANGSAGUL, W et al., 2021).

Células da linhagem J774A.1, aderentes, originárias de macrófagos de murino (*Mus musculus*), obtidas pela *American Type Culture Collection* (ATCC), cultivadas em meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco com alto nível de glicose (DMEM-HG, Sigma-Aldrich), suplementado com 10% de SFB (Gibco), antibióticos Penicilina/Estreptomicina (200 U/mL) (Sigma-Aldrich) e Anfotericina B (2,5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), suplementados com L-Glutamina (4mM/mL) (Sigma-Aldrich). esta linhagem foi aplicada na avaliação de citotoxicidade do fulerol, dosagem de EROs intracelular e para as dosagens de estresse oxidativo celular.

Células da linhagem VERO, aderentes, de rim de *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano), gentilmente cedidas pelo professor Mauro Teixeira do departamento de bioquímica da UFMG, foram cultivadas em meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco com alto nível de glicose (DMEM-HG, Sigma-Aldrich), suplementado com 5% de SFB (Gibco) e antibióticos Penicilina/Estreptomicina (200 U/mL) (Sigma-Aldrich) e Anfotericina B (2,5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), a linhagem foi utilizada para a titulação do ZIKV.

As linhagens celulares foram mantidas segundo a ATCC, a J774A.1 foi mantida 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, e a linhagem VERO foi mantida em estufa de atmosfera umidificada, a 37°C e 5% de CO₂. Para manutenção as células eram repicadas entre 3 a 5 dias, lavadas com tampão salino-fosfato (PBS) (10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 140mM NaCl, 3mM KCl, pH 7,2), as células eram desprendidas da monocamada por ação enzimática da tripsina, sendo realizados repiques com taxas de subcultivo de 1:2 a 1:6.

Os estoques celulares foram preparados a partir de um pool de células, com adição de 10% de DMSO, 20% de SFB e 70% de meio de cultura para a J774A.1 e VERO e 10% de DMSO e

90% de SFB para a célula C6/36. As alíquotas foram armazenadas em criotubos de 1,6 ml em nitrogênio líquido, cada criotubo contém cerca de 5×10^6 células, sendo separados em pool semente e pool trabalho, todas as linhagens foram testadas para a presença de mycoplasma. Esses testes foram feitos por meio da PCR convencional utilizando primer específico para mycoplasma e gel de agarose com brometo de etídio para visualizar a banda de DNA amplificada.

3.2 Origem e multiplicação do ZIKV

As amostras de ZIKV (ZIKA/H. sapiens/Brazil/PE-243/215/GenBank:KX197192), com origem de um paciente sem complicações clínicas, no estado de Pernambuco – Brasil, gentilmente cedida pela professora Dra. Erna Geessien Kroon do Laboratório de Vírus (UFMG) (SisGen access AF85085). Foram utilizadas alíquotas de 2ª passagem, utilizou-se uma garrafa média (75cm^2) com células C6/36 preparadas 24 horas antes, adicionou-se o ZIKV em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 (vírus/célula). Incubou-se a garrafa por 1 hora em estufa BOD (28 °C), agitada a cada 10 minutos para adsorção viral, após o período adicionou-se meio L-15 suplementado com 1% de SFB em um volume final de 12ml. Após 7 dias em estufa BOD (28 °C), o meio de cultura da garrafa foi coletado e clarificado por centrifugação (5 minutos, 3000g a 4 °C), o sobrenadante foi coletado e armazenado em alíquotas em microtubos de 200ul a -80 °C.

3.3 Titulação do estoque viral

A titulação do ZIKV foi feita pelo método de contagem de placas de lise (PFU), desenvolvidos por Dulbecco (1952).

Foram preparadas replicadas de placas de 6 poços, com confluência de 90% (1×10^6 células/poço) de células VERO. Em cada placa havia um controle negativo e 5 diluições da alíquota viral (10^{-3} a 10^{-7}). A adsorção do vírus ocorreu em estufa por 1 hora, com agitação a cada 10 minutos, em seguida a suspensão de vírus foi removida e adicionou-se 2mL de meio RPMI suplementado com 2,5% de SFB e adição de carboximetilcelulose 1,5% (CMC). Após o período de 5 dias em estufa, adicionou-se formol 10% em cada poço, até a total cobertura, por 30 minutos a 1 hora, para fixação da camada celular, em seguida foi feita a lavagem das placas em água corrente, logo após a monocamada celular foi corada com cristal violeta após um

período de secagem foi realizada a contagem das unidades formadoras de placa (PFU) (DULBECCO, R., 1952). O título viral foi expresso pela equação 1:

$$\text{Título viral } \left(\frac{\text{PFU}}{\text{mL}} \right) = n \times fc \times 10^d \quad (1)$$

Onde, **n** é o número de unidade de lise médio entre as duas placas, obtido pela contagem no poço em que a diluição viral apresentava entre 30 e 300 placas, **fc** é o fator de correção do volume convertido para mL e **d** é o inverso da diluição relativa ao poço utilizado na contagem.

Para o ZIKV 2ª passagem o título expresso foi de $3,4 \times 10^9$ UFP/mL.

3.4 Fulerol

O Fulerol [$C_{60} OH_{(22-24)}$] foi sintetizado a partir da polihidroxilação do fulereno (C60), esta modificação confere ao fulereno solubilidade e redução significativa de sua toxicidade. O estoque de fulerol foi sintetizado e fornecido por colaboradores do laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG. O fulerol liofilizado foi diluído em água para injeção, na concentração final de 1 mM, foi sonificado por 30 minutos, em seguida as alíquotas foram armazenadas em tubos plásticos estéreis, âmbar, protegidos da luz, à -20°C. Antes do uso o composto era colocado novamente em banho ultrassônico por 30 minutos para homogeneização do composto.

