



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA FENILFLUORONA COM O VÍRUS ZIKA E SEUS
EFEITOS *IN VITRO* EM CULTURAS CELULARES**

JAMILE GOMES CONCEIÇÃO

**Bahia – Brasil
2021**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DA FENILFLUORONA COM O VÍRUS ZIKA E SEUS
EFEITOS *IN VITRO* EM CULTURAS CELULARES**

JAMILE GOMES CONCEIÇÃO

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em
Patologia Humana para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Co-Orientador: Prof. Dr. Samuel Silva da Rocha Pita

**Bahia – Brasil
2021**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Bahia – Salvador

C744e Conceição, Jamile Gomes.

Estudo da interação da fenilfluorona com o vírus zika e seus efeitos *in vitro* em culturas celulares / Jamile Gomes Conceição. _ Salvador, 2021.

83 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Ramon dos Santos El-Bachá

Co-Orientador: Prof. Dr. Samuel Silva da Rocha Pita

Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. *Zika vírus*. 2. Biologia celular. 3. Fenilfluorona. 4. Interação molecular.
I. Título.

CDU 576.5

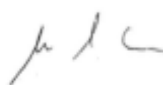
"ESTUDO DA INTERAÇÃO DA FENILFLUORONA COM AMINOÁCIDOS DA GLICOPROTEÍNA E DO ENVELOPE DO VÍRUS ZIKA E SEUS EFEITOS EM CÉLULAS IN VITRO".

Jamile Gomes Conceição

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 30 de novembro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



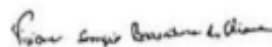
Dr. Marcelo Santos Castilho
Professor
UFBA



Dra. Simone Garcia Macambira
Professora
UFBA



Dr. Gubio Soares Campos
Professor
UFBA



Dra. Viviane Sampaio Boaventura de Oliveira
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dr. Ramón dos Santos El-Bachá
Professor
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Patologia Humana.

À Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina- UFBA.

*A minha mãe,
Ednalva G. Conceição, minha parceira,
símbolo de um amor incondicional .*

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a meu orientador, Professor Dr. Ramon dos Santos El-Bachá, um ser humano incrível que me fez perceber que é possível encontrar inteligência, sabedoria, simplicidade e amparo em um pesquisador de altíssimo gabarito. Seguirei minha trajetória profissional me espelhando em seus ensinamentos. Obrigada por tudo Professor !

Ao meu co-orientador, Professor Dr. Samuel Pitta, obrigada por aceitar gentilmente o convite para participar deste trabalho, pela parceria, pela disponibilidade e atenção, sempre muito atencioso em todos os momentos que precisei. Gratidão!

Aos colaboradores Prof. Dr. Ricardo Koury, Dr. Everton Batista, Dr. Pedro Paulo Carneiro, Dr.^a Silvia Sardi por cederem de forma atenciosa espaço em seus laboratórios para que eu pudesse aprender e desenvolver técnicas que não são realizadas no LabNq.

Aos líderes Neuroquímicos do LabNq: prof. Dr. Ramon El-Bachá, prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Costa, prof.^a Dr.^a Silvia Costa, e Dr. Victor Diógenes. Estendo os meus agradecimentos a toda "família" LabNq, colegas e servidores. Obrigada pela acolhida, pelos ensinamentos, e pela oportunidade de convivência.

Aos meus parceiros de vida científica, Beto e Priscila, meus coligados, por todos os momentos de alegria e perrengues que compartilhamos juntos, foram 5 anos de muita cumplicidade. Assim como às amigas Julita e Ísis, que terminaram antes da gente, mas contribuíram imensamente para que eu chegasse até aqui. Esse grupo ficará sempre presente em minha memória.

Um agradecimento especial também a meu amigo e colaborador Dr. Pedro Paulo Carneiro, por todo incentivo, paciência e suporte técnico-pedagógico-psicológico, você foi incrível!

