



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



CLARA SOARES FURLAN

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FULEROL NA REDUÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉLULAS INFECTADAS POR *ORTHOFLAVIVIRUS DENGUEI***

OURO PRETO
2025

Clara Soares Furlan

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FULEROL NA REDUÇÃO DO ESTRESSE
OXIDATIVO EM CÉLULAS INFECTADAS POR *ORTHOFLAVIVIRUS DENGUEI***

Monografia apresentada ao Departamento de Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito necessário para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Breno de Mello Silva
Co Orientador: Msc. Wellington Malta

OURO PRETO

2025



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



FOLHA DE APROVAÇÃO

Clara Soares Furlan

**Avaliação do efeito do fulerol na redução do estresse oxidativo em células infectadas
por *Orthoflavivirus denguei***

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

Aprovada em 29 de agosto de 2025

Membros da banca

Dr - Breno de Mello Silva - Orientador Universidade Federal de Ouro Preto
Msc - Wellington Carvalho Malta - Universidade Federal de Ouro Preto
Dra- Adriana Cotta Cardoso Reis - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr - Dawidson Assis Gomes - Universidade Federal de Minas Gerais

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 15/09/2025



Documento assinado eletronicamente por **Breno de Mello Silva, PROFESSOR DE
MAGISTERIO SUPERIOR**, em 15/09/2025, às 18:55, conforme horário oficial de Brasília, com
fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
[http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?
acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0978425**
e o código CRC **2E37957F**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.011792/2025-00

SEI nº 0978425

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35402-163
Telefone: 3135591672 - www.ufop.br

AGRADECIMENTOS

É com imensa alegria e gratidão que encerro este ciclo tão significativo da minha vida. Meu profundo agradecimento a todas as pessoas que cruzaram o meu caminho e contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Dedico com admiração e respeito aos meus orientadores, Breno e Wellington, que guiaram com sabedoria e paciência a transformação da nossa pesquisa neste trabalho. Sou eternamente grata pelos anos de aprendizado e pelo acolhimento no LBTM – cada ensinamento levo comigo na minha nova jornada.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa, CAPES e FAPEMIG, pelo indispensável apoio financeiro que tornou este projeto possível. À UFOP, minha gratidão por oferecer um ensino público, gratuito e de qualidade, que transforma vidas. Aos professores do curso de Biologia, meu reconhecimento por me mostrarem a beleza de estudar a vida e tudo o que é vivo. Vocês me inspiraram a seguir com curiosidade e paixão.

Dedico, com amor e saudade que não cabem em palavras, ao meu pai, Julio Cesar Furlan, que me ensinou a sonhar grande e a nunca desistir dos meus objetivos. Obrigada por ter me mostrado a coragem de viver com propósito. À minha mãe, Roseli Soares Furlan, pelo amor incondicional que sempre foi meu porto seguro, e por ter me dado as bases que me tornaram quem sou. À minha irmã, Lara Soares Furlan, companheira de todas as horas, que caminha ao meu lado tornando cada sonho mais leve e possível. À República Feitiço, pelo lar que se tornou, pelos anos de convívio, aprendizado e partilha que levarei para a vida toda.

Por fim, dedico com todo carinho a todos os meus – familiares, amigos e colegas – que, de tantas formas, fizeram por mim mais do que posso expressar. Vocês preenchem minha vida com amor e sentido.

Com todo o meu coração, obrigada.

RESUMO

Este trabalho investiga o efeito do fulerol na redução do estresse oxidativo em células infectadas pelo vírus da dengue. A dengue é uma doença séria causada pelo *Orthoflavivirus denguei*, que pertence à família *Flaviviridae* e é transmitida principalmente pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. As células humanas têm mecanismos naturais para combater antígenos em infecções virais, e um aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs) dentro das células pode atuar como uma defesa. Por meio de experimentos realizados em laboratório, é possível observar o aumento das EROS e relacioná-lo à infecção viral. Para manter a homeostase das reações de oxirredução (redox), as células produzem enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), que ajudam a neutralizar o excesso de EROS e prevenir o estresse oxidativo. Quando a quantidade de espécies reativas aumenta e não é controlada por esse sistema de defesa, ocorre um desequilíbrio na homeostase celular, resultando em danos às macromoléculas, como a peroxidação de lipídios e a carbonilação de proteínas, além de potenciais lesões ao material genético. Nesse contexto, é essencial entender como as EROS são produzidas em células infectadas e como a célula responde com mecanismos antioxidantes, pois isso pode esclarecer a importância dessa resposta na replicação viral e auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O fulerol, um antioxidante orgânico, tem a capacidade de capturar as EROS geradas pela infecção. Trata-se de moléculas esféricas de carbono ligadas a grupos hidroxila, que facilitam a interação com radicais livres nas células. Resultados preliminares do nosso grupo de pesquisa sugerem que o fulerol pode ajudar a restaurar o equilíbrio redox e a reduzir a replicação viral. Portanto, neste estudo, avaliamos a produção de EROS e a atividade de enzimas antioxidantes em células infectadas com *Orthoflavivirus denguei* (DENV), além de investigar os efeitos do fulerol nesse cenário, com o objetivo de confirmar e expandir os resultados já obtidos.

Palavras chaves: *Orthoflavivirus denguei*; estresse oxidativo; fulerol; antioxidante; danos a biomoléculas.

ABSTRACT

This study investigates the effect of fulerol on the reduction of oxidative stress in cells infected with the dengue virus. Dengue is a serious disease caused by the *Orthoflavivirus denguei*, which belongs to the *Flaviviridae* family and is primarily transmitted through the bite of *Aedes* mosquitoes. Human cells have natural mechanisms to combat antigens in viral infections, and an increase in reactive oxygen species (ROS) within the cells can act as a defense. Through laboratory experiments, it is possible to observe the increase of ROS and relate it to viral infection. To maintain the homeostasis of oxidation-reduction (redox) reactions, cells produce antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), which help neutralize excess ROS and prevent oxidative stress. When the amount of reactive species increases and is not controlled by this defense system, an imbalance in cellular homeostasis occurs, resulting in damage to macromolecules, such as lipid peroxidation and protein carbonylation, as well as potential injuries to genetic material. In this context, it is essential to understand how ROS are produced in infected cells and how the cell responds with antioxidant mechanisms, as this can clarify the importance of this response in viral replication and assist in the development of new therapeutic approaches. Fulero, an organic antioxidant, has the ability to capture the ROS generated by the infection. It consists of spherical carbon molecules linked to hydroxyl groups, which facilitate interaction with free radicals in the cells. Preliminary results from our research group suggest that fulerol may help restore redox balance and reduce viral replication. Therefore, in this study, we evaluated the production of ROS and the activity of antioxidant enzymes in infected cells with *Orthoflavivirus denguei* (DENV), as well as investigated the effects of fulerol in this context, with the aim of confirming and expanding the previously obtained results.

Keywords: *Orthoflavivirus denguei*; oxidative stress; fulerol; antioxidant; biomolecule damage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição epidemiológica da Dengue no mundo	9
Figura 2 – Representação esquemática do vírion, região codificante e ciclo reprodutivo	12
Figura 3 - Estrutura química do fulerol	18
Figura 4 - Efeito na produção de EROs em células VERO após infecção com ZIKV tratadas com fulerol.....	19
Figura 5 - Teste de viabilidade celular após tratamento com fulerol	33
Figura 6 - Ensaio de MTT	34
Figura 7 - Dosagem de Espécies Reativas de oxigênio (EROS)	35
Figura 8 - Dosagem de nitritos (GRIESS)	37
Figura 9 - Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD)	38
Figura 10 - Dosagem de Catalase (CAT)	39
Figura 11 - Atividade de NRF2/ARE	40
Figura 12 - Determinação da peroxidação lipídica	42
Figura 13 - Determinação da carbonilação de proteínas	43
Quadro 1 - Estabelecimento de valores para curva de concentração	30

LISTA DE ABREVIACÕES

ANOVA – Analysis of Variance (Análise de Variância)
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATC – Ácido Tricloroacético
ATCC – American Type Culture Collection
BHT – Butil-Hidroxitolueno
BOD – Biological Oxygen Demand (Estufa de Demanda Biológica de Oxigênio)
CAT – Catalase
CMC – Carboximetilcelulose
CO₂ – Dióxido de Carbono
DENV – Dengue Virus (Vírus da Dengue)
DF – Doença Febril
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-HG – Dulbecco's Modified Eagle Medium – High Glucose
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNPH – 2,4-Dinitrofenilhidrazina
ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
GPx – Glutational Peroxidase
GSH – Glutational Reduzida
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
HBSS – Hank's Balanced Salt Solution (Solução Salina Balanceada de Hank)
HCV – Hepatitis C Virus (Vírus da Hepatite C)
IgM – Imunoglobulina M
L-15 – Meio Leibovitz-15
MOI – Multiplicity of Infection (Multiplicidade de Infecção)
MTT – 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2,5-Difenil-2H-Tetrazólio Brometo
NO – Óxido Nítrico
NO₂ – Dióxido de Nitrogênio
NRF2 – Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2)
O₂ – Oxigênio Molecular

O_2^- – Ânion Superóxido

$ONOO^-$ – Peroxinitrito

PBS – Phosphate-Buffered Saline (Tampão Fosfato Salino)

PCR – Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

qPCR – Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR Quantitativa)

RE – Retículo Endoplasmático

RT-qPCR – Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (PCR Quantitativo com Transcriptase Reversa)

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SFB – Soro Fetal Bovino

SN – Síndrome Neurológica

SOD – Superóxido Dismutase

TBA – Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloroacético

TBARS – Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico)

TMP – 1,1,3,3-Tetrametoxipropano

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

UFP – Unidades Formadoras de Placa

VSR – Vírus Sincicial Respiratório

-OH – Grupo Hidroxila

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 Arbovírus	10
1.2 Família Flaviviridae e Gênero Orthoflavivirus	11
1.2.1 Orthoflavivirus denguei	13
1.2.2 Diagnóstico, profilaxia e tratamento	13
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e Nitrogênio (ERNS)	15
1.4 Sistema de defesa antioxidante	16
1.5 Fulerol	17
1.6 Resultados Preliminares	19
2 OBJETIVO	21
2.1 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Células C6/36 e VERO	22
3.2 Orthoflavivirus denguei	22
3.2.1 Multiplicação e titulação viral	23
3.3 Fulerol	24
3.4 Ensaio de viabilidade celular	24
3.5 Dosagem de espécies reativas de oxigênio intracelular	25
3.6 Dosagem de GRIESS para avaliação dos níveis de espécies reativas de nitrogênio	26
3.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD)	26
3.8 Análise de catalase (CAT)	27
3.9 Atividade da via NRF2/ARE	27
3.9.1 Transfecção celular	27
3.9.2 Adição do vírus e tratamento	28
3.9.3 Ensaio de Dual-Luciferase	28
3.10 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	29
3.11 Proteína carbonilada	30
3.12 Análise estatística	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1 Viabilidade Celular	32
4.2 Avaliação de EROs e ERNs intracelular após a infecção e tratamento com fulerol	34
4.3 Dosagem de enzimas antioxidantes após a infecção e tratamento com fulerol	37
4.4 Atividade da via NRF2/ARE após infecção e tratamento com fulerol	40
4.5 Efeito em biomoléculas após infecção e tratamento com fulerol	41
5 CONCLUSÃO	44
6 REFERÊNCIAS	44

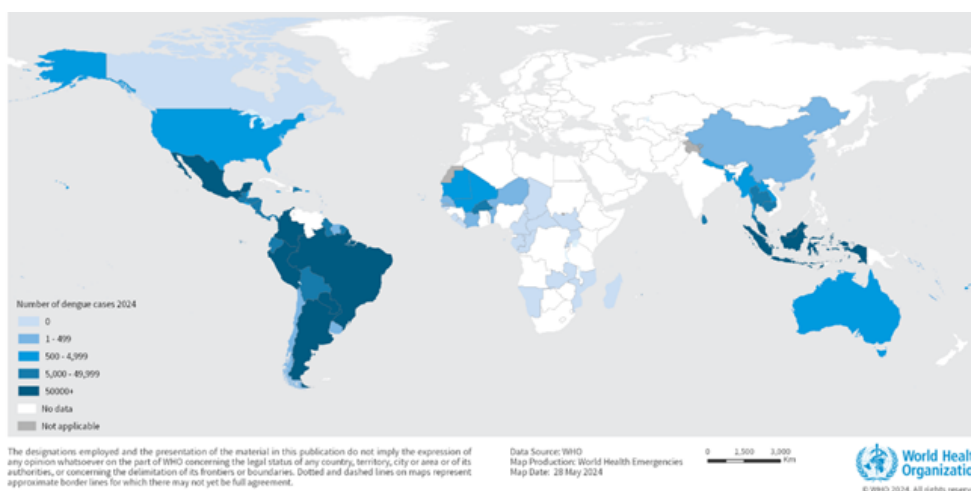
1 INTRODUÇÃO

A dengue é uma doença viral de caráter tropical transmitida principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*. O vírus causador da dengue, *Orthoflavivirus denguei* (DENV), pertence à família *Flaviviridae* e apresenta quatro sorotipos geneticamente distintos (DENV-1 a DENV-4). Ressalta-se que a imunização contra um sorotipo específico não confere proteção eficaz contra os demais sorotipos (Ross, 2010).