3.5 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade do fulerol em células J774A.1, foi empregado o método de redução de tetrazólio utilizando o MTT [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5 - difeniltetrazol], o método consiste na mensuração da quantidade de MTT reduzido à formazan, um cristal insolúvel de coloração roxa, por células viáveis.

Células J774A.1, foram semeadas em placas de 96 poços a confluência de 90% (4×10^4 células/poço), incubadas por 24 horas em estufa 37°C com 5% de CO₂. Após o período de adesão, o meio foi removido, a monocamada foi lavada com PBS e adicionou-se o fulerol diluído em meio de cultura na concentração de [3,125 nM], para o grupo de tratamento único (T0), para o grupo de múltiplas doses (T6) foi adicionado uma primeira dose de fulerol [3,125 nM], seguido da troca por um novo meio contendo [3,125 nM] do mesmo a cada hora, por um período de 6 horas, totalizando ao fim 7 adições de fulerol. Após a adição do fulerol as placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ até completar 24 horas. Após o tempo de tratamento o meio foi retirado e adicionou-se 30µl de MTT (2mg/mL – Sigma-Aldrich) por poço, seguido de incubação em estufa, protegido da luz, por 90 minutos. Após o período de incubação foi adicionado 100 µl DMSO por poço, em seguida as placas foram colocadas sob agitação leve por 15 minutos para completa solubilização. A quantidade de formazan gerado foi mensurado pelo leitor de microplacas VICTOR X3 (PerkinElmer) por leitura de absorbância a 490 nm. Os resultados de viabilidade foram expressos em relação ao controle de células não tratadas com fulerol (CC).

3.6 Ensaio de dosagem de espécies reativas de oxigênio intracelular

A Dosagem de EROs foi realizada através do marcador fluorogênico 5',6'- carboxi-2',7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (Carboxi - H₂DCFDA), a sonda, quando oxidada por EROs, principalmente H₂O₂, é convertido em uma molécula diclorofluoresceína altamente fluorescente (DCF), que pode ser mensurada na excitação de 485 ± 10 nm e emissão de $530 \pm 12,5$ nm.

Para a dosagem de EROs intracelular foram preparadas placas pretas de fundo transparente de 96 poços (4×10^4 células/poço) com células J774A.1 incubadas por 24 horas para adesão. Após o período de adesão as células foram lavadas com solução balanceada de Hank's (HBSS) [0,4 g/L KCl; 0,09 g/L Na₂HPO₄.7H₂O; 0,06 g/L KH₂PO₄; 0,14 g/L CaCl₂; 0,10 g/L MgCl₂.6 H₂O; 1,0 g/L C₆H₆O₁₂; 0,35 g/L NaHCO₃; 8g NaCl; q.s.p H₂O milli-Q], gota a gota para evitar desprendimento da monocamada celular, em seguida foram realizados os tratamentos e infecção viral. Após o período de tratamento, as células foram lavadas novamente com HBSS, adicionou-se 25 µM da sonda diluídas em meio de cultivo ou HBSS por 45 minutos, mantidas ao abrigo da luz na estufa. Após o período de incorporação da sonda, as células foram lavadas com HBSS, para remoção do excesso de sonda, os poços foram preenchidos com 100uL de

HBSS fresco, seguindo imediatamente para as leituras de fluorescência. A leitura da fluorescência foi realizada no leitor de placas Victor X3 a 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão), à temperatura de 37°C, uma leitura foi realizada imediatamente após a adição do HBSS fresco (T0), as células foram mantidas por 4 horas na estufa, protegidas da luz, sendo feita então a leitura final (T4). O aumento percentual de fluorescência foi calculado pela equação normalizadora 2:

$$[(Ft_4 - Ft_0)/Ft_0 \times 100] \quad (2)$$

Onde, Ft4 é a leitura da fluorescência no tempo 4 horas e Ft0 é a leitura de fluorescência no tempo 0 (Branco da placa). Para normalização em valores relativos os resultados de cada poço foram divididos pela média do Controle de células negativo (WANG, H; JOSEPH, JA., 1999).

3.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A análise da atividade de SOD foi realizada de acordo com o método de Marklund e Marklund (1974). Esse método é baseado na capacidade da SOD em inibir a auto oxidação do pirogalol, isso resulta em uma relação inversamente proporcional, onde quanto maior a concentração de SOD, menor é a auto oxidação do pirogalol. A SOD compete com o O₂·- formado pela auto oxidação do pirogalol, que é responsável pela redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H] -2,5-difenilterazolio (MTT) a cristais de formazan. Para realizar a leitura, foi utilizado pirogalol a 15 mM, tampão fosfato (K₂HPO₄ e Na₂HPO₄) e MTT a 2,25 mM. Para análise células J774A.1 foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 1x10⁶ por poço e infectadas com ZIKV a uma M.O.I de 5, por 24 horas, um grupo recebeu um tratamento com [3,125nM] de fulerol no momento da infecção, após o período de 24 horas, as células foram lavadas com PBS, adicionou-se tampão fosfato, e com auxílio de um *scraper*, raspadas e transferidas para tubos *Eppendorf*.