À força dos meus ancestrais que lutaram para que eu pudesse estar neste lugar. Assim como a meus pais, que investiram em minha educação, acreditaram, apoiaram, e que me

ensinaram a buscar o que ninguém pode tirar de mim, “o conhecimento”. A contribuição de vocês nesse processo foi imensurável.

A meu irmão Thiago Gomes, que é como um oráculo na minha vida, aquele que me conhece melhor que eu mesma, que me diz o que fazer nos momentos mais delicados, que compreende minhas ideias não convencionais, que equilibra a minha emoção com a sua racionalidade e sabedoria.

Aos meus familiares e amigos, que me reprovaram por falta e participação em muitos encontros, eventos, reuniões, aniversários etc., mas que compreenderam que era uma etapa importante na minha vida e torceram pelo meu sucesso.

Ao meu terapeuta Meyzon de Jesus, o seu trabalho com toda a certeza foi crucial para que eu finalizasse mais esta etapa de vida. Meus agradecimentos serão eternos.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o
tempo que nos é dado.”

(J.R.R.Tolkien 1892-1973)

CONCEIÇÃO, Jamile Gomes. **Estudo da interação da fenilfluorona com o vírus zika e seus efeitos *in vitro* em culturas celulares.** 83 f.: il. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

RESUMO

Zika é uma doença que pertence ao gênero flavivírus, um membro da família flaviviridae. A doença foi originada pelo vírus (com mesmo nome do patógeno) e se tornou um problema de saúde pública mundial devido a associação com microcefalia em fetos humanos. Em 2015, o Brasil se tornou o epicentro do surto de Zika, com alto potencial de expansão geográfica para outros países. Flavivírus têm resíduos de aminoácidos altamente preservados na glicoproteína E, com potencial para ser covalentemente modificado com catecóis e seus derivados. **OBJETIVO:** Este trabalho investigou no primeiro momento a interação de aminoácidos da glicoproteína E do envelope do vírus da Zika com um derivado de catecol, a Fenilfluorona *in silico*, e posteriormente avaliou os efeitos da interação desse composto com o vírus em culturas celulares. **METODOLOGIA:** Foram analisados os possíveis locais de ligação da Fenilfluorona com resíduos de aminoácidos da glicoproteína E *in silico*. A concentração não citotóxica da Fenilfluorona em linhagem de glioblastoma U-251 foi identificada por teste de viabilidade celular. Comparou-se a infectividade do vírus selvagem (não modificado com Fenilfluorona) com a do vírus modificado em cultura de células Vero pela formação de unidades formadoras de placas (PFU). Investigou-se a expressão de citocinas TNF, IL-8 e IL-10 pelas células U-251 por *ELISA* **RESULTADOS:** Os resultados demonstraram que a Fenilfluorona interage de forma mais estável com o ectodomínio I da glicoproteína E do Zika vírus. A linhagem U-251 de células de glioblastoma são resistentes a concentrações de Fenilfluorona menores que 49,9 µM. O vírus modificado com Fenilfluorona na concentração de 499 µM mostrou redução na titulação viral em células Vero. Não houve alteração na expressão das interleucinas TNF e IL-10 em células Vero infectadas com o vírus modificado, mas a produção de IL-8 em células infectadas pelo vírus modificado foi maior do que em células controles não infectadas.

Palavras-chave: Zika vírus. Biologia celular. Fenilfluorona. Interação molecular.