Países tropicais e subtropicais são os mais afetados por essa doença, atingindo populações que representam mais da metade da população global, conforme ilustrado na Figura 1, que apresenta a distribuição epidemiológica dos casos de dengue no Brasil e no mundo em um intervalo de quatro meses de 2024 (Mcmenamin, 2024). Uma das formas pelas quais o vírus da dengue prejudica o hospedeiro humano é pela indução de estresse oxidativo em células infectadas, decorrente do desequilíbrio entre a capacidade antioxidante celular e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Communication et al., 2010).

Nesse contexto, nanocompostos derivados do carbono, em especial o fulerol, demonstram ação antioxidante promissora e vêm sendo estudados na mensuração do estresse oxidativo em células infectadas por arbovírus (Pereira, 2020). Dessa forma, torna-se relevante o desenvolvimento de ferramentas que minimizem os danos causados pela infecção e contribuam para o tratamento da doença.

Figura 1 - Mapa da distribuição epidemiológica da Dengue no mundo. Casos de janeiro a abril de 2024 que foram notificados à Organização Mundial da Saúde.



Fonte: Dengue - Situação Global, Organização Mundial da Saúde

1.1 Arbovírus

Os *Arthropod-borne viruses*, também conhecidos como arbovírus, constituem um grupo de vírus caracterizados por possuírem ciclo de replicação em insetos hematófagos, podendo ser transmitidos a seres humanos ou outros vertebrados por meio da picada do mosquito (Shope; Meegan, 1997). O *International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates* é um catálogo internacional destinado ao registro de vírus transmitidos por artrópodes. Esse grupo compreende mais de 500 membros, dos quais 140 causam doenças em humanos (CDC, 2020).

As arboviroses têm adquirido crescente relevância no contexto das mudanças climáticas e do desmatamento, especialmente em regiões tropicais. Com o avanço das migrações populacionais, intensifica-se a ocupação desordenada de áreas urbanas, favorecendo a precarização dos sistemas sanitários e contribuindo para a transmissão viral e a disseminação da doença. No âmbito clínico, as manifestações em humanos podem variar desde doença febril (DF) inespecífica até formas graves, como síndromes neurológicas (SN) e hemorrágicas. Na DF, os sintomas geralmente incluem febre, cefaleia, dor retroorbital e mialgia, assemelhando-se aos da influenza. Já a SN pode manifestar-se como meningite, paralisia, convulsões e distúrbios de coordenação (Lopes et al., 2014).

A transmissão das arboviroses ocorre por meio de vetores hematófagos, como mosquitos e carrapatos, que entram em contato com o sangue de um hospedeiro infectado. A partir desse contato, o vírus inicia seu ciclo de replicação no organismo do vetor, culminando na infecção das células das glândulas salivares do inseto. Assim, ao alimentar-se novamente, o vetor transmite o vírus a um novo hospedeiro por meio da saliva, que penetra na corrente sanguínea durante a picada. As vias de transmissão variam conforme o tipo de arbovírus e o vetor envolvido, podendo ocorrer também de forma vertical. No organismo do hospedeiro vertebrado, o vírus replica-se e amplifica sua população, aumentando a probabilidade de novas transmissões ao entrar em contato com novos vetores. Esse ciclo mantém-se à medida que novos hospedeiros vertebrados são infectados e contactam vetores hematófagos, propagando a doença. Dessa forma, ocorre a disseminação

geográfica do vírus, possibilitando sua manutenção e propagação na natureza (Kramer; Ciota, 2015).

As primeiras ocorrências do DENV foram registradas no século XVII, em países africanos e asiáticos. A expansão geográfica, associada ao crescimento urbano, levou à intensificação das epidemias de dengue (Lopes et al., 2014). As principais famílias virais que compõem o grupo dos arbovírus incluem: *Flaviviridae*, gênero *Orthoflavivirus*, que abrange agentes como os da febre amarela, dengue, zika e encefalite japonesa; *Togaviridae*, gênero *Alphavirus*, que compreende os vírus *Alphavirus mayaro* e *Alphavirus chikungunya*; e *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, ao qual pertence o vírus *Orthobunyavirus oropoucheense* (Shope; Meegan, 1997). No presente estudo, será realizada uma análise sobre o *Orthoflavivirus denguei*, da família *Flaviviridae*.

1.2 Família *Flaviviridae* e Gênero *Orthoflavivirus*

A família *Flaviviridae* é composta por quatro gêneros: *Pestivirus*, *Hepacivirus*, *Pegivirus* e *Orthoflavivirus*. Este último inclui cerca de 40 espécies de arbovírus, capazes de causar doenças graves e de importância médica, como encefalites e febres hemorrágicas. Dentre eles, destacam-se o *Orthoflavivirus denguei* (dengue), *Orthoflavivirus zikaense* (zika) e *Orthoflavivirus flavi* (febre amarela), entre outros (Lopes et al., 2014; Simmonds et al., 2017).

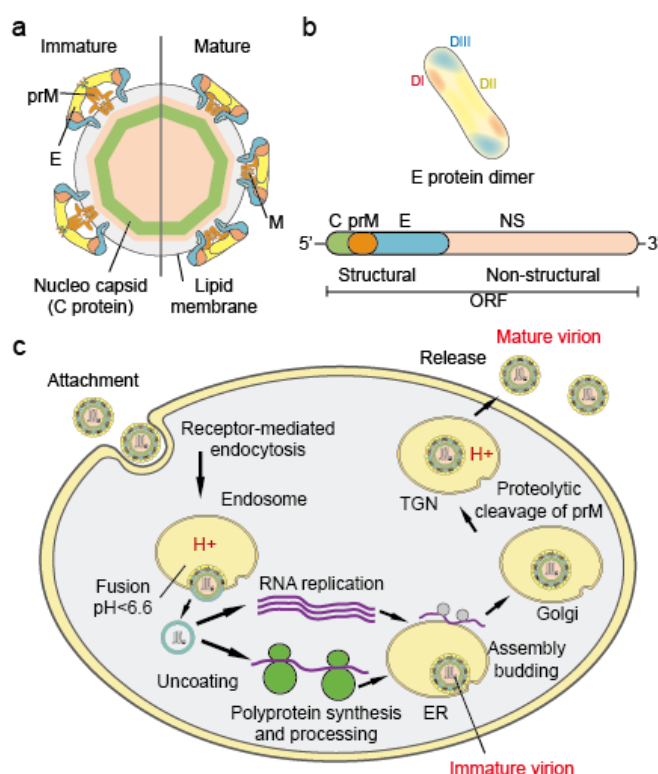
A partícula viral dos flavivírus possui de 40 a 60 nm de diâmetro e apresenta duas formas estruturais distintas de vírion: imatura e madura. A partícula madura é composta por um capsídeo proteico (C) com simetria icosaédrica, envolto por um envelope lipídico, onde estão ancoradas as proteínas de membrana (M) e as espículas glicoproteicas (E). Os vírions imaturos apresentam a proteína precursora prM, que é clivada proteoliticamente durante o processo de maturação. Seu genoma consiste em um RNA de fita simples positiva, que codifica três proteínas estruturais (C, M e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), as quais desempenham funções reguladoras na expressão gênica, virulência e patogenicidade viral, conforme ilustrado na Figura 2 (Lopes et al., 2014).

A proteína E é a principal responsável pela interação do vírus com as células hospedeiras e é essencial para a entrada viral. Após a adsorção, o vírus é internalizado por endocitose, e a acidificação do endossomo promove a redução do

pH, induzindo uma mudança conformacional na proteína E. Essa alteração facilita a fusão entre a membrana celular e o envelope viral, permitindo a liberação do capsídeo e do RNA genômico no citoplasma (Roy; Bhattacharjee, 2021).

A replicação dos flavivírus ocorre no citoplasma. Inicialmente, o RNA viral de fita positiva é traduzido em uma poliproteína, que será subsequentemente clivada em proteínas estruturais e não estruturais, sendo processada na membrana do retículo endoplasmático (RE). As proteínas do capsídeo viral são traduzidas no citosol, enquanto as proteínas E e prM são sintetizadas no RE, onde ocorre a montagem dos vírions imaturos contendo o RNA genômico associado às proteínas prM e E. As partículas montadas são transportadas para o complexo de Golgi, onde ocorre a clivagem da prM e a maturação do vírion, processo estimulado pelo declínio do pH. Subsequentemente, os vírions maduros são liberados por exocitose no meio extracelular (Roy; Bhattacharjee, 2021).

Figura 2 – Representação esquemática do vírion, região codificante e ciclo reprodutivo. Ilustração das diferenças entre vírion maduro e imaturo (a), demonstração das regiões codificadoras do RNA viral (b) e elucidação do ciclo reprodutivo do vírus no interior do citoplasma (c).



1.2.1 *Orthoflavivirus denguei*

O vírus da dengue (DENV) apresenta quatro sorotipos distintos (DENV-1 a DENV-4), sendo o DENV-2 o de maior relevância epidemiológica em escala global. Sua transmissão ocorre primariamente por meio do vetor *Aedes aegypti* e pode infectar indivíduos de todas as faixas etárias, desde recém-nascidos até idosos. A manifestação sintomática varia desde quadros inespecíficos, como cefaleia e febre, até formas hemorrágicas graves, podendo evoluir para óbito em casos extremos (Lopes et al., 2014).

No ciclo de transmissão, após a inoculação viral pela picada do mosquito, as primeiras células infectadas são as células dendríticas, que disseminam o vírus para macrófagos, monócitos e linfócitos mediante migração para linfonodos. Entre três e cinco dias pós-infecção, instala-se a fase febril aguda, período em que as partículas virais atingem a corrente sanguínea e desencadeiam a resposta imunológica aguda. Uma vez hematogênico, o vírus pode disseminar-se para múltiplos órgãos, como fígado, pulmões, trato gastrointestinal e coração (Roy; Bhattacharjee, 2021).