Em seguida, foram sonicadas por 10 minutos e congeladas e descongeladas 3 vezes a -80 °C para lise celular, em seguida foram então centrifugadas a 10.000 rpm a 4 °C. Os sobrenadantes foram usados para análise, as amostras foram pipetadas em placas de 96 poços, posteriormente foram adicionadas as soluções de MTT e pirogalol. Em seguida, a placa foi

incubada por 5 minutos a 37°C, logo após 150 µL de DMSO foram adicionados para cessar a reação. Posteriormente, a placa foi lida em espectrofotômetro à 570 nm ou 595nm ± 25nm no equipamento Victor X3 Multilabel (Perkin Elmer). Os resultados foram representados em U/mg de proteína (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

3.8 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em ligar-se a lipídeos oxidados, gerando malondialdeído. Para isso, placas de 6 poços infectadas com ZIKV em M.O.I de 5, sendo um grupo tratado com fulerol a [3,125nM], por 24 horas, foram lavadas com PBS e raspadas com a ajuda de um *scraper*, ressuspensas em 0,51 mL de tampão fosfato e imediatamente sonicadas por 10 minutos e congeladas e descongeladas 3 vezes a -80 °C para lise das células. Em seguida, foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para a leitura. 500 µL do homogenato celular foram misturados com ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em HCL 0,25M), TBA (1% em ácido acético 8,74M) e butil hidroxitolueno (BHT) (0,1% p/v em etanol), aquecido por 15 min a 95° e em seguida colocado em banho de gelo.

O precipitado foi removido por centrifugação a 13000 RPM por 10 minutos a 4° C, e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm de comprimento de onda. Uma curva de calibração com 1,1,3,3-Tetramethoxypropano (TMP) foi realizada. O TMP reage com o TBA em meio ácido formando um complexo estável de cor rosada. Para a construção da curva foi preparada uma solução de 500 µM de TMP, para isso, adicionar 4,2 µL de TMP, 1 mL de etanol e 49 mL de água. A curva foi realizada da seguinte forma:

Pontos da curva	Quantidade de TMP 500 µM (µL)	Quantidade de água (µL)	Concentração (umol/mL)
1	100	900	0,05
2	500	500	0,025
3	500	500	0,0125
4	500	500	0,00625
5	500	500	0,003125

6	500	500	0,001562
7	500	500	0,000781
8	500	500	0,00039
9	500	500	0,000195
10	500	500	0,0000976

Para o branco, foi utilizado água destilada que seguiu o mesmo protocolo das amostras. Os níveis de TBARS foram calculados utilizando a equação da reta. Os resultados foram expressos em nM/mg proteína (BUEGE; AUST, 1978), 10 ul da amostra foram utilizados para dosagem de proteínas totais.

3.9 Proteína carbonilada

Espécies reativas de oxigênio podem reagir com proteínas causando modificação oxidativa de proteínas e formação de compostos carbonílicos, que podem ser detectados por métodos sensíveis. Para a determinação de proteína carbonilada foi utilizado um protocolo adaptado do método descrito por (REZNICK; PACKER, 1994). Para isso, placas de 6 poços infectadas com ZIKV em M.O.I de 5, sendo um grupo tratado com fulerol a [3,125nM], por 24 horas, foram lavadas com PBS e raspadas com a ajuda de um scrapper, ressuspendidas em 0,51 mL de tampão fosfato e imediatamente sonicadas por 10 minutos e congeladas e descongeladas 3 vezes a -80 °C para lise celular. 500 µL do homogeneizado celular foi colocado em tubos de polipropileno e adicionados e 500 µL de ácido tricloro acético (ATC) 10%, misturados no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi misturado com 500 µL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por uma hora e a cada 15 minutos foram misturadas no vórtex. Ao final do período foi acrescentado 500 µL de ATC e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de Dodecil sulfato de sódio (DSS) 6% misturando no vórtex e centrifugando à 10000 rpm por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm. A concentração de proteína carbonilada nas

amostras foi determinada de acordo com a equação de Lambert Beer, obtendo os resultados em nmol/mL, sendo corrigido depois pelo total de proteínas, obtendo o resultado em nMoles/mg de proteína, 10 ul da amostra foram utilizados para a dosagem de proteínas totais.

3.10 Quantificação de proteínas Totais

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (1976), o método é baseado na ligação do Azul de Comassie G-250 às proteínas em um ambiente ácido, gerando uma mudança de coloração proporcional à quantidade de proteínas na amostra, sendo mensurada por espectrofotometria, e calculado pela equação da curva de calibração com BSA. Para tal ,0,01 gramas de albumina (BSA) foram diluídos em 1 mL de água miliQ. Foram retirados 200 µL dessa solução e diluídos em 3,8 mL de água miliQ, resultando em uma concentração de 0,5 mg/mL. Essa solução foi usada para realizar as diluições em série

Diluições seriadas para realizar a curva de albumina Curva diluição mg/mL	Albumina (0,5 mg/mL) uL	H ₂ O uL
0,5	1000	-
0,4	800	200
0,3	600	400
0,2	400	600
0,1	200	800
0,05	100	900

O corante Azul de Comassie foi diluído em uma proporção de 1:5 e pipetou-se 190 uL em cada um dos poços. Em seguida, foram adicionados 10 uL de cada diluição da curva, para cada amostra foi realizada uma diluição de 2 x (10ul de amostra em 10 ul de H₂O), desta diluição foi adicionado 10ul no poço. Para o controle foi utilizado 10ul de. A placa foi incubada por até 45 minutos em temperatura ambiente em *shaker* de baixa velocidade, a leitura foi realizada no leitor de microplacas Victor X3 Multilabel (Perkin Elmer) a 595nm. O resultado foi determinado pela equação da curva, corrigido pela diluição da amostra, expresso em mg/mL.