CONCEIÇÃO, Jamile Gomes, **Study of the interaction of phenylfluorone with the zika virus and its in vitro effects on cell.83 f.: il.** Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

ABSTRACT

Zika is a virus that belongs to the Flavivirus genus, a member of the Flaviviridae family. The disease originated by this virus (that has the same name of the pathogen) has become a worldwide public health problem due to its association with microcephaly in human fetuses. In 2015, Brazil became the epicenter of the Zika outbreak, with high potential for geographic expansion to other countries. Flaviviruses had high preserved amino acid residues in glycoprotein E that may be potentially covalently modified by catechols and their derivatives. **OBJECTIVE:** This work investigated for the first time amino acid interactions of the glycoprotein E from Zika virus envelope with a catechol derivative, Phenylfluorone, *in silico*, and evaluated the effects of this interaction with the virus in cell cultures. **METHODOLOGY:** The binding sites of phenylfluorone with amino acid residues of glycoprotein E *in silico* were analyzed. The non-toxic concentration of Phenylfluorone in U-251 glioblastoma cells was identified by a cell viability test. We compared the infectivity of the wild virus (not modified with Phenylfluorone) in parallel to the modified virus in Vero cell cultures by viral titration. We investigated the expression of cytokines TNF, IL-8 and IL-10 by U-251 cells by ELISA. **RESULTS:** The results demonstrated that Phenylfluorone interacts more stably with the ectodomain I of glycoprotein E. U-251 glioblastoma cells are resistant to Phenylfluorone at concentrations lesser than 49,9 μM . The virus modified with Phenylfluorone at a concentration of 499 μM showed a viral titer reduction in Vero cells. There was no change in expression of TNF and IL-10 in cells infected with the modified virus. However, the production of IL-8 was greater in cells infected with the modified virus than in non-infected control cells.

Keyword: Zika virus. Cell biology. Phenylfluorone. Molecular interactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagem da estrutura do ZIKAV	24
Figura 2 -	A estrutura da Glicoproteína E do ZIKAV	26
Figura 3 -	Interações da fenilfluorona com a cadeia A da glicoproteína E do ZIKAV	38
Figura 4 -	Visualização do ZIKAV marcado com Fenilfluorona por DOT BLOT	40
Figura 5 -	Citotoxicidade da Fenilfluorona em células humanas de tecido tumoral cerebral (U-251)	41
Figura 6 -	Avaliação da densidade de células Vero após cinco dias de infecção com o ZIKAV selvagem (VS) e modificado (VM)	42
Figura 7 -	Avaliação da produção das citocinas IL-8, TNF e IL-10 em linhagem de células infectadas com ZIKAV	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores da energia de ligação de derivados de catecol	37
Tabela 2 -	Identificação das posições dos aminoácido, e da distância das ligações de ponte de hidrogênio entre a fenilfluorona e a glicoproteína E.	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Asn	aminoácido Asparagina
dH ₂ O	Água destilada
C	Capsídeo
Ca	Número de identificação da substância
CADD	Desenvolvimento de fármacos assistido por computador
C	Concentração
C6	Glioblastoma de rato
CM	Concentração mãe
CO ₂	Dióxido de carbono
DI	Domínio I da Proteína do envelope do vírus Zika
DII	Domínio II da Proteína do envelope do vírus Zika
DIII	Domínio III da Proteína do envelope do vírus Zika
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DENV	Vírus da dengue
DENV1	Vírus da dengue sorotipo 1
DENV2	Vírus da dengue sorotipo 2
DENV3	Vírus da dengue sorotipo 3
DENV4	Vírus da dengue sorotipo 4
DMEM	Meio Modificado por Dubelcco
DMF	Dimetilformamida

DMSO	Dimetilsulfóxido
E	Envelope
Ebind	Energia de interação
Ecomplex	Média da energia potencial do complexo entre catecol e glicoproteína E
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
E _{ligand}	Média da energia potencial dos ligantes isolados
E _{prot}	Média da energia potencial da glicoproteína E
FB	Fluorona Black
FL	Loop de fusão
FSC	Volume celular
GAGs	Glicosaminoglicanos
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl) piperazin-1-il] etanossulfônico
ICS	Instituto da Ciência e da Saúde
IP	Iodeto de propídio
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
Kcal	Quilocaloria
JEV	Vírus da encefalite japonesa
KCl	Cloreto de potássio
Kb	Quilobase - unidade de medida de biologia celular
KDa	QuiloDaltons - unidade de massa atômica