A fisiopatologia dos sintomas ainda não está completamente elucidada na literatura. Contudo, evidências sugerem que a liberação de citocinas pró-inflamatórias – mediada pela interferência de proteínas virais em vias de sinalização celular –, associada à ativação de linfócitos TCD4+ e TCD8+, pode estar intimamente relacionada às manifestações clínicas da infecção. Adicionalmente, a trombocitopenia observada em casos graves pode ser atribuída à liberação de interferon por linfócitos T, que suprime a atividade medular eritropoética. Esse mecanismo pode precipitar o surgimento de petéquias (manifestações hemorrágicas cutâneas) generalizadas (Lopes et al., 2014).

1.2.2 Diagnóstico, profilaxia e tratamento

O diagnóstico da dengue é realizado, inicialmente, pela análise sintomatológica, que inclui febre entre 39 °C e 40 °C associada a pelo menos um dos seguintes sintomas: cefaleia, dor retroorbital, artralgia ou exantema cutâneo, (BRASIL, 2025). Diante da suspeita clínica devido à apresentação característica, a confirmação pode ser obtida por meio de duas abordagens: diagnóstico laboratorial

através de amostra sanguínea ou detecção de anticorpos específicos no soro do paciente.

O vírus da dengue permanece detectável no soro/plasma do paciente entre um e sete dias após a infecção, constituindo a janela temporal ideal para análises laboratoriais de maior confiabilidade. Para a detecção do antígeno viral neste período, podem ser empregadas tanto a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real com transcriptase reversa (RT-qPCR) quanto o Reação em Cadeia da Polimerase convencional (PCR) (Roy; Bhattacharjee, 2021).

Para a caracterização de fluidos biológicos, três abordagens principais são empregadas: a PCR quantitativa (qPCR), a detecção de anticorpos antidengue do tipo imunoglobulina M (IgM) e a identificação da proteína não estrutural 1 (NS1) por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) ou testes rápidos de imunocromatografia (Roy; Bhattacharjee, 2021). Uma vantagem dos testes imunocromatográficos reside na possibilidade de execução direta em unidades de saúde, fornecendo resultados rápidos e confiáveis.

A obtenção de diagnóstico preciso é fundamental tanto para o manejo clínico adequado quanto para a vigilância epidemiológica da doença. O tratamento da infecção baseia-se em medidas de suporte, incluindo repouso, hidratação e uso de sintomáticos, uma vez que não existe terapia antiviral específica contra a dengue (Roy; Bhattacharjee, 2021).

Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou o registro de uma nova vacina para prevenção da dengue por meio da Resolução RE nº 661, de 2 de março de 2023. A vacina Qdenga® tornou-se a primeira opção disponível no Brasil para um público amplo, abrangendo indivíduos de 4 a 60 anos de idade e conferindo imunização contra os sorotipos DENV-1 a DENV-3 (BRASIL, 2023).

Diante desse contexto, a profilaxia mantém-se como estratégia fundamental para o controle da disseminação viral, baseando-se principalmente no combate à proliferação do vetor *Aedes aegypti*. A eliminação de criadouros mediante a remoção de recipientes com água parada, aplicação de larvicidas e inseticidas, aliada à educação em saúde populacional, constitui medida indispensável para a prevenção. A educação ambiental assume papel crucial no controle de arboviroses, considerando que o descarte inadequado de resíduos sólidos (pneus, garrafas,

embalagens plásticas) cria condições favoráveis para a proliferação do vetor (BRASIL, 2025).

1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e Nitrogênio (ERNS)

O oxigênio constitui elemento essencial para as reações de oxidação-redução e, conseqüentemente, para a produção de energia no metabolismo celular. Durante esse processo, a redução do oxigênio pode gerar moléculas altamente reativas e instáveis, denominadas espécies reativas de oxigênio (EROs) (Silva et al., 2010). Essas moléculas contêm oxigênio e apresentam elétrons desemparelhados em sua camada eletrônica externa, caracterizando-as como radicais livres. Os mais relevantes biologicamente incluem peróxidos e superóxidos, que desempenham papel crucial na defesa contra infecções, auxiliando a resposta imune contra o vírus da dengue (DENV) (Ferreira; Matsubara, 1997). Paralelamente, são produzidas espécies reativas de nitrogênio, destacando-se o óxido nítrico (NO), o dióxido de nitrogênio (NO₂) e o peroxinitrito (ONOO⁻).

O processo infeccioso inicia-se com a ativação de células apresentadoras de antígenos mediante reconhecimento de patógenos, subseqüentemente, macrófagos e neutrófilos produzem EROs como mecanismo de defesa. Um dos principais processos envolvidos é a fagocitose, desencadeada pela ligação de receptores de superfície a patógenos, resultando na internalização em fagossomos. Esses organelos fundem-se a lisossomos, permitindo a degradação patogênica mediada por EROs/ERNS. Indivíduos com doença granulomatosa crônica apresentam defeitos genéticos nos componentes das oxidases de membrana fagolisossomal, comprometendo a geração dessas espécies reativas e resultando em imunodeficiência primária grave (Cruvinel, 2010).

Apesar do papel imunológico fundamental, a produção excessiva de EROs pode induzir danos biológicos significativos. O efeito deletério dos radicais livres, denominado estresse oxidativo, ocorre quando há desequilíbrio entre a produção de EROs/ERNS e a capacidade antioxidante (enzimática ou não enzimática). Esse acúmulo pode provocar danos a biomoléculas essenciais, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, estando associado a patologias como envelhecimento precoce e doença de Alzheimer. A literatura documenta a modulação de processos

oxidativos e antioxidantes por vírus da família *Flaviviridae* para favorecer a replicação viral (Malta, 2023; Pereira, 2020).

O aumento de EROs durante infecções virais constitui resposta natural, porém alguns vírus podem subverter vias antioxidantes para promover sua replicação. Dessa forma, o organismo mantém equilíbrio delicado entre os efeitos benéficos e prejudiciais das EROs por meio da homeostase redox, mecanismo regulatório que controla a produção e eliminação dessas espécies, protegendo contra o estresse oxidativo (Ferreira; Matsubara, 1997; Valko et al., 2007).

1.4 Sistema de defesa antioxidante

A exposição constante a radicais livres no organismo propiciou o desenvolvimento de mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), a fim de mitigar danos celulares decorrentes do estresse oxidativo. Entre esses mecanismos, destacam-se sistemas de prevenção, reparo, defesas físicas e antioxidantes. No que concerne a estes últimos, a defesa antioxidante classifica-se em enzimática – envolvendo enzimas como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e catalase (CAT) – e não enzimática, representada por compostos como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutathione (GSH), carotenoides e flavonoides (Valko et al., 2007).

Dentre esses sistemas, evidencia-se a enzima SOD, essencial para a proteção celular de organismos aeróbicos contra o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Seu mecanismo de ação consiste na conversão de $O_2^{\bullet-}$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), reduzindo a toxicidade dessas espécies. O H_2O_2 gerado pode subsequentemente ser neutralizado pelo sistema da glutathione, que complementa a ação da catalase, demonstrando particular eficiência na eliminação de diversos peróxidos tóxicos (Comhair; Erzurum, 2002).

O fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2) constitui uma via sensível à modulação por EROs, responsável pela síntese das principais enzimas de defesa antioxidante. Em condições de estresse oxidativo, esta via é ativada para estimular a produção desses agentes. No contexto da infecção por DENV, estudos demonstram que o vírus modula positivamente a via NRF2 mediante o aumento de EROs intracelulares durante a infecção. A presença de enzimas antioxidantes específicas mostrou-se capaz de reduzir os níveis de replicação viral, destacando o

potencial de moléculas antioxidantes, como o fullerol, como candidatas terapêuticas contra o vírus (Malta, 2023; Ferrari et al., 2020).

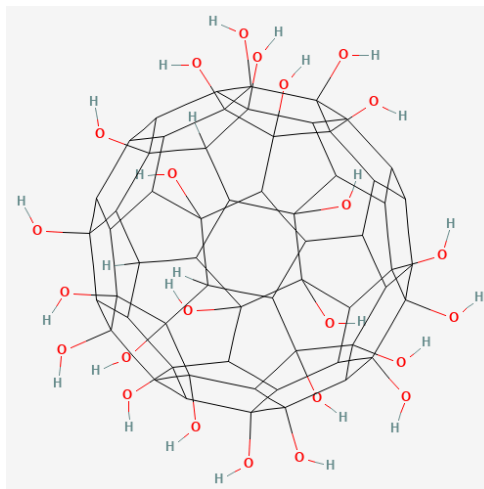
Dessa forma, tanto a importância fisiológica das EROs quanto seus potenciais danos em cenários de desregulação produtiva foram amplamente documentados, ressaltando a relevância dos mecanismos antioxidantes. Tais sistemas representam adaptações evolutivas cruciais para organismos aeróbicos, contribuindo decisivamente para a manutenção da homeostase redox.

1.5 Fullerol

Os fulerenos constituem uma classe de moléculas de carbono que formam estruturas icosaédricas compostas por 12 faces pentagonais e 20 hexagonais interligadas, sempre apresentando número par de átomos de carbono. Atualmente, suas propriedades e características vêm sendo amplamente investigadas, com aplicações emergentes na medicina e biotecnologia, notadamente devido ao seu potencial antioxidante (Rokitskaya; Antonenko, 2016; Semenov et al., 2016).

O fullerol é sintetizado mediante substituição de átomos de hidrogênio por grupos hidroxila (-OH) na superfície dos fulerenos. Os fulerenos mais estudados são os compostos por 60 átomos de carbono (C_{60}), os quais formam uma estrutura truncada semelhante a um icosaedro, conforme ilustrado na Figura 3. Este grupo de compostos exibe pronunciada atividade antioxidante, atribuída às suas duplas ligações π conjugadas na superfície molecular, sendo considerado um candidato terapêutico promissor para doenças associadas ao estresse oxidativo. Adicionalmente, destaca-se por sua estabilidade química, baixa citotoxicidade e elevada capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigênio (Rokitskaya; Antonenko, 2016).

Figura 3 - Estrutura química do fulerol



Fonte: PubChem, disponível em:< <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxyl-Fullerene>>

As infecções por DENV podem induzir estresse oxidativo e comprometer a homeostase celular, contribuindo para exacerbação inflamatória e potencial morte celular. A progressão da patogênese da doença correlaciona-se com elevados níveis de espécies reativas que promovem danos a biomoléculas, incluindo peroxidação lipídica e oxidação proteica, resultando em comprometimento dos mecanismos de defesa celular e agravamento dos sintomas da infecção. Diante desse contexto, o fulerol emerge como estratégia terapêutica promissora para atenuação do estresse oxidativo em células infectadas pelo vírus da dengue. No estudo de Pereira (2020), demonstrou-se a capacidade do nanocomposto em neutralizar radicais livres e proteger células contra danos oxidativos em modelos pré-clínicos. Adicionalmente, a administração de fulerol durante a infecção mostrou modular a resposta inflamatória, reduzindo consequentemente a intensidade dos sintomas associados à doença.