3.11 Análise estatística

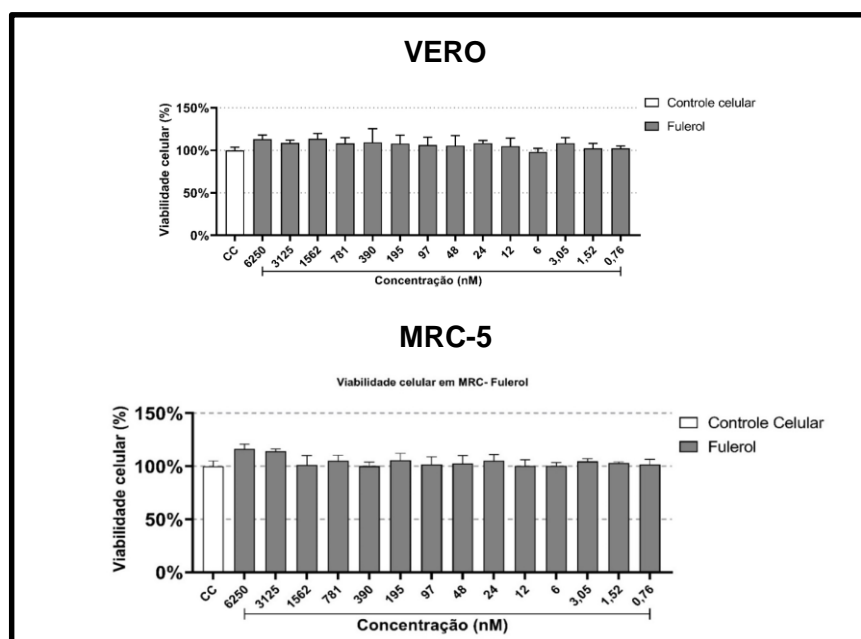
Para as análises estatísticas utilizou-se o Software GraphPad Prism 9, utilizando o One-Way ANOVA com pós teste de Tukey e Dunett com $p < 0,05$, símbolos diferentes representam diferença estatística entre os grupos.

4. Resultados e Discussões

Para análise dos resultados a seguir, foram feitas a todo momento comparações com resultados de estudos feitos anteriormente no nosso laboratório. Como mencionado, em estudos anteriores, os testes foram feitos em um tempo de 48 horas, e em testes atuais foi utilizado um tempo de 24 horas.

Estudos anteriores em nosso grupo demonstraram a citotoxicidade do fulerol em diferentes concentrações e em modelos celulares distintos (PEREIRA, SH., 2020; MALTA, WC., 2023). O fulerol não apresentou efeito sobre a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas, partindo de 6250nM até 0,76nM, em um período de exposição de até 48 horas, com uma única aplicação do fulerol, demonstrando a segurança para o uso do composto em células primatas, como observado na figura 3.

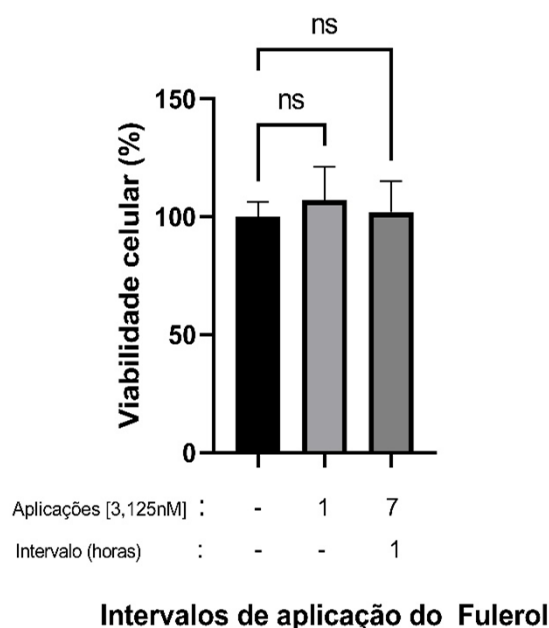
Figura 3: Viabilidade celular após tratamento com fulerol por 48 horas em células VERO e MRC-5. Fulerol nas concentrações de 6250 a 0,76 nM. Não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação ao controle celular para $p < 0,05$, por ne-Way ANOVA com pós teste de Tukey



FONTE: MALTA, W.C., 2023.

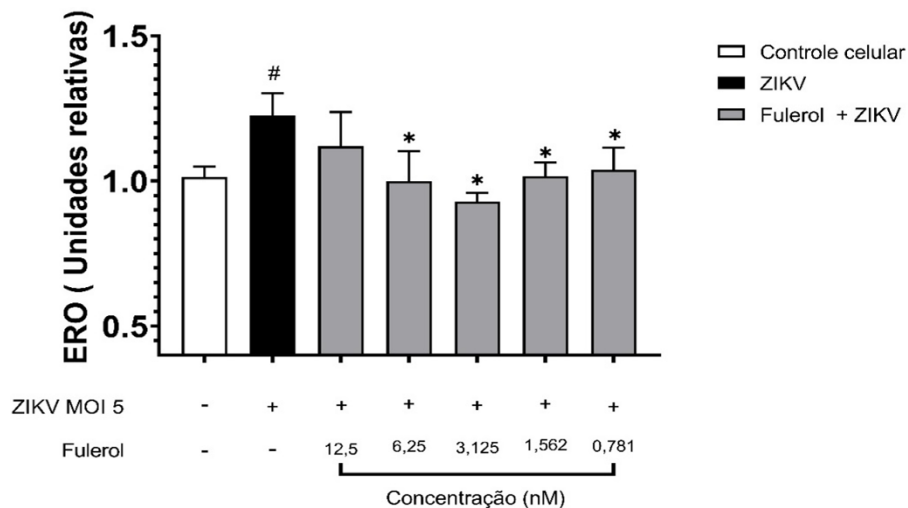
Em estudos recentes, ainda não publicados, de nosso grupo, foram testadas aplicações do fulerol em esquemas terapêuticos novos, repetindo as doses em intervalos de 1 hora, nestes ensaios com células VERO foi demonstrado que mesmo em várias aplicações, não houve redução da viabilidade celular. Neste estudo atual demonstramos o efeito citotóxico do fulerol em células murinas J774A.1, em duas condições de esquemas terapêuticos (T0 e t6) como descritas nos métodos. Como observado na figura 4, a aplicação de mais doses do fulerol não provocou ação citotóxica no modelo de estudo, outras variações das condições terapêuticas foram analisadas em estudos anteriores, não sendo consideradas neste estudo tendo em vista que, a concentração de 3,125nM apresentou a maior ação antioxidante nos estudos de Malta, W.C (2023), além disso o fulerol tende a perder efeito antioxidante em altas concentrações, devido a sua característica de cristalizar (Vranes *et al.*, (2017)). Neste ensaio visando corrigir este problema e avaliar se mais aplicações do composto apresentaria maior ação antioxidante, o meio foi totalmente removido e adicionado um meio fresco com o fulerol a 3,125nM a cada hora pelo intervalo definido. Os resultados demonstram que o fulerol não apresenta citotoxicidade em células J774A.1 em nenhuma das condições testadas, sendo seguro para seguir com a avaliação do efeito antioxidante.