LabNQ	Laboratório de Neuroquímica e Biologia Molecular
LRP	Lipoproteína relacionada ao receptor
MF	Média de intensidade de fluorescência
MOI	Multiplicidade de infecção
MOL	Unidade de massa atômica em gramas
MTT	Brometo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolina
NAbs	Anticorpos neutralizantes
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nm	Nanômetro
NS	Proteína não estrutural
NSCs	Células Tronco Neurais
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Probabilidade de significância
PBS	Tampão salina fosfato
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PFU	Unidade formadora de placa
prM	Proteína precursora de membrana
PTNE	Glicoproteína E

R ²	Coeficiente de determinação
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Granulosidade
TM	Segmento transmembranar
U251	Glioblastoma humano-linhagem U251
UFP	Unidade Formadora de Placa
UV	Ultravioleta
VC	Viabilidade celular
VS	Vírus selvagem
V/V	Volume / volume
WNV	Vírus do oeste do Nilo
YFV	Vírus da febre amarela
ZIKAV	Zika vírus
μL	Micro litro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1	O VÍRUS DA ZIKA	20
1.2	TRANSMISSÃO E SINTOMAS	21
1.3	ZIKA E MICROCEFALIA	22
1.4	A ESTRUTURA DOS FLAVIVÍRUS	24
1.5	A GLICOPROTEÍNA E DOS FLAVIVÍRUS	25
1.6	A FENILFLUORONA COMO AGENTE ANTIVIRAL	26
1.7	NEUROINFLAMAÇÃO EM TECIDOS CEREBRAIS	27
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	28
2.1	OBJETIVOS GERAIS	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	METODOLOGIA	29
3.1	ABORDAGEM IN SILICO PARA IDENTIFICAR OS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DO ANEL CATECÓLICO COM A GLICOPROTEÍNA E	29
3.2	CULTURA CELULAR	30
3.2.1	Meios de cultura e soluções	30
3.2.1.1	Meio de Eagle Modificado por Dubelcco (DMEM)	30
3.2.1.2	Solução de lise	30
3.2.1.3	Solução de congelamento para linhagem de células	30
3.2.1.4	Solução de Tripsina	30
3.2.1.5	Gel de agarose	30
3.2.1.6	Meio semilíquido com gel de agarose	31
3.2.1.7	Solução de Formaldeído	31
3.2.1.8	Preparação da solução com fluorona	31
3.3	CULTURA DE LINHAGEM DE CÉLULAS NERVOSAS CEREBRAIS	31
3.4	TRIPSINIZAÇÃO	31
3.5	CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS	32
3.6	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA FLUORONA SOBRE AS CÉLULAS	32
3.7	PREPARAÇÃO DO VÍRUS	33

3.8	PROCOLO DE DOT BLOT PARA VISUALIZAÇÃO DO VÍRUS MARCADO COM FENILFLUORONA	33
3.9	EXPANSÃO VIRAL	33
3.10	TESTE DE MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO VIRAL (MOI)	34
3.11	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO DO VÍRUS COM O FENILFLUORONA EM CÉLULAS VERO	34
3.12	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE GLIOBLASTOMAS, APÓS INFECÇÃO COM O ZIKAV	35
3.13	ESTATÍSTICA	35
4	RESULTADOS	36
4.1	TRIAGEM VIRTUAL POR ACOPLAMENTO MOLECULAR	36
4.2	REVELAÇÃO DO VÍRUS MARCADO COM FENILFLUORONA	40
4.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DA FENILFLUORONA EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS	41
4.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EFEITO ATENUANTE DA FENILFLUORONA SOBRE O ZIKAV	42
4.5	PERFIL DE EXPRESSÃO IMUNOLÓGICO DE CITOCINAS IL 8, IL-10, TNF E INF	43
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO I	63