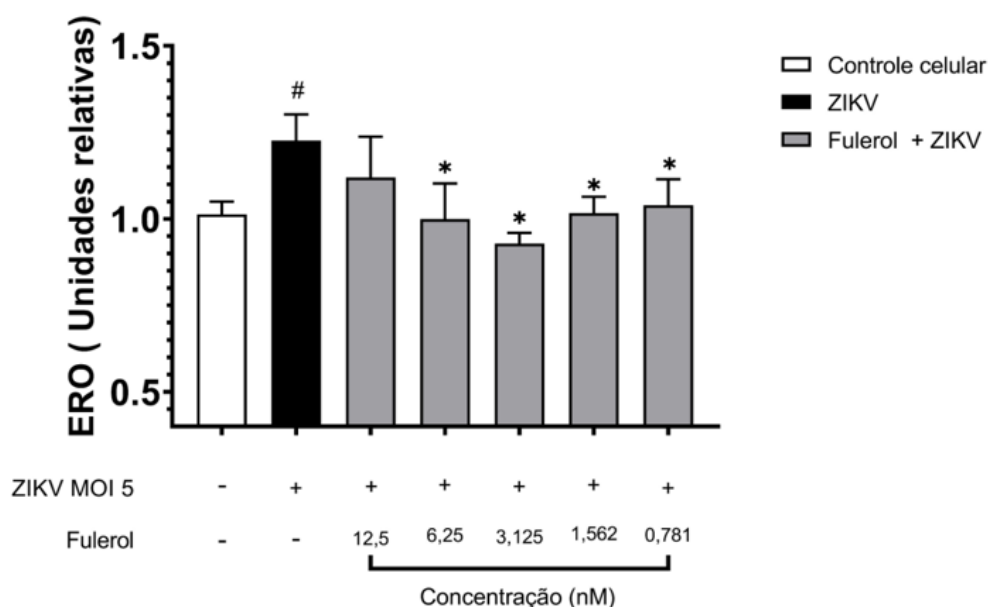
A carência de estratégias terapêuticas específicas para o manejo da dengue representa desafio significativo para a saúde pública global. Nesse cenário, o potencial antioxidante do fulerol no controle do estresse oxidativo em células infectadas pelo DENV e sua capacidade de modulação da via NRF2 configuram-se como aspectos relevantes para investigação (Pereira, 2020).

Portanto, evidencia-se a importância de elucidar os mecanismos pelos quais esta molécula pode contribuir para a melhoria dos desfechos clínicos e atenuação do impacto epidemiológico da dengue, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de futuras intervenções terapêuticas.

1.6 Resultados Preliminares

O estudo com nanocompostos no tratamento de arboviroses constitui uma linha de investigação previamente estabelecida em nosso grupo de pesquisa, com resultados relevantes documentados. Para a determinação da concentração ideal do composto, conduziram-se análises com o vírus Zika (ZIKV) em células VERO sob idênticas condições laboratoriais e de infecção empregadas na presente pesquisa, testando diferentes posologias para obtenção da resposta antioxidante ótima, conforme ilustrado na Figura 4 (Malta, 2023).

Figura 4 - Efeito na produção de EROs em células VERO após infecção com ZIKV tratadas com fulerol. Células VERO foram infectadas com ZIKV (MOI 5) em meio de cultura, contendo 12,5, 6,25, 3,125, 1,562, 0,781 nM de fulerol. Após 24 horas de tratamento a sonda carboxi-H2DCFDA foi adicionada e a intensidade de fluorescência foi mensurada. Onde (#) representa a diferença estatística entre o controle infectado por ZIKV e o controle de células; (*) representa diferença estatística entre as células infectadas e tratadas com fulerol e as células infectadas com ZIKV; utilizando one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. (*) representa $p < 0,05$.



Fonte: Malta, 2023

Os resultados obtidos demonstraram que a concentração de 3,125 nM proporcionou a resposta antioxidante mais eficaz, reduzindo significativamente os

níveis de EROs intracelulares em células VERO infectadas pelo ZIKV. Diante desse achado, esta concentração previamente otimizada foi selecionada para a condução dos experimentos laboratoriais subsequentes envolvendo infecções por DENV-2 em células VERO, permitindo a avaliação do potencial antioxidante e citoprotetor do fullerol.

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito antioxidante e citoprotetor do fulerol em resposta ao estresse oxidativo gerado pelo vírus da Dengue, em células VERO.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do fulerol na concentração de 3,125nM em células VERO.
- Avaliar os níveis de EROS e ERNS em células infectadas por DENV e avaliar os efeitos do tratamento com fulerol.
- Quantificar os níveis de biomarcadores de dano: peroxidação de proteínas (proteína carbonilada) e lipídica por TBARS (Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).
- Avaliar a atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT).
- Caracterizar os efeitos do fulerol na via NRF2/ARE em células infectadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células C6/36 e VERO

Células da linhagem C6/36, aderentes de mosquitos *Aedes Albopictus*, foram cultivadas em meio Leibowitz (L-15), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos Penicilina/Estreptomicina e Anfotericina B, e incubadas a 28°C em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD). A linhagem foi utilizada para replicação do vírus, devido à sua susceptibilidade. Células da linhagem VERO, aderentes, de rim de *Cercopithecus aethiops* (macaco verde africano), foram cultivadas em meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco com alto nível de glicose (DMEM-HG), suplementado com 5% de SFB e antibióticos Penicilina/Estreptomicina e Anfotericina B; a linhagem foi utilizada como modelo experimental.

As linhagens celulares foram mantidas segundo as diretrizes da ATCC (*American Type Culture Collection*). A linhagem VERO foi mantida em estufa de atmosfera umidificada, a 37°C e 5% de CO₂, com 5% de SFB. Para manutenção, as células foram subcultivadas em intervalos de 3 a 5 dias, lavadas com tampão salino-fosfato (PBS), desprendidas da monocamada por ação enzimática da tripsina, e realizados subcultivos em taxas de 1:2 a 1:6.

Os estoques celulares foram preparados a partir de um *pool* de células, em fase de vapor de nitrogênio, com adição de 10% de DMSO, 20% de SFB e 70% de meio de cultura para a VERO e 10% de DMSO e 90% de SFB para a linhagem C6/36. As alíquotas foram armazenadas em criotubos de 1,6 mL, com cerca de 5x10⁶ células, sendo separadas em *pool* semente e *pool* trabalho. Todas as linhagens foram testadas para a presença de mycoplasma durante os experimentos.

3.2 *Orthoflavivirus denguei*

O *Orthoflavivirus denguei* tipo 2 NGC (MK506264), isolado em 2007, gentilmente foi cedido por colaboradores na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

3.2.1 Multiplicação e titulação viral

Para a multiplicação dos estoques, foram utilizadas alíquotas de 1ª passagem. Em uma garrafa média com células C6/36 preparadas 24 horas antes, foi adicionado o DENV2 em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,1 (vírus/célula). A garrafa foi incubada por 1 hora em estufa BOD, sendo agitada a cada 10 minutos para adsorção viral. Após o período, foi adicionado meio L-15 suplementado com 2,5% de SFB em um volume final de 12 mL. Após 4 dias em estufa BOD (28 °C), o meio de cultura da garrafa foi coletado e clarificado por centrifugação; o sobrenadante foi coletado e armazenado em alíquotas em microtubos de 400 µL a -80 °C.

Para a titulação, foi utilizado o método de contagem de placas de lise (UFP), utilizando o método de contagem de placas de Dulbecco (1952). Foram preparadas réplicas de placas de 6 poços, com confluência de 90% (1×10^6 células/poço) de células VERO. Em cada placa, estabeleceu-se um controle negativo e cinco diluições da alíquota viral (10^{-1} a 10^{-5}). Para a adsorção, o vírus foi adicionado e mantido por 1 hora, com agitação a cada 10 minutos. Em seguida, a suspensão de vírus foi removida e foram adicionados 2 mL de meio RPMI suplementado com 2,5% de SFB e carboximetilcelulose 1,5% (CMC). Após o período de 5 dias em estufa, foi adicionado formol a 10% em cada poço, por 24 horas, para fixação da camada celular. Subsequentemente, foi realizada 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 (UFP). O título viral foi expresso pela equação 1:

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

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 10 e 100 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.

3.3 Fulerol

O fullerol [C₆₀ OH (22-24)] foi sintetizado a partir da polihidroxilação do fulereno (C₆₀). O estoque foi sintetizado e fornecido por colaboradores do laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física da UFMG. O composto foi diluído em água para injeção, na concentração final de 1 mM, sendo sonificado por 30 minutos; em seguida, as alíquotas foram armazenadas em tubos plásticos estéreis, âmbar, protegidos da luz, à -20°C. Para o uso, foram realizadas novas diluições, mantendo-se o fullerol a uma concentração de 1000 nM; antes do uso, o composto foi colocado novamente em banho ultrassônico por 30 minutos para garantia da homogeneização.

3.4 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade do fullerol em células VERO, empregou-se o método de redução de tetrazólio utilizando o MTT. O método consistiu na mensuração da quantidade de MTT reduzido à formazan, um cristal insolúvel em água de coloração roxa, por células viáveis. Células VERO foram semeadas em placas de 96 poços a uma confluência de 90% (4x10⁴ células/poço) e incubadas por 24 horas em estufa a 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 fullerol diluído em meio de cultura na concentração de 3,125 nM; um grupo controle somente com meio de cultura foi estabelecido.

Para avaliar os efeitos da adição do vírus, realizou-se um segundo experimento, no qual um grupo foi infectado com o vírus a uma MOI de 1, um segundo grupo foi infectado a uma MOI de 1 com a adição conjunta do fullerol [3,125 nM], e o terceiro grupo foi um controle celular. Após a adição dos vírus e tratamentos, as placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Após o período, o meio foi retirado e adicionados 30 µL de MTT por poço, seguido de incubação em estufa, protegida da luz, por 90 minutos. Após o período de incubação, foram adicionados 100 µL de DMSO por poço; em seguida, as placas foram colocadas sob agitação leve por 15 minutos para completa solubilização. A quantidade de formazan gerado foi mensurada pelo leitor de microplacas VICTOR

X3 por leitura de absorbância a 490 nm. Os resultados de viabilidade foram expressos em relação ao controle de células (CC).

3.5 Dosagem de espécies reativas de oxigênio intracelular

A dosagem de EROs foi realizada através do marcador fluorogênico 6-carboxy-2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (Carboxi - H₂DCFDA – ThermoFisher, C400). A sonda, quando oxidada por EROs, foi convertida em uma molécula de diclorofluoresceína altamente fluorescente (DCF), a qual pôde 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 com células VERO incubadas por 24 horas para adesão. Após o período de adesão, as células foram lavadas com solução balanceada de Hank's (HBSS), gota a gota, para evitar desprendimento da monocamada celular; em seguida, foram realizados os tratamentos e a infecção viral.

Após o período de tratamento, as células foram lavadas novamente com HBSS por duas vezes e adicionou-se 25 µM da sonda diluída em meio de cultivo ou HBSS por 45 minutos, mantendo-as ao abrigo da luz na estufa. Após o período de incorporação da sonda, as células foram lavadas com HBSS uma vez, para remoção do excesso de sonda; os poços foram preenchidos com 100 µL de meio FluoroBrite™ DMEM Gibco e incubados por 4 horas em estufa ao abrigo da luz. 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 antes de adicionar a sonda (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 2:

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

Onde, *Ft4* é a leitura da fluorescência no tempo de 4 horas e *Ft0* é a leitura de fluorescência no tempo 0 (branco da placa). Os resultados foram expressos em porcentagem, por valor relativo ao controle celular.

3.6 Dosagem de GRIESS para avaliação dos níveis de espécies reativas de nitrogênio

Os níveis indiretos de óxido nítrico (NO) foram mensurados pelos níveis de nitrito (NO_2^-), que é um subproduto do metabolismo de NO. O procedimento foi realizado através da reação de Griess (Green et al., 1982). Foram preparadas placas de 6 poços com células VERO, a uma confluência de 90% (1×10^6 células por poço). Uma placa constituiu o grupo controle, uma segunda foi infectada a uma MOI de 1 e uma terceira foi infectada a uma MOI de 1 e tratada com fulerol [3,125 nM] no momento da infecção. As placas foram incubadas por 24 horas; após o período, as células foram lavadas com PBS e adicionou-se 300 μL de tampão fosfato e, com auxílio de um *scraper*, foram raspadas e transferidas para tubos Eppendorf. Em seguida, as amostras foram sonicadas por 10 minutos e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento a -80°C para lise celular.