Figura 4: Viabilidade celular após tratamento com fulerol por 48 horas em células J774A.1. O Fulerol foi utilizado na concentração de trabalho definida em estudos anteriores [3,125nM]. Não houve diferença estatística entre os tratamentos em relação ao controle celular para $p < 0,05$, por One-Way ANOVA com pós teste de Tukey.



Em estudos de Malta,WC (2023), foi definido a concentração de fulerol com maior atividade antioxidante, como visto na figura 5.

Figura 5: Efeito na produção de EROs em células VERO após infecção com ZIKV tratadas com fulerol. (*) representa $p < 0,05$, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

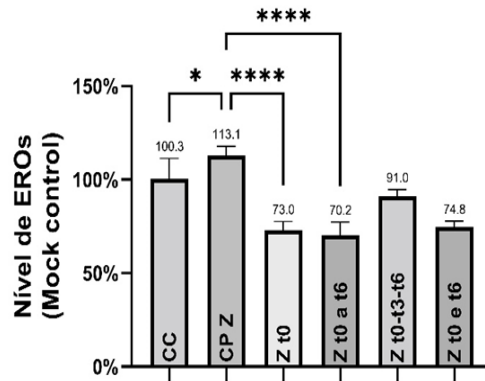


FONTE: MALTA, Wellington Carvalho. 2023

Neste estudo demonstrou-se que em uma única aplicação a concentração de [3,125nM] apresentou a maior capacidade antioxidante frente à infecção pelo ZIKV em modelos celulares. Partindo deste estudo, nosso grupo seguiu para análises de novos esquemas terapêuticos, objetivando avaliar se mais aplicações poderiam trazer maiores níveis de redução de EROs frente à condição usual de uma única aplicação no tempo 0 de infecção. Os testes iniciais de nosso grupo foram o foco de um projeto de iniciação científica anterior, neste estudo foi demonstrado que os grupos T0, condição padrão, e T6, avaliado neste estudo, foram as melhores condições, havendo ainda uma maior atividade antioxidante no esquema terapêutico T6, em infecções pelo vírus Chikungunya, mas não foi observado o mesmo efeito para o ZIKV, como observado na figura 6.

Figura 6: Produção de EROs após tratamento com diferentes esquemas terapêuticos de Fulerol em infectada com ZIKV e CHIKV por 24 horas. As barras representam diferença estatística utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (*) Representa $p < 0,05$; (****) $p < 0,0001$.

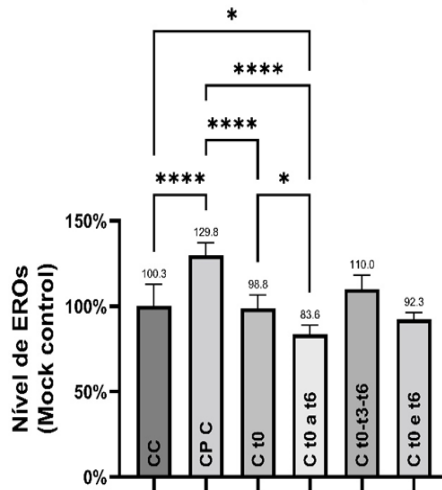
Produção de EROs após tratamento com diferentes posologias de Fulerol em VERO infectada com ZIKV por 24 horas



ZIKV	:	-	+	+	+	+	
Aplicações [3,125nM]	:	-	-	1	7	3	2
Intervalo (horas)	:	-	-	-	1	3	6

Intervalos de aplicação

Produção de EROs após tratamento com diferentes posologias de Fulerol em VERO infectada com CHIKV por 24 horas



CHIKV	:	-	+	+	+	+	
Aplicações [3,125nM]	:	-	-	1	7	3	2
Intervalo (horas)	:	-	-	-	1	3	6

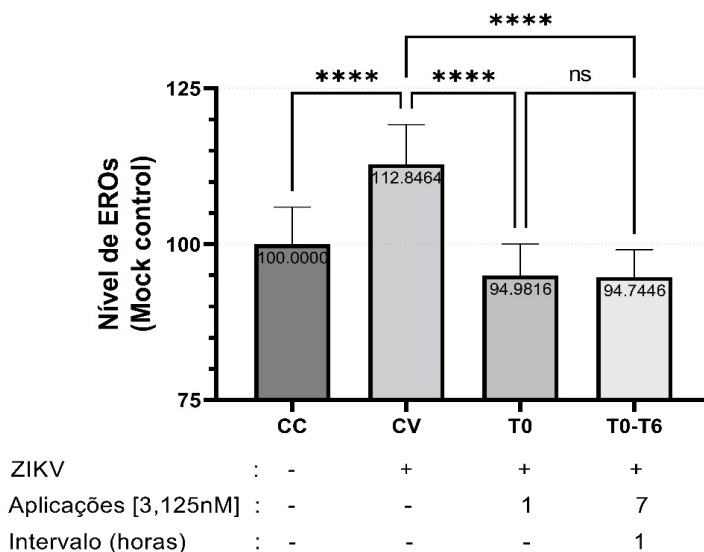
Intervalos de aplicação

FONTE: CUNHA, LP; MALTA, WC. 2023. "Investigação da capacidade antioxidante do fulerol em infecções por Chikungunya Vírus e Zika vírus". Manuscrito não publicado, UFOP, Ouro Preto – MG.