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O VÍRUS DA ZIKA

O vírus da Zika (ZIKAV) é um arbovírus que pertence ao gênero *Flavivírus*, família *Flaviviridae* (YUN; LEE, 2017). Os flavivírus são patógenos capazes de gerar altas taxas de morbidade e mortalidade (CHONG *et al.*, 2019), dentre eles encontram-se os vírus: da Dengue (DENV) (BORCHERING *et al.*, 2019), da Febre do Oeste do Nilo (WNV) (MISHRA *et al.*, 2019), da Febre Amarela (YFV), (ABÍLIO *et al.*, 2020; DE THOISY *et al.*, 2020) e Encefalite Japonesa (JEV) (CHEN *et al.*, 2017); alguns destes vírus se tornaram emergentes no mundo todo (CHONG *et al.*, 2019).

O ZIKAV foi isolado pela primeira vez em abril de 1947, a partir do soro de um macaco Rhesus enjaulado na floresta Zika (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). A primeira evidência de infecção humana por este vírus foi relatada na Nigéria, em 1952, quando Smithburn demonstrou a presença de anticorpos neutralizantes em soros de pacientes da África Oriental (SMITHBURN, 1952). Por muito tempo os casos de Zika foram esporádicos, sem registros de grandes prejuízos à saúde dos contaminados (HAYES, 2009; KAMGANG *et al.*, 2020) e limitados aos continentes africano e asiático.

A partir de 2007 os casos de surto da doença começaram a ser relatados em outros continentes. O primeiro, por médicos da Ilha Yap, em um arquipélago dos Estados Federados da Micronésia (DUFFY *et al.*, 2009). A partir de então a doença se espalhou rapidamente pelo mundo. Foram documentados surtos de casos na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014), Haiti (LEDNICKY *et al.*, 2016), Estados Unidos (MCALLISTER *et al.*, 2020), Porto Rico (VALDES *et al.*, 2019), entre outros países.

O vírus pode ter chegado no Brasil através da entrada de atletas e turistas estrangeiros que vieram a eventos esportivos, que antecederam a Copa do Mundo de 2014 (FARIA *et al.*, 2016). Em novembro de 2014, em Pernambuco e Rio Grande do Norte, notou-se um surto de uma doença exantemática com padrão clínico diferente do vírus da dengue (DENV). Contudo, o primeiro caso autóctone de transmissão no país foi notificado apenas em maio de 2015 (CAMPOS *et al.*, 2015).

Em pouco tempo, outros estados nordestinos constataram alta incidência de doenças com os aspectos clínicos muito semelhantes. Nesse período, amostras do soro de pacientes na Bahia foram coletadas e submetidas a extração de RNA para uma região do gene do envelope do ZIKAV, em seguida a infecção nesses pacientes foi confirmada (CAMPOS; BANDEIRA;

SARDI, 2015). Após a primeira detecção na Bahia, depois de surtos na população, mais uma arbovirose endêmica, além de DENV e Chikungunya (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015), começou a circular pelo país; um novo desafio surgiu no Brasil.

A infecção com ZIKAV pode causar graves complicações neurológicas: a síndrome de Guillain-Barré em adultos (ANGELO, *et al.*, 2020; SIMON, *et al.*, 2018) e microcefalia em neonatos (CHIU, *et al.*, 2020). O efeito teratogênico não é documentado em outros flavivírus (FAUCI; MORENS, 2016). Estes dados levaram a comunidade científica a estudar intervenções emergenciais, uma vez que o mecanismo patogênico da doença ainda não é completamente compreendido (AGRELLI *et al.*, 2019).

Diante deste cenário o comitê de emergência em saúde pública da Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a disseminação do ZIKAV é uma emergência de preocupação internacional, chamando atenção para seu controle e, principalmente, para a importância do financiamento em pesquisas e controle de vetores (GULLAND, 2016).