Para esta análise, 100 μL do homogenato celular reagiram com 50 μL de solução de 0,1% de naftiletilenodiamina em solução de ácido fosfórico (2,5%) e com 50 μL de solução de 1% de sulfanilamida em solução de ácido fosfórico (5%). No procedimento, ocorreu a formação de um composto azo estável de coloração púrpura, cuja absorbância foi mensurada espectrofotometricamente a 540 nm. Os resultados foram expressos em valores de porcentagem relativos ao controle celular.

3.7 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A análise da atividade da SOD foi realizada de acordo com o método de Marklund e Marklund (1974), o qual se baseou na capacidade da SOD em inibir a autooxidação do pirogalol. Quanto maior a concentração de SOD, menor foi a autooxidação do pirogalol. Para a leitura espectrofotométrica, foram utilizados pirogalol a 15 mM, tampão fosfato e MTT a 2,25 mM. As mesmas condições experimentais descritas anteriormente foram seguidas. Após a incubação das células por 24 horas, estas foram lavadas com PBS, seguida da adição de 530 μL de tampão fosfato, sendo raspadas e transferidas para tubos Eppendorf. Em seguida, as amostras foram sonicadas por 10 minutos e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento a -80°C para lise celular. As amostras foram

pipetadas em placas de 96 poços, seguidas da adição das soluções de MTT e pirogalol. A placa foi incubada por 5 minutos a 37 °C e, posteriormente, foi adicionada uma solução de DMSO (150 µL) para cessar a reação. A absorbância foi medida a 595 nm $\pm$ 25 nm no espectrofotômetro Victor X3 Multilabel (Perkin Elmer). Os resultados foram representados em U/mg de proteína e corrigidos como porcentagem relativa ao controle celular.

3.8 Análise de catalase (CAT)

A atividade da Catalase (CAT) foi mensurada com base na taxa de decréscimo do peróxido de hidrogênio, com leitura espectrofotométrica a 240 nm, sendo os resultados representados em U/mg de proteína (AEBI, 1984). As condições experimentais seguiram as mesmas etapas descritas anteriormente. Após a incubação das células, as amostras foram processadas para lise celular. O método baseou-se na decomposição do H₂O₂ pela enzima, com a absorbância sendo monitorada a cada 30 segundos durante 1 minuto. Foram utilizados tampão fosfato 50 mM e solução de peróxido de hidrogênio 20 mM. Após a adição dos reagentes, a leitura foi iniciada no espectrofotômetro, com as amostras sendo aliquotadas em cubetas de quartzo contendo 950 µL de solução de peróxido e 50 µL de lisado celular. A atividade da catalase foi determinada pela diminuição da absorbância a 240 nm, conforme a Lei de Lambert-Beer, onde 1 U equivale a 1 µmol de hidrólise de H₂O₂ por minuto, por mL. Os resultados foram expressos como porcentagem relativa ao controle celular.

3.9 Atividade da via NRF2/ARE

3.9.1 Transfecção celular

A transfecção celular foi realizada utilizando o kit Lipofectamine 3000 (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. Este método utilizou nanopartículas lipídicas para a entrega do DNA plasmidial, alcançando uma eficiência de entrega de 70%. Foi preparada uma placa de 96 poços com células VERO (4x10⁴ células/poço) em meio OptiMEM (Gibco). Para cada poço destinado à transfecção, diluiu-se 0,15 µL do reagente Lipofectamine 3000 em 5 µL de OptiMEM em um tubo estéril, livre de RNase e DNase. Em um segundo tubo, foram adicionados 0,2 µL do reagente

P3000, 400 ng do plasmídeo pGL4.37, 100 ng do plasmídeo pRL.TK e 5 µL de OptiMEM. O conteúdo do primeiro tubo foi misturado ao do segundo, seguido de uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o conteúdo de cada reação foi adicionado a um poço de células, que foram incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

3.9.2 Adição do vírus e tratamento

Após a etapa de transfecção, procedeu-se à adição do fulerol na concentração de 3,125 nM e do vírus DENV2 (MOI 1) nos grupos designados, mantendo-se a incubação por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. O experimento incluiu quatro poços como controle celular (não infectado), quatro poços infectados com DENV2 e quatro poços infectados com DENV2 e tratados com fulerol, permitindo assim a avaliação comparativa dos efeitos do vírus e da ação terapêutica do composto sob as mesmas condições experimentais.

3.9.3 Ensaio de Dual-Luciferase

Este ensaio teve como objetivo avaliar a atividade do fator de transcrição NRF2/ARE. Para a análise de luciferase, foi utilizado o kit Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), seguindo-se as instruções do fabricante. Este kit possibilitou a dosagem de duas enzimas luciferase, provenientes do vagalume e da *Renilla* sp., em uma única amostra, proporcionando uma quantificação altamente sensível com controle interno da transfecção. Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS. Em cada poço, foram adicionados 40 µL de *Passive Lysis Buffer* 1X (PBL - Promega), e a placa foi agitada por 15 minutos. O lisado resultante foi armazenado em microtubos a -20 °C.

A quantificação foi realizada em um luminômetro, programado para um atraso de leitura de 2 segundos, seguido por duas leituras de 10 segundos cada. Para cada amostra, foram adicionados 20 µL de lisado celular em um tubo, seguidos de 40 µL da solução LARII, que é o substrato da enzima luciferina (luciferase de vagalume). Após a leitura, adicionou-se 40 µL do reagente Stop&Glo, que inativou a luciferase de vagalume e forneceu o substrato para a luciferase de *Renilla* sp. Os valores

obtidos na primeira leitura foram divididos pelos resultados da segunda leitura, sendo então normalizados em relação aos controles.

3.10 Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A concentração de TBARS foi determinada com base na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídeos oxidados, formando malondialdeído. As condições experimentais seguiram o mesmo protocolo das análises anteriores. Após a incubação celular e lise, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi utilizado para leitura. Foram misturados 500 µL do homogenato celular 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). A mistura foi aquecida por 15 minutos a 95 °C e resfriada em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A absorbância do sobrenadante foi determinada a 535 nm.

Para a quantificação, foi realizada uma curva de calibração utilizando 1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP), que reage com o TBA formando um complexo corado estável. Uma solução de 500 µM de TMP foi preparada para a construção da curva, que foi realizada conforme mostra o Quadro 1:

Quadro 1 - Estabelecimento de valores para curva de concentração

Pontos da curva	Quantidade de TMP 500 μ M (μ L)	Quantidade de água (μ L)	Concentração (μ mol/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

Fonte: Própria autora

Para o branco, foi utilizada 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 de proteína, corrigidos para porcentagem relativa ao controle celular. Vinte microlitros (20 μ L) da amostra foram utilizados para a dosagem de proteínas totais.

3.11 Proteína carbonilada

As espécies reativas de oxigênio podem modificar proteínas por oxidação, formando compostos carbonílicos, os quais podem ser detectados por métodos sensíveis. Células VERO foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem 90% de confluência (1×10^6 células por poço). Três grupos experimentais foram definidos: um grupo controle, um grupo infectado com MOI de 1 e um grupo infectado com MOI de 1 e tratado com fullerol [3,125nM]. Após 24 horas de

incubação, as células foram lavadas com PBS e raspadas com um scraper em 530 μ L de tampão fosfato. As amostras foram sonicadas por 10 minutos e submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento a -80°C . Em seguida, 500 μ L do homogeneizado celular foram tratados com 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% e centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi tratado com 500 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e mantido no escuro por uma hora, sendo misturado a cada 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 500 μ L de TCA, seguido de nova centrifugação. O precipitado foi lavado duas vezes com solução etanol/acetato de etila (1:1) e resolubilizado em 1 mL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 6%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 370 nm, e os resultados foram expressos em nMoles/mg de proteína, corrigidos para porcentagem relativa ao controle celular.

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad Prism 9, utilizando-se o teste t não pareado e ANOVA One-Way, com pós-testes de Sidak e Tukey ($p < 0,05$). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram indicadas por símbolos distintos.

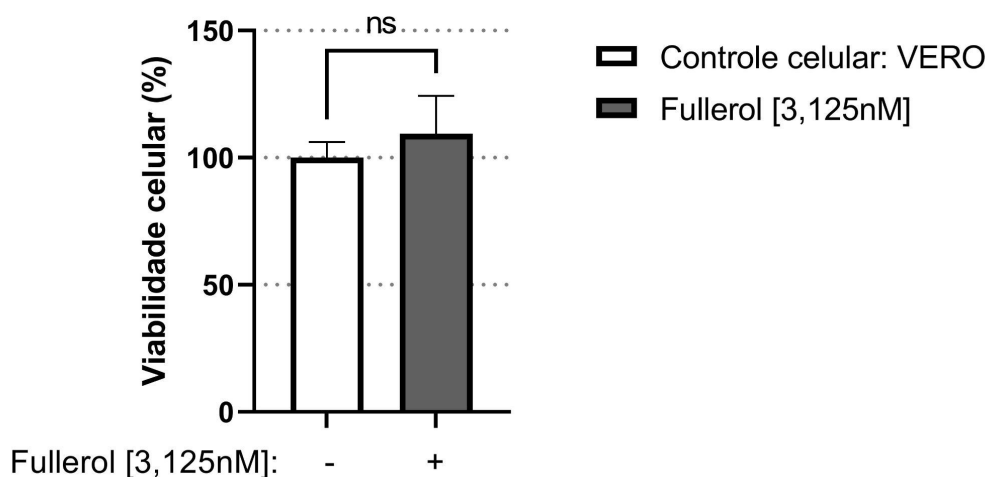
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade Celular

Para a análise e interpretação dos resultados obtidos neste estudo, consideraram-se os achados previamente documentados por nosso grupo de pesquisa. O ensaio inicial conduzido avaliou a viabilidade celular da linhagem VERO em contato com fulerol na concentração de 3,125 nM. A seleção desta concentração baseou-se em estudos anteriores do laboratório (Malta, 2023), que a identificaram como a de máxima eficácia antioxidante para este composto. Adicionalmente, observou-se que concentrações superiores resultam na perda da atividade antioxidante devido ao fenômeno de cristalização do nanocomposto.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular, previamente descritos, demonstraram que nenhuma das concentrações testadas comprometeu a integridade celular, corroborando o perfil de segurança do fulerol para aplicações em modelos celulares VERO. A seleção desta linhagem celular justificou-se pela sua performance superior em termos de crescimento sob as condições experimentais estabelecidas e pela resposta mais robusta às infecções virais, conforme documentado em investigações prévias (Pereira, 2020; Malta, 2023). Conforme ilustrado na Figura 5, os dados confirmam a ausência de efeitos citotóxicos do fulerol na linhagem VERO na concentração otimizada.

Figura 5 - Teste de viabilidade celular após tratamento com fullerol. Avaliação do efeito citotóxico do fullerol na concentração de [3,125nM] em células VERO por ensaio de viabilidade celular por MTT. (ns) não apresenta significância estatística para análise teste T não pareado.