Neste estudo avaliamos os efeitos dos esquemas terapêuticos T0 e T6 em células murinas, em infecções por ZIKV. Além disso, neste trabalho avaliou-se a possibilidade de uma saturação na concentração do fulerol estar causando uma menor redução da capacidade antioxidante na condição T6, sendo assim, a cada nova adição de fulerol foi realizada a remoção do meio antigo seguido da adição do novo meio com o tratamento, evitando assim um acúmulo de fulerol, a condição anterior em que se adicionava somente uma nova dose de fulerol a cada hora, sem troca do meio, também foi avaliado, sendo observado ao fim que não houve diferença significativa entre as duas condições, não sendo considerado para os resultados finais. Os resultados podem ser observados na figura 7.

Figura 7: Atividade antioxidante de diferentes esquemas terapêuticos de fulerol (3,12nM) em J774A.1 infectadas com ZIKV por 24 horas. As barras representam diferenças estatísticas utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Dunett. (****) representa $p < 0.05$;

Nível de ROS de células J774 infectadas por ZIKV e tratadas com Fulerol



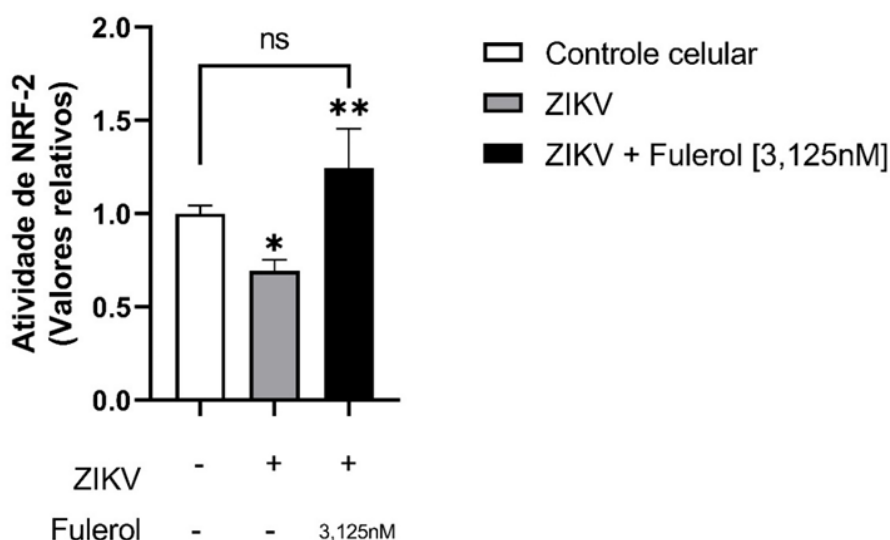
FONTE: Própria autora.

Os resultados demonstraram que o ZIKV foi capaz de aumentar a produção de ROS em aproximadamente 13% em células J774A.1, compatível com o observado anteriormente em VERO e MRC-5 (entre 13 e 35% de aumento) para 24 horas de infecção. O fulerol em ambas as condições foi capaz de reduzir os níveis de EROs em 18% (o fulerol varia entre 18 e 45% de redução de acordo com o modelo celular e o agente estressor), estando significativamente abaixo do controle de células, indicando uma forte ação antioxidante dele. Observa-se ainda

que não houve diferença significativa entre os tratamentos T0 e T6, em células J774A.1 em infecções por ZIKV, acredita-se que a condição T6 possa ser benéfica em condições em que há um aumento agudo superior a 30 % da produção de EROs, como observado na infecção por CHIKV. Dadas as condições, optou-se por utilizar somente a dosologia padrão (T0) para os testes de avaliação dos efeitos sobre o estresse oxidativo.

Como observado na figura 8, o ZIKV é capaz de regular negativamente a expressão da via NRF-2/ARE, uma importante via de defesa antioxidante, o fulerol é capaz de normalizar sua atividade, sendo assim acredita-se que o composto seria capaz de diminuir o estresse oxidativo celular.

Figura 8: Atividade transcricional de NRF-2 em células VERO infectadas com ZIKV após tratamento com fulerol. Onde, $p < 0,05$, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

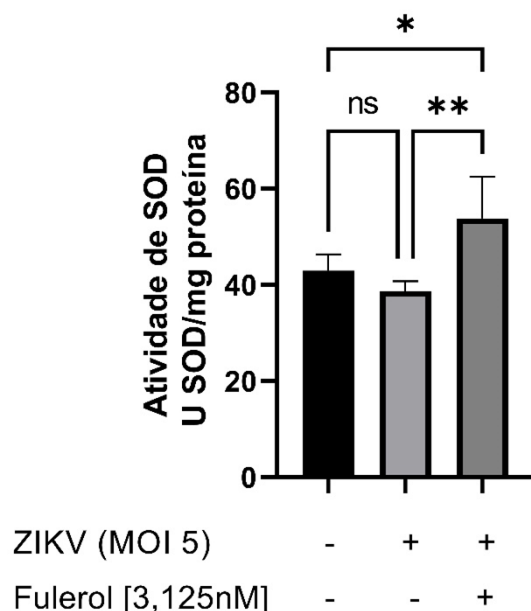


FONTE: MALTA, WC., 2023.