1.2 TRANSMISSÃO E SINTOMAS

O ZIKAV é transmitido majoritariamente pela picada de mosquitos fêmeas infectadas durante o repasto sanguíneo. As principais espécies responsáveis pela disseminação da doença são *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (GUO, *et al.*, 2020). Estudos recentes em diferentes regiões do mundo demonstram que o potencial de propagação do ZIKAV está associado ainda a outros fatores, tais como, o aumento da acessibilidade de viagens aéreas, urbanização, fatores ambientais, condições climáticas, hábitos de vida e perfil imunológico da população. Desta forma, existe um risco potencial de surtos de infecção urbana, desde que o mosquito vetor esteja presente (FARIA *et al.*, 2016; GURUNG *et al.*, 2020; HARRIS; CALDWELL *et al.*, 2019).

O material genético do vírus tem sido identificado em uma diversidade de fluidos corporais: saliva (GURUNG *et al.*, 2020; HUIITS *et al.*, 2020), sêmen (BAGASRA *et al.*, 2017; MUSSO *et al.*, 2017), urina (GOURINAT *et al.*, 2015), fluido amniótico (ALBUQUERQUE *et al.*, 2018), e leite materno (CONZELMANN *et al.*, 2019). O ZIKAV é o único flavivírus que pode ser transmitido através de relações sexuais (HILLS *et al.*, 2016).

Embora um estudo recente forneça evidências de que a transmissão possa ocorrer através da amamentação, fornecendo uma descrição clínica com dados genômicos e virológicos detalhados (BLOHM *et al.*, 2018), esse tipo de transmissão tem sido amplamente discutido, basta verificar alguns estudos que descrevem a inativação do vírus nas condições fisiológicas de armazenamento do leite nas mamas por ação das lipases da fração de gordura do leite

materno (CONZELMANN *et al.*, 2019). Pfaender e colaboradores demonstram que o ZIKAV é inativado no leite materno armazenado em temperaturas em torno de 4 °C (PFAENDER *et al.*, 2017).

Dos indivíduos infectados com o ZIKAV, aproximadamente 20% das pessoas apresentam os sintomas da doença (HABY *et al.*, 2018), sendo os mais comuns: dor de cabeça, febre baixa, dor nas articulações, conjuntivite não purulenta, manchas vermelhas na pele, coceira e vermelhidão, sintomas que muitas vezes podem ser confundidos com os de outras infecções por arbovírus endêmicos, como a Dengue e Chikungunya. (HEUKELBACH; *et al.*, 2016; SARDI *et al.*, 2016).

Normalmente, a evolução é benigna e os sinais desaparecem de forma espontânea entre 1 a 5 dias (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). As manifestações clínicas severas são raras (KAZMI *et al.*, 2020; SAIZ *et al.*, 2016).

Os principais tipos de linhagens do ZIKAV foram identificados a partir de análises filogenéticas e são de origem africana ou asiática (HADDOW *et al.*, 2012). As diferenças intrínsecas na patogenicidade/ virulência das cepas são responsáveis por diferenças nas apresentações clínicas, pois enquanto o fenótipo da cepa asiática favorece a propagação do vírus por induzir menos morte celular, as cepas da linhagem africana causam infecções mais agudas e induzem a morte celular precocemente (SIMONIN *et al.*, 2017).

Coletivamente os dados epidemiológicos e de sequenciamento genético corroboram a hipótese de que as cepas epidêmicas do Brasil surgiram por meio de mutações da linhagem asiática, em eventos que ocorreram no estado de Yap e na Polinésia Francesa (GOODFELLOW *et al.*, 2018). A cepa mais frequente no Brasil demonstrou homologia com a cepa de origem asiática (ZANLUCA *et al.*, 2015), contudo, um recente estudo apresenta evidência de que a circulação de cepas da linhagem africana no país não é recente (KASPRZYKOWSKI *et al.*, 2020).