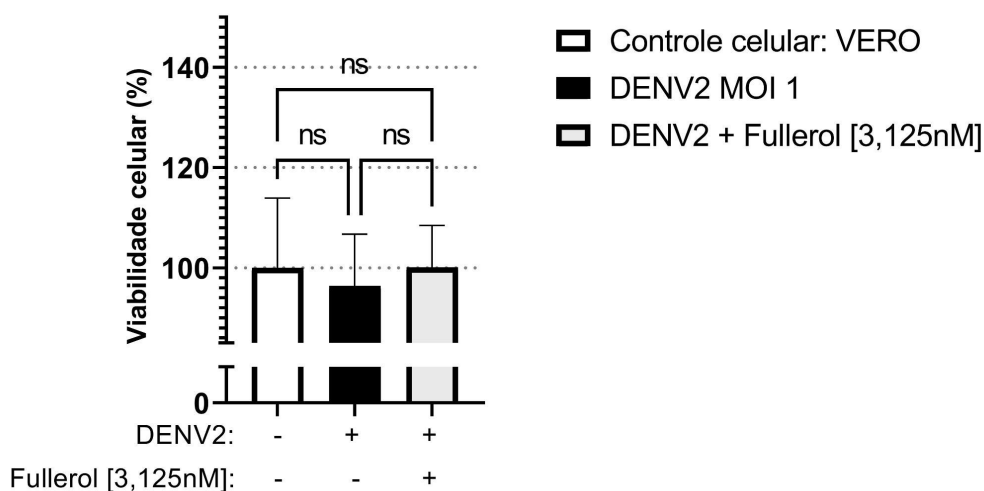


Fonte: própria autora

O segundo ensaio realizado teve como objetivo avaliar a ação do vírus da dengue tipo 2 (DENV-2) utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1. A seleção do sorotipo 2 justificou-se pela sua maior relevância epidemiológica e impacto no cenário das infecções por dengue (Lopes et al., 2014). A MOI de 1 (vírus/célula) foi selecionada por apresentar os resultados mais consistentes nas infecções realizadas no período estabelecido de 24 horas.

Para avaliação da ação do fullerol, a administração do composto foi realizada concomitantemente à infecção viral, metodologia previamente validada por Malta (2023) como a mais eficaz para a ação do nanocomposto em células infectadas. O delineamento experimental incluiu um grupo controle não tratado, um grupo infectado e um grupo infectado e tratado com fullerol imediatamente após a infecção, conforme esquematizado na Figura 6.

Figura 6 - Ensaio de MTT. Resultados da análise da viabilidade celular após infecção por DENV2 (MOI de 1), depois de 24h de infecção e efeitos do tratamento com fullerol [3,125nM]. (ns) não apresenta significância estatística para One-Way ANOVA com pós teste de Šídák's.



Fonte: própria autora.

Observou-se uma tendência de redução na viabilidade celular induzida pela infecção com DENV-2, embora, nas condições de MOI e tempo estabelecidas, esta redução não tenha alcançado significância estatística. Para a confirmação da infecção foi observado a formação de efeito sincicial citopático característico de infecções com DENV2. Esta condição é fundamental para garantir que não ocorram interferências nos demais ensaios decorrentes de perda de viabilidade celular. Destaca-se que o grupo infectado e tratado com fullerol manteve 100% de viabilidade celular, demonstrando não apenas a ausência de citotoxicidade do composto, mas também seu potencial citoprotetor frente à infecção viral.

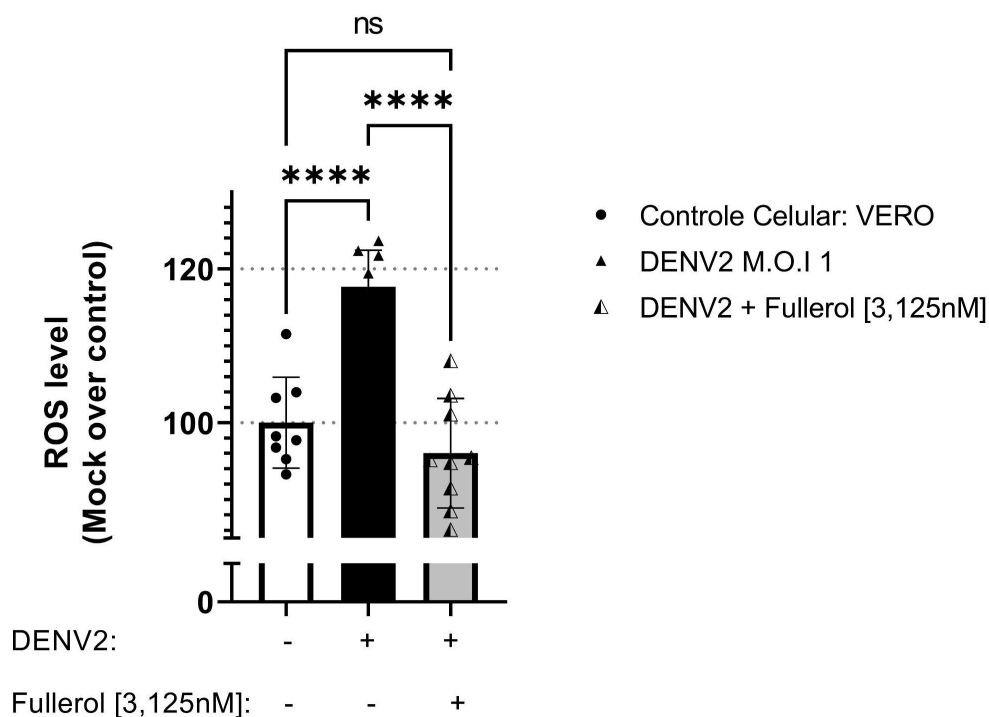
4.2 Avaliação de EROs e ERNs intracelular após a infecção e tratamento com fullerol

Para as análises realizadas foi utilizado fullerol somente a concentração de [3,125nM], bem como o tratamento de dose única com aplicação no momento da infecção por DENV2, conforme protocolo descrito nos estudos anteriores do nosso grupo que elucidaram esta como a maneira mais eficaz para investigação do tratamento com fullerol no efeito agudo da infecção do vírus por até 24 horas (Malta,

2023; Pereira, 2020). Para a análise de EROs o método utilizado foi o do uso da sonda fluorescente Carboxi-H₂DCFDA, que apresenta alta precisão para mensurar os níveis intracelulares.

Conforme demonstrado na Figura 7, o grupo infectado com DENV2 apresentou um aumento de 18% na produção de EROs intracelulares em comparação ao grupo controle em 24 horas, revelando a capacidade do vírus de induzir um ambiente de estresse oxidativo nas células. Os dados relativos ao tratamento com fullerol indicaram que o composto foi capaz de reduzir em aproximadamente 4% a concentração de EROs intracelulares em relação ao grupo controle. Esses resultados sugerem o potencial citoprotetor do composto no contexto do estresse oxidativo causado pela infecção viral.

Figura 7 - Dosagem de Espécies Reativas de oxigênio (EROS). Foram utilizadas células VERO infectadas com DENV2 (MOI 1) e tratadas com Fullerol [3,125nM] por 24 horas. A sonda de ROS Carboxi-H₂DCFDA foi usada para leitura por intensidade de fluorescência no leitor de microplacas VICTOR X3. (ns) não apresenta significância estatística (****) representa diferença estatística para $p < 0,0001$ por One-Way ANOVA com pós teste de Šídák's.



Fonte: própria autora

A característica do DENV em elevar os níveis de EROs intracelulares foi previamente documentada na literatura (Meuren et al., 2022; Olnagier et al., 2014), embora os mecanismos subjacentes a esse fenômeno ainda não estejam completamente elucidados. Estudos investigam como a modulação de vias antioxidantes interfere na concentração de espécies reativas (Ferrari et al., 2020; Kuzmenko et al., 2016), além de possivelmente relacionar-se com o processo de fagocitose do vírus por células dendríticas durante a infecção, o que influencia a produção de EROs e, conseqüentemente, a replicação viral. Tais interações podem contribuir para a susceptibilidade celular à infecção e agravamento da doença (Olnagier et al., 2014).

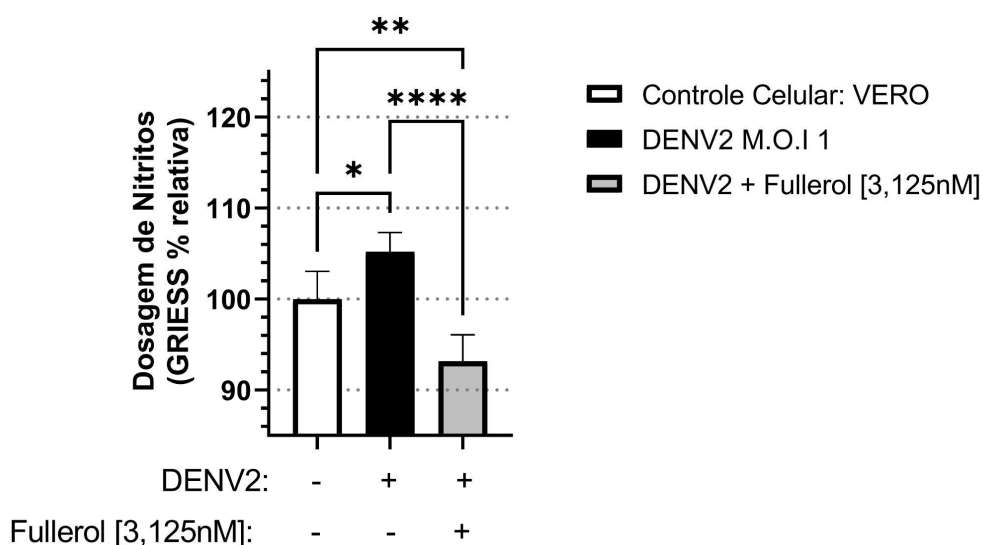
O uso de compostos antioxidantes, como o fulerol, demonstra relevante potencial terapêutico para infecções virais, uma vez que a capacidade do nanocomposto em sequestrar EROs e reduzir sua concentração intracelular já foi previamente documentada (Malta, 2023; Pereira, 2020). Essa redução pode estar associada à modulação da via NRF2/ARE, bem como à capacidade do composto em restabelecer a homeostase redox.

Em relação aos estudos de espécies reativas de nitrogênio (ERNs), mensurou-se o nível de nitrito presente nas amostras, principal subproduto do óxido nítrico (NO), o qual constitui um dos principais componentes das ERNs nos processos oxidativos. Conforme ilustrado na Figura 8, a infecção com DENV-2 resultou em aumento de 5% na produção de nitrito intracelular em comparação ao grupo controle. No grupo tratado com fulerol, observou-se que o composto não apenas normalizou os níveis basais de nitrito, mas também promoveu redução de 7% em relação ao controle, demonstrando sua capacidade de estabilizar o ambiente intracelular frente à produção de ERNs.

O óxido nítrico representa um dos principais mediadores da resposta inflamatória desencadeada pela fagocitose de antígenos virais. A ação antimicrobiana dos fagolisossomos em células de defesa contribui para o aumento de espécies reativas intracelulares e ativa vias – ainda não completamente elucidadas na literatura – que podem simultaneamente favorecer a replicação viral e o agravamento da patologia (Cruvinel, 2010; Ferrari et al., 2020).

Com o objetivo de elucidar adicionalmente os mecanismos de ação do fulerol, procedeu-se à análise e quantificação das principais enzimas antioxidantes envolvidas nos processos de estresse oxidativo.

Figura 8 - Dosagem de nitritos (GRIESS). Células VERO infectadas com DENV2 (MOI 1) e tratadas com fullerol [3,125nM] por 24h, a dosagem de griess fornece um parâmetro indireto dos níveis de óxido nítrico, principal espécie reativa de nitrogênio. (*) (**) (****) representa diferença estatística para $p < 0,05$; $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente, para One-Way ANOVA com pós teste de Šídák's.