Para tal realizou-se a dosagem da Superóxido dismutase (SOD), uma enzima que catalisa a dismutação do ânion radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, sendo importante para o controle do estresse oxidativo. Na figura 9, observa-se que o ZIKV reduz levemente a atividade da SOD, é importante ressaltar que em condições de estresse oxidativo, como uma infecção viral, a resposta do organismo é estimular a produção de SOD e outras enzimas antioxidantes, alguns arbovírus tem demonstrado a capacidade de inibir a via regulando negativamente a expressão genica da NRF-2, como visto por Pereira SH (2020) para ZIKV e por Malta WC (2023) para ZIKV e CHIKV. Neste contexto observou-se que o fulerol

foi capaz de aumentar a atividade de SOD, corroborando com resultados anteriores em que o composto normalizou a atividade da NRF-2/ARE, indicando uma possível atividade citoprotetora.

Figura 9: Atividade de SOD em J774A.1 infectada com ZIKV. (*) (**) representa significância estatística, onde $p < 0,05$, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

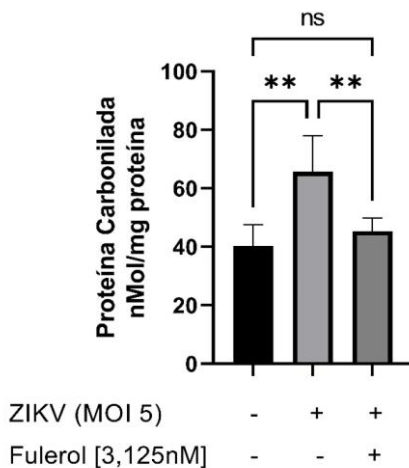


FONTE: Própria autora.

Além da atividade de SOD, foram abordados dois parâmetros de dano oxidativo, a peroxidação de lipídeos e proteínas. Na figura 10, observa-se que o ZIKV provocou um importante aumento no conteúdo de proteína carbonilada, este marcador indica danos oxidativos diretos ou indiretos nas proteínas celulares. O fulerol foi capaz de reduzir a peroxidação das proteínas retornando próximo aos níveis basais. Da mesma forma, na figura 11, observou-se que o ZIKV aumentou os níveis de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação de lipídeos, e novamente o fulerol apresentou significativa ação em conter os danos causados pelo estresse oxidativo em lipídeos, reforçando sua capacidade de auxiliar as células a retornarem seu estado basal, mesmo em infecções viras. Até o momento não há estudos sobre

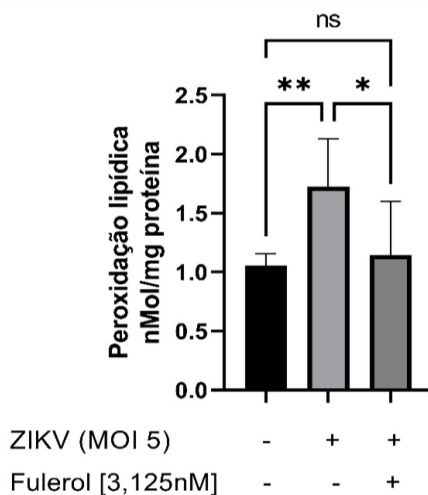
os mecanismos de ação do fulerol, desta forma a proteção pode ocorrer por captação das EROs, aumento da atividade de enzimas antioxidantes ou até mesmo por proteção direta.

Figura 10: Dosagem do conteúdo de proteína Carbonilada em J774A.1 infectada com ZIKV. ()** representa significância estatística, onde $p < 0,05$, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey.



FONTE: Própria autora.

Figura 11: Dosagem da peroxidação lipídica por TBARs em J774A.1 infectada com ZIKV. (*) ()** representa significância estatística, onde $p < 0,05$, utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey



FONTE: Própria autora.

5. Conclusão

Observou-se que o ZIKV é capaz de gerar danos oxidativos mesmo em um tempo curto de infecção, como 24 horas, e neste contexto o fulerol apresentou significativa ação antioxidante e citoprotetora. Estes dados corroboram achados anteriores em nosso grupo, onde o fulerol foi capaz de reduzir os níveis de EROs, restaurar a atividade de vias antioxidantes importantes, como a NRF-2/ARE, e até mesmo reduzir a carga viral em células infectadas com ZIKV. É importante ressaltar, entretanto, que os mecanismos de ação do composto não são estabelecidos, sendo importante em estudos futuros elucidar sua ação para determinar os próximos passos para seu aprimoramento como produto biotecnológico. Da mesma forma, este estudo é pioneiro em demonstrar os efeitos do fulerol no contexto de dano oxidativo, sendo assim, mais estudos são necessários para corroborar os achados, uma vez que o modelo celular estudado não abrange uma linhagem celular humana ou de grande tropismo para o ZIKV, sendo esta uma das principais limitações do estudo

Conclui-se que o fulerol é um composto com importante ação antioxidante, com um grande potencial biotecnológico, novos estudos devem buscar consolidar os efeitos citoprotetores e antivirais do composto, bem como expandir os testes para modelos celulares mais significativos e para novos vírus como o dengue e Chikungunya.

6. Referências

- AGUIRRE, J.; LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free radical biology & medicine*, v. 49, n. 9, p. 1342–53, 15 nov. 2010
- ARBOVIRUS CATALOG. Disponível em: <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>. Acesso em: 10/01/2020
- BAFANA, Amit et al. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, n. 2, p. 129-138, 2011.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de nutrição*, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BHARDWAJ, Utkarsh et al. Gist of Zika virus pathogenesis. *Virology*, v. 560, p. 86-95, 2021.
- BRAACK, Leo et al. Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasites & vectors*, v. 11, n. 1, p. 1-26, 2018.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL, Patrícia et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, v. 375, n. 24, p. 2321-2334, 2016.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52, p.302-310, 1978.
- DALLE-DONNE, Isabella et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.
- DANGSAGUL, Worawat et al. Zika virus isolation, propagation, and quantification using multiple methods. *Plos one*, v. 16, n. 7, p. e0255314, 2021.
- DIOSA-TORO, Mayra et al. Role of RNA-binding proteins during the late stages of Flavivirus replication cycle. *Virology journal*, v. 17, p. 1-14, 2020.