1.3 ZIKA E A MICROCEFALIA

Muitas investigações têm se dedicado a estudar os efeitos do ZIKAV em células do sistema nervoso, principalmente devido à síndrome de Guillain-Barré (SIMON *et al.*, 2018) e à microcefalia (CAPLIVSKI, 2019; OLSON *et al.*, 2019), ambas são associadas de modo frequente à infecção humana pelo vírus. Das diferentes formas de acometimento do sistema nervoso central pela doença, as consequências mais graves e duradouras estão relacionadas à infecção cerebral do feto no útero (GUTIÉRREZ SÁNCHEZ *et al.*, 2019), o que ocorre muitas

vezes quando a gestante é contaminada no primeiro trimestre da gestação (HARVILLE *et al.*, 2020).

Um importante estudo foi realizado com uma gestante que apresentou quadro febril com erupção cutânea no final do primeiro trimestre de gravidez. A ultrassonografia realizada com 29 semanas de gestação revelou microcefalia. Depois que a mãe solicitou a interrupção da gravidez, uma autópsia fetal foi realizada. Além de microcefalia, observou-se no cérebro: hidrocefalia, calcificações distróficas multifocais, e substância branca subcortical, com deslocamento cortical associado e inflamação cerebral fetal. O exame de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) identificou material genético do ZIKAV no cérebro do feto (MLAKAR *et al.*, 2016). A partir disto, outros estudos mostraram a presença do vírus no tecido cerebral de fetos microcefálicos (SARNO *et al.*, 2016).

O ZIKAV alcança o feto através da placenta e atinge as células do sistema nervoso central em desenvolvimento, gerando lesões graves que comprometem o desenvolvimento neurológico (CHIU *et al.*, 2020; JABRANE-FERRAT; VEAS, 2020). Nestas circunstâncias, algumas crianças infectadas durante a gestação podem nascer sem alterações na circunferência da cabeça, mas posteriormente apresentar complicações como convulsão, atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, além de deficiências auditiva e visual (DE QUENTAL *et al.*, 2019).

A entrada do vírus parece ser mediada pelo receptor AXL, que é altamente expresso em glia radial e células tronco neurais humanas do córtex cerebral de fetos, tornando as células particularmente vulneráveis e susceptíveis a infecção por esse vírus (NOWAKOWSKI *et al.*, 2016; STRANGE *et al.*, 2019).

Embora a doença provoque graves danos neurológicos, infelizmente ainda não há tratamento específico (BERNATCHEZ *et al.*, 2020). Além disso, a rápida disseminação, as diferentes maneiras de transmissão do ZIKAV e a iminência de novos surtos tornam urgente a necessidade de investigar a fisiopatologia da doença. Desta forma, os vírus atenuados com efeitos deletérios reduzidos é uma excelente ferramenta para o estudo e desenvolvimento de terapias medicamentosas, assim como para a fabricação de vacinas, haja visto que podem manter a capacidade de ser reconhecidos pelo sistema imune.

1.4 A ESTRUTURA DOS FLAVIVÍRUS

A estrutura do ZIKAV é comum à dos demais flavivírus: esférica, icosaédrica, com superfície lisa, diâmetro de aproximadamente 500 Å, com núcleo denso de elétrons e cercado por uma bicamada lipídica (KUHN *et al.*, 2002).

Seu genoma é constituído por RNA fita simples (11 Kb de comprimento, aproximadamente) com polaridade sentido positivo e fase aberta de leitura longa e alternada por regiões não codificantes (LINDENBACH; RICE, 2003).

O material genético codifica sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4, NS4B, NS5) e três proteínas estruturais, tais como: proteína do capsídeo (C), proteína precursora de membrana (prM) e glicoproteína E (PTNE) (GÖERTZ *et al.*, 2018); (LINDENBACH; RICE, 2003).