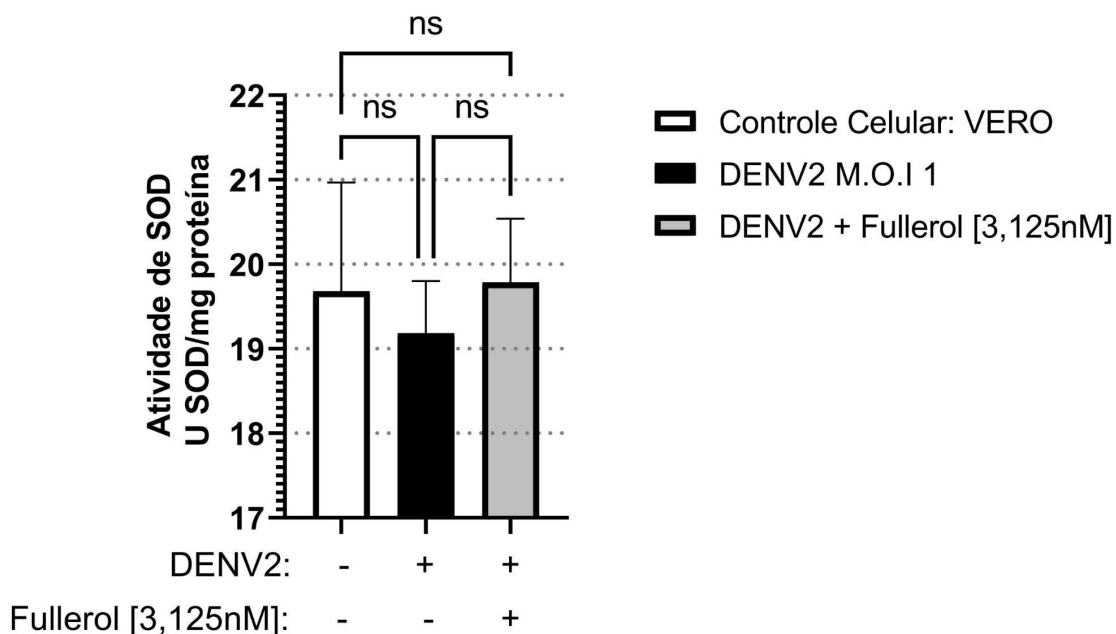
Fonte: própria autora

4.3 Dosagem de enzimas antioxidantes após a infecção e tratamento com fullerol

As análises realizadas revelaram o perfil das principais enzimas antioxidantes envolvidas no sistema de defesa redox, com destaque para a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Conforme demonstrado na Figura 9, que ilustra a atividade da SOD, observou-se que a infecção por DENV-2 promoveu redução não significativa de 3% nos níveis desta enzima em relação ao grupo controle. No grupo tratado com fullerol, registrou-se aumento igualmente não significativo de 1% na atividade enzimática quando comparado aos níveis basais.

Estes resultados permitem inferir que o DENV-2 não exerce influência estatisticamente significativa sobre as concentrações de SOD em células VERO nas primeiras 24 horas de infecção.

Figura 9 - Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD). A partir de células VERO infectadas com DENV2 (MOI 1) e tratadas com Fullerol por 24h, a atividade da enzima foi mensurada pelo método de Marklund. (ns) não apresenta significância estatística para One-Way ANOVA com pós teste de Šídák's.

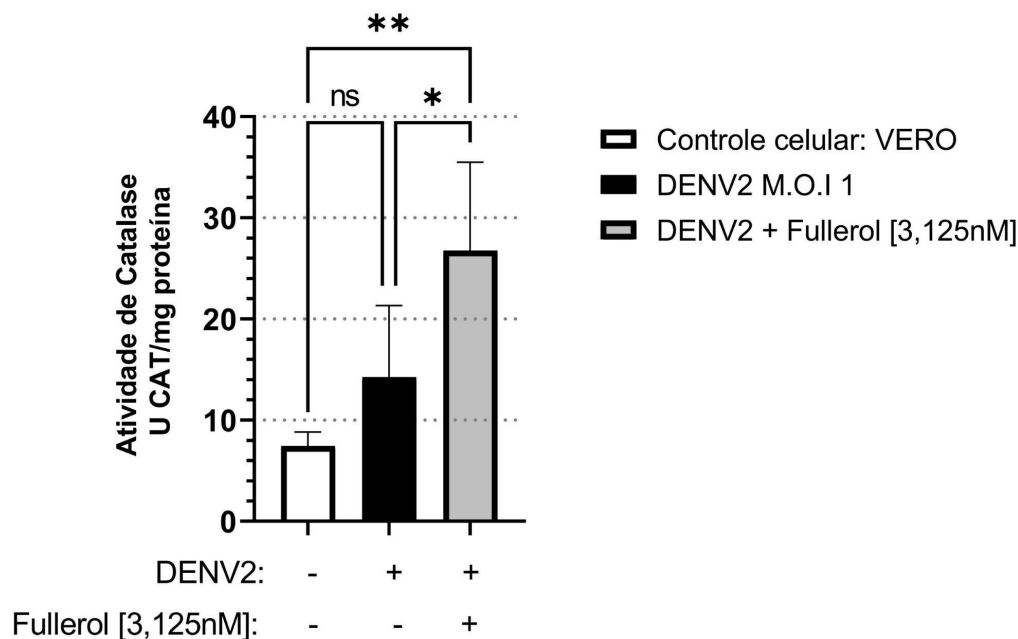


Fonte: própria autora

Na análise da atividade da catalase (CAT), conforme demonstrado na Figura 10, observa-se que a infecção por DENV-2 promoveu discreto aumento nos níveis enzimáticos, embora sem significância estatística. Este comportamento pode ser atribuído à resposta celular adaptativa frente a estímulos de estresse oxidativo. Em contraste, o grupo tratado com fullerol apresentou aumento significativo de 2,5 vezes na atividade da CAT em relação ao grupo controle, diferentemente do padrão observado para a SOD.

Ao interpretar os resultados das análises das enzimas antioxidantes, infere-se que o aumento de EROs e ERNs decorrente da infecção por DENV-2 pode desencadear a ativação de vias enzimáticas envolvidas no sistema de defesa e homeostase redox. A literatura documenta que o DENV pode modular a via NRF2/ARE, uma importante via de defesa antioxidante, influenciando consequentemente na replicação viral e na resposta imune (Ferrari et al., 2020). Durante a ativação dos mecanismos de defesa antiviral, observa-se frequentemente a regulação de enzimas antioxidantes para contenção de espécies reativas.

Figura 10 - Dosagem de Catalase (CAT). Células VERO infectadas com DENV2 (MOI 1) e tratadas com Fullerol por 24h, a atividade da enzima foi mensurada pela absorbância na presença de peróxido de hidrogênio por 1 minuto. (ns) não apresenta significância estatística (*) representa significância em $p < 0,05$ para One-Way ANOVA com pós teste de Šídák's.



Fonte: própria autora

Paralelamente, o tratamento com fullerol revelou um aumento seletivo e pronunciado nos níveis de CAT, o que pode estar associado à capacidade do nanocomposto em neutralizar espécies oxidantes, levando à acumulação compensatória de enzimas antioxidantes – particularmente da CAT – em vez de à estimulação direta da via NRF2/ARE. Esta relação causal direta entre a ação da nanopartícula e a regulação da via NRF2/ARE ainda não foi demonstrada experimentalmente, necessitando de investigações adicionais para elucidar o mecanismo de atuação seletiva do composto sobre a CAT em detrimento da SOD.

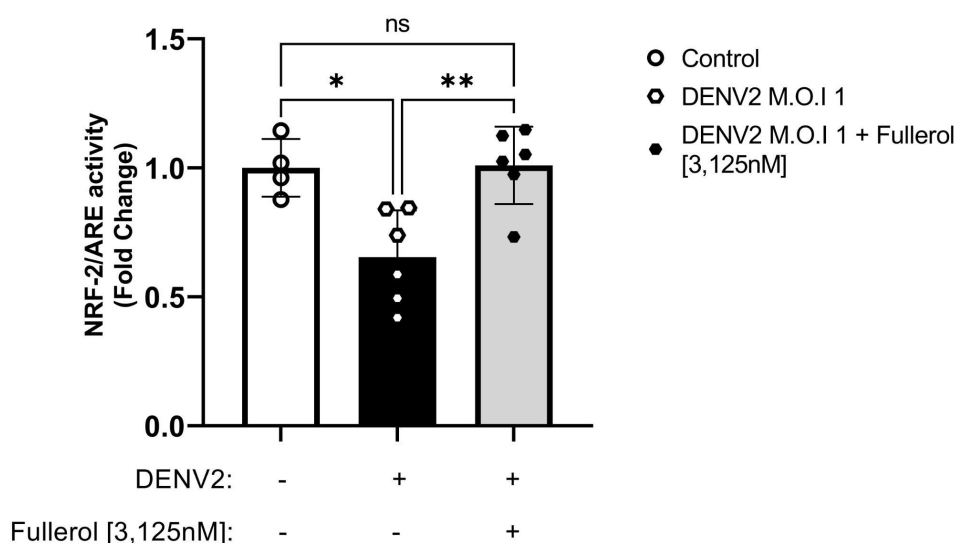
Considerando que os níveis basais das enzimas mantiveram-se relativamente estáveis, investigou-se a atividade da via NRF2/ARE após 24 horas de infecção, conforme referenciado em estudos prévios (Malta, 2023; Pereira, 2020; Ferrari et al., 2020).

4.4 Atividade da via NRF2/ARE após infecção e tratamento com fullerol

O estresse oxidativo celular caracteriza-se pelo desequilíbrio homeostático entre agentes oxidantes e antioxidantes, sendo o aumento de EROs e ERNs um componente fundamental deste processo. A atividade transcricional da via NRF2/ARE desempenha papel crucial nesta dinâmica, uma vez que regula a expressão de enzimas antioxidantes fundamentais (Jaganjac et al., 2022). A literatura documenta que alguns vírus modulam negativamente esta via, suprimindo a resposta antioxidante celular. Desta forma, compostos capazes de ativar positivamente esta via representam candidatos terapêuticos promissores (Ramezani; Nahad; Faghihloo, 2018).

Para avaliação da atividade transcricional da via NRF2/ARE, selecionou-se a concentração de 3,125 nM de fullerol, previamente estabelecida como a de maior eficácia antioxidante em estudos do grupo (Malta, 2023). Utilizaram-se células VERO infectadas com DENV-2 na MOI de 1. Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Figura 11.

Figura 11 - Atividade de NRF2/ARE. Células VERO infectadas com DENV2 (MOI 1) e tratadas com Fullerol por 24h, a atividade foi mensurada por ensaio de Dual-luciferase. (ns) não apresenta significância estatística (*) representa significância em $p < 0,05$ para One-Way ANOVA com pós teste de Šídák's.



Observou-se que o DENV-2 promoveu redução de 35% na atividade da via NRF2/ARE 24 horas pós-infecção (24 hpi). Em contrapartida, o tratamento com fulerol [3,125 nM] restabeleceu a atividade desta via aos níveis basais em relação ao grupo controle, demonstrando a capacidade do composto em recuperar a homeostase redox in vitro. A modulação da via NRF2/ARE já foi documentada em outros vírus, como o vírus sincicial respiratório (VSR) e o vírus da hepatite C (HCV) (Ramezani; Nahad; Faghihloo, 2018).

Estudos anteriores relataram a manipulação da via NRF2 pelo DENV. Cheng et al. (2016) demonstraram que o vírus aumenta a expressão desta via a partir de 6 hpi, sugerindo que este incremento inicial integra um mecanismo viral de indução de TNF- α . Este fenômeno explica a manutenção dos níveis basais de enzimas antioxidantes mesmo às 24 hpi, conforme observado em nossos resultados. Investigações futuras objetivam realizar mensurações em tempos inferiores e superiores a 24 hpi para elucidar a cinética completa desta modulação.

Ferrari et al. (2020) documentaram que este aumento inicial é transitório, seguido por redução significativa da atividade da via entre 24 e 48 hpi, corroborando nossos achados. Em nosso grupo de pesquisa, Malta (2023) demonstrou padrão semelhante para o ZIKV.