DUFFY, Mark R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, federated states of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 24, p. 2536-2543, 2009.

FAUCI, Anthony S.; MORENS, David M. Zika virus in the Americas—yet another arbovirus threat. *New England journal of medicine*, v. 374, n. 7, p. 601-604, 2016.

FANUNZA, Elisa et al. A NS2A do vírus Zika inibe a sinalização do interferon pela degradação de STAT1 e STAT2. *Virulência*, v. 12, n. 1, pág. 1580-1596, 2021.

FERRARI, Matteo et al. Dengue virus targets Nrf2 for NS2B3-mediated degradation leading to enhanced oxidative stress and viral replication. *Journal of virology*, v. 94, n. 24, p. 10.1128/jvi.01551-20, 2020.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007

GUIMA, Dimitrius Santiago P. Simões Fróes et al. Concentração de proteína solúvel por Bradford revela diferenças no metabolismo de plantas de ora-pro-nobis em diferentes doses de nitrogênio. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 2013.

GREBINYK, Anna et al. Fulereno C60 como uma nanoplataforma eficaz de entrega do alcalóide berberina em células leucêmicas. *Farmacêutica*, v. 11, n. 11, pág. 586, 2019.

HALLIWELL, Barry; CROSS, Carroll E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, v. 102, n. suppl 10, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 25, n. 12, p. 1058–1071, 2007.

HUANG, Yan-Jang S. et al. Interações flavivírus-mosquito. *Vírus*, v. 6, n. 11, pág. 4703-4730, 2014.

IVANOV, Alexander V. et al. Oxidative stress in infection and consequent disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, 2017.

KARKHAH, Ahmad et al. Zika virus: epidemiology, clinical aspects, diagnosis, and control of infection. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 37, p. 2035-2043, 2018.

KAUFFMAN, Elizabeth B.; KRAMER, Laura D. Zika virus mosquito vectors: competence, biology, and vector control. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_10, p. S976-S990, 2017.

KRAMER, Laura D.; CIOTA, Alexander T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Current opinion in virology*, v. 15, p. 112-118, 2015.

LANCIOTTI, Robert S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 8, p. 1232, 2008.

VAN LEUR, S. W. et al. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence*, v. 12, n. 1, p. 2814–2838, 31 dez. 2021.

LIU, Pingsheng; RUDICK, Michael; ANDERSON, Richard GW. Multiple functions of caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 44, p. 41295-41298, 2002.

MALTA, Wellington Carvalho. Caracterização da atividade antioxidante do fulerol em infecções por Zika virus e Chikungunya virus. 2023.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469–474, set. 1974.

MARKLUND, Stefan; MARKLUND, Gudrun. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.

MOUGEOLLE, Alexis et al. Oxidative stress induces caveolin 1 degradation and impairs caveolae functions in skeletal muscle cells. *PLoS One*, v. 10, n. 3, p. e0122654, 2015.

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

PASTOR, Nina et al. Uma interpretação detalhada das pegadas do radical OH num complexo TBP-DNA revela o papel da dinâmica no mecanismo de ligação específica da sequência. *Revista de biologia molecular*, v. 304, n. 1, pág. 55-68, 2000.

PEREIRA, Samille Henriques. Avaliação da atividade antioxidante do fulerol em infecções por Zika virus. 2020.

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

REZNICK, Abraham Z.; PACKER, Lester. [38] Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. In: Methods in enzymology. Academic press, 1994. p. 357-363.

SILVA, Breno M. et al. The dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) increases NF- κ B transcriptional activity in HepG2 cells. Archives of virology, v. 156, p. 1275-1279, 2011.

SILVA, Danielle da Costa; CERCHIARO, Giselle; HONÓRIO, Káthia M. Pathophysiologic relationships between oxidative stress and atherosclerosis. Química Nova, v. 34, p. 300-305, 2011.

SONG, Byung-Hak et al. Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. Journal of neuroimmunology, v. 308, p. 50-64, 2017.

STADTMAN, Earl R.; LEVINE, Rodney L. Oxidação de proteínas. Anais da Academia de Ciências de Nova Iorque, v. 899, n. 1, pág. 191-208, 2000.

VAN LEUR, Sophie Wilhelmina et al. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. Virulence, v. 12, n. 1, p. 2814-2838, 2021.

VRANEŠ, Milan et al. Self-assembling, reactivity and molecular dynamics of fullereneol nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 1, p. 135-144, 2017.

WANG, Hong; JOSEPH, James A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. Free radical biology and medicine, v. 27, n. 5-6, p. 612-616, 1999.

WESTAWAY, Edwin G. et al. Flaviviridae. Intervirologia , v. 24, n. 4, pág. 183-192, 1985.

World Health Organization. Zika Virus Disease: Interim Guidance for Healthcare Providers. Geneva: WHO; 2016.

ZAIA, Dimas AM; ZAIA, Cássia Thaís BV; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Química nova, v. 21, p. 787-793, 1998.

ZHANG, Qian et al. Spread of Zika virus in the Americas. Proceedings of the national academy of sciences, v. 114, n. 22, p. E4334-E4343, 2017.

ZHAO, Jun et al. Avanços recentes na manipulação viral da via de sinalização do NF- κ B. Opinião atual em virologia, v. 15, p. 103-111, 2015.