Os mecanismos pelos quais o fulerol normaliza a atividade da via permanecem desconhecidos. Considerando as modulações observadas na via durante a infecção, procedeu-se à avaliação dos danos celulares a macromoléculas.

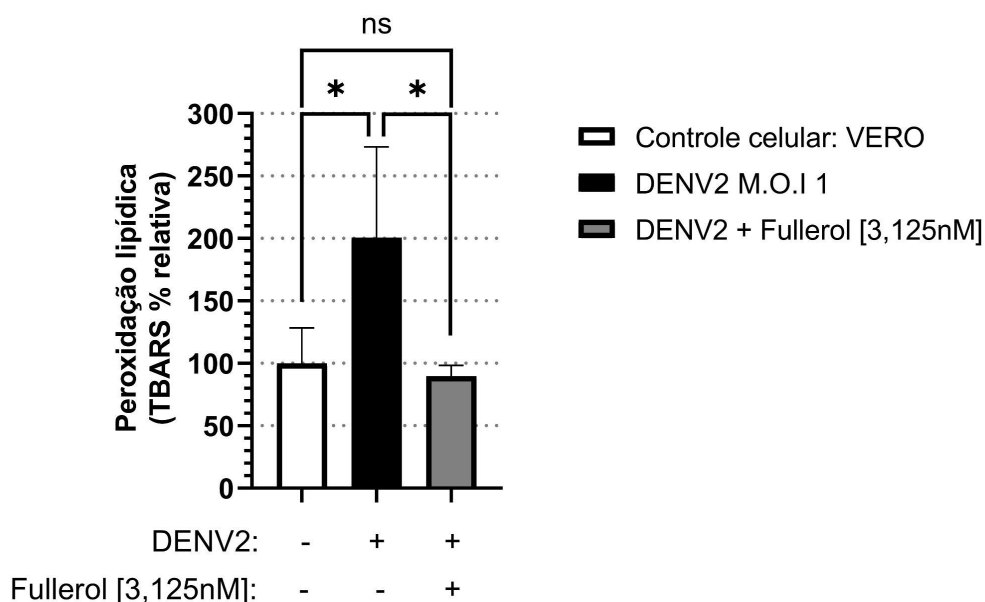
4.5 Efeito em biomoléculas após infecção e tratamento com fulerol

No que concerne aos danos celulares, investigaram-se tanto os prejuízos aos lipídios, por meio de marcadores de peroxidação lipídica, quanto os danos às proteínas, através da quantificação de carbonilação proteica.

Conforme demonstrado na Figura 12, o DENV-2, embora não tenha induzido alterações significativas nos níveis de enzimas antioxidantes, promoveu aumento de 100% na peroxidação lipídica em comparação ao grupo controle, evidenciando claramente a instalação de um cenário de estresse oxidativo. Em contraste, o tratamento com fulerol não apenas manteve as condições basais celulares, mas também promoveu redução de aproximadamente 10% nos níveis de peroxidação lipídica em relação ao controle, demonstrando a capacidade citoprotetora do

composto contra danos lipídicos mesmo em condições extremas de estresse oxidativo induzidas pelo DENV-2.

Figura 12 - Determinação da peroxidação lipídica. Células VERO infectadas com DENV2 (MOI 1) e tratadas com fulerol por 24h, a peroxidação de lipídios foi determinada pelo método de dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). (ns) não apresenta significância estatística (*) representa significância em $p < 0,05$ para One-Way ANOVA com pós teste de Šídák's.



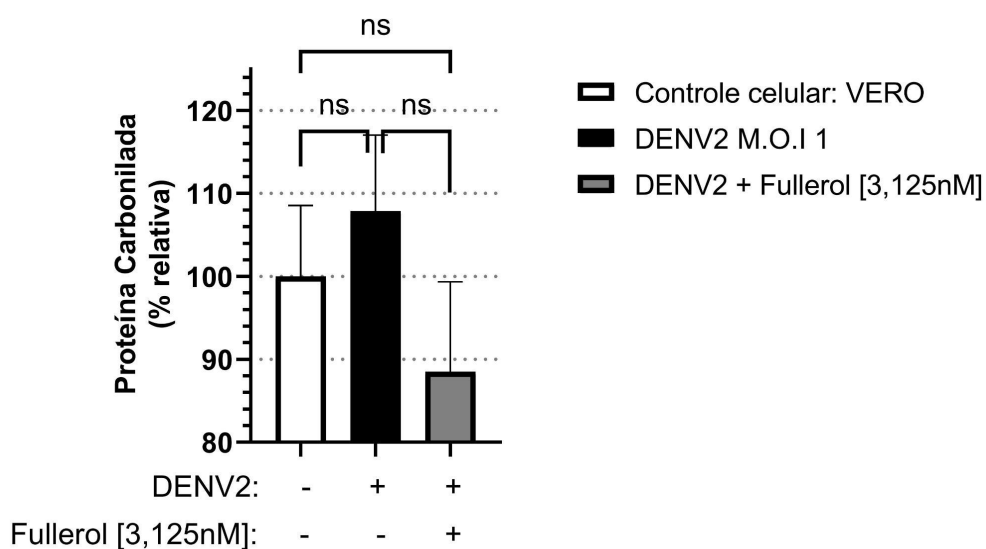
Fonte: própria autora

No que se refere à carbonilação proteica, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas, conforme demonstrado na Figura 13, identificou-se tendência de aumento induzido pela infecção viral, com elevação de aproximadamente 8% nos marcadores de carbonilação em relação ao grupo controle. De modo análogo, o tratamento com fulerol não apenas manteve os níveis basais, mas também promoveu redução de aproximadamente 12% nos marcadores de dano proteico.

Inferiu-se que esta diferença possa tornar-se mais pronunciada em períodos superiores a 24 horas, reforçando a tendência observada nas análises. O composto demonstra, portanto, potencial para proteger as células contra este tipo de dano oxidativo. Considerando as evidências de capacidade citoprotetora do fulerol,

reconenda-se a condução de novas análises temporais para avaliação destes resultados e elucidação dos mecanismos de ação do composto.

Figura 13 - Determinação da carbonilação de proteínas. Células VERO infectadas com DENV2 (MOI 1) e tratadas com fullerol por 24h, a quantificação do conteúdo de proteína carbonilada foi determinada pelo método adaptado de REZNICK; PACKER. (ns) não apresenta significância estatística para One-Way ANOVA com pós teste de Šídák's.



Fonte: própria autora

5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o DENV-2 induz significativo estresse oxidativo em células infectadas mesmo em períodos curtos de infecção. O fulerol apresentou relevante atividade antioxidante e citoprotetora, reduzindo a produção de EROs e ERNs, normalizando a atividade da via NRF2/ARE e protegendo as células contra danos oxidativos.

Embora os mecanismos moleculares de ação do fulerol requeiram investigação adicional, os resultados sustentam seu potencial biotecnológico como agente terapêutico complementar no manejo da dengue. Estudos futuros deverão focar na caracterização detalhada de seus efeitos antivirais diretos, incluindo a quantificação de carga viral e partículas infecciosas, bem como na expansão dos ensaios para modelos celulares humanos mais complexos.

Conclui-se que o fulerol representa uma estratégia terapêutica promissora contra o estresse oxidativo induzido por flavivírus, merecendo investigações adicionais para seu desenvolvimento terapêutico.

6 REFERÊNCIAS

AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1 jan. 1984.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dengue**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dengue>. Acesso em: 8 set. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução-RE nº 661, de 2 de março de 2023**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2 mar. 2023. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-re-n-661-de-2-de-marco-de-2023-467449608>. Acesso em: 26 fev. 2025.

CHENG, Yi-Lin et al. Activation of Nrf2 by the dengue virus causes an increase in CLEC5A, which enhances TNF- α production by mononuclear phagocytes. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 32000, 2016.

COMHAIR, Suzy A. A.; ERZURUM, Serpil C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, n. 2 27-2, 2002b.

COMMUNICATION, Comunicação J. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, jul. 2010.

CRUVINEL, Wilson de Melo et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, ago. 2010.

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, 23 nov. 2020.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.

Flavivirus | **PFCONA**. Disponível em: <https://pfcona.org/recursos-portugu%c3%aas/>. Acesso em: 6 jul. 2025.

Gênero: Orthoflavivirus | **ICTV**. Disponível em: <https://ictv.global/report/chapter/flaviviridae/flaviviridae/orthoflavivirus>. Acesso em: 6 jul. 2025.

GREEN, Laura C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1 out. 1982.

JAGANJAC, Morana *et al.* Oxidative stress and regeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 181, p. 154-165, 2022.

KRAMER, Laura D.; CIOTA, Alexander T. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 15, p. 112–118, 1 dez. 2015.

KUZMENKO, Yulia V. *et al.* Nonstructural Protein 1 of Tick-Borne Encephalitis Virus Induces Oxidative Stress and Activates Antioxidant Defense by the Nrf2/ARE Pathway. **Intervirology**, v. 59, n. 2, p. 111–117, 20 dez. 2016.

LOPES, Nayara *et al.* Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 10–10, ago. 2014.

MALTA, Wellington Carvalho. **Caracterização da atividade antioxidante do fullerol em infecções por Zika virus e Chikungunya virus.** , 2023. Disponível em: <<http://www.repositorio.ufop.br/jspui/handle/123456789/17528>>. Acesso em: 27 jul. 2025

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.

MCMENAMIN, Martina. Global Dengue Epidemiological Situation. 2024.

MEUREN, Lana Monteiro *et al.* Infection of Endothelial Cells by Dengue Virus Induces ROS Production by Different Sources Affecting Virus Replication, Cellular Activation, Death and Vascular Permeability. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 810376, 2 fev. 2022.

National Center for Biotechnology Information. "PubChem Compound Summary for CID 24978542, Hydroxyl Fullerene" PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxyl-Fullerene>. Acesso em 5 Março, 2025.

OLAGNIER, David *et al.* Cellular Oxidative Stress Response Controls the Antiviral and Apoptotic Programs in Dengue Virus-Infected Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, 1 dez. 2014.

PEREIRA, Samille Henriques *et al.* Antioxidant and antiviral activity of fullerol against Zika virus. **Acta Tropica**, v. 224, p. 106135, 1 dez. 2021.

RAMEZANI, Ali; NAHAD, Mehdi Parsa; FAGHIHLOO, Ebrahim. The role of Nrf2 transcription factor in viral infection. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 8, p. 6366–6382, 1 ago. 2018.

RENATO DULBECCO, By. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 38, n. 8, p. 747–752, 1 ago. 1952.

ROKITSKAYA, Tatyana I.; ANTONENKO, Yuri N. Fullerenol C₆₀(OH)₂₄ increases ion permeability of lipid membranes in a pH-dependent manner. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 6, p. 1165–1174, 1 jun. 2016.

ROSS, Ted M. Dengue Virus. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, p. 149–160, 2010.

ROY, Sudipta Kumar; BHATTACHARJEE, Soumen. Dengue virus: Epidemiology, biology, and disease aetiology. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 687–702, 2021.

SEMENOV, K. N. *et al.* Fullerenols: Physicochemical properties and applications. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 59–74, 1 jun. 2016.

SHOPE, Robert E.; MEEGAN, James M. Arboviruses. **Viral Infections of Humans**, p. 151–183, 1997.

SIMMONDS, Peter *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 1 jan. 2017.

VALKO, Marian *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 1 jan. 2007a.

VALKO, Marian *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 1 jan. 2007b.

WEAVER, Scott C. *et al.* Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annual Review of Medicine**, v. 69, p. 395–408, 28 ago. 2017.