As sete proteínas não estruturais em conjunto coordenam atividades voltadas para replicação, montagem, proteólise e maturação do vírus (LINDENBACH; RICE, 2003). As proteínas estruturais que formam o arcabouço da partícula viral são formadas pela proteína do capsídeo (C), que é responsável por envolver e proteger o material genético, bem como a proteína precursora de membrana (prM), que participa da formação do envelope viral e desempenha um importante papel no dobramento e na manutenção da glicoproteína E, componente fundamental para o reconhecimento e a entrada do vírus nas células do hospedeiro (AKHRAS *et al.*, 2019; DAI *et al.*, 2016).

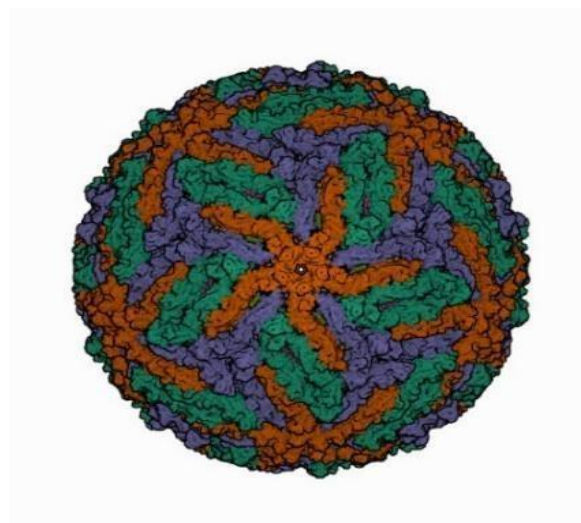


Figura 1 - Imagem da estrutura do ZIKAV. A imagem foi criada usando o MOL* (código PDB 5IRE) A glicoproteína E na superfície da partícula viral está arranjada em estruturas tipo “balsas” demonstradas em vermelho, verde e azul.

Fonte: Elaborado pela autora

1.5 A GLICOPROTEÍNA E DOS FLAVIVÍRUS

A glicoproteína E do envelope de partículas virais é uma estrutura fundamental para a entrada do vírus nas células, portanto, muitas pesquisas têm investigado o papel dessa proteína no planejamento de inibidores de entrada/fusão viral. Toda a superfície externa do ZIKAV é revestida por 180 unidades de glicoproteína E arranjadas em três homodímeros antiparalelos (KOSTYUCHENKO. *et al.*, 2016).

A figura 2 apresenta um monômero da glicoproteína E. Cada monômero possui domínios distintos que desempenham importantes papéis na adsorção do vírus com a membrana celular do hospedeiro (AGRELLI *et al.*, 2019; CARBAUGH; LAZEAR, 2020; GIRALDO *et al.*, 2020)

O ectodomínio I (DI) tem sua função associada com a estabilização e orientação geral da glicoproteína E, encontrando-se localizado entre os domínios EDII e EDIII. O EDII apresenta uma ligação dissulfeto altamente conservada no peptídeo do *loop* de fusão (LF), além de ser um domínio hidrofóbico fundamental na adsorção do vírus com a membrana endocítica da célula durante o ciclo viral (MODIS *et al.*, 2004). O EDIII se alonga verticalmente para fora da superfície da partícula e apresenta locais de reconhecimento e ligação com receptores da célula alvo (CABRAL-MIRANDA *et al.*, 2019), além disso, o EDIII é considerado o principal alvo para neutralização por anticorpos (ZHAO *et al.*, 2016).

O segmento transmembrana do vírus possui duas porções que se ligam entre si por uma alça com domínios catiônicos anfipáticos em forma de hélice, o TM1 e TM2, que ancoram os ectodomínios na membrana do envelope do vírus (ZHANG *et al.*, 2017).

As comparações sequenciais e estruturais da glicoproteína E do ZIKAV com outros flavivírus mostram que partes da proteína E (figura 2), se assemelham muito aos vírus neurovirulentos do Nilo Ocidental e encefalite japonesa, enquanto outros são semelhantes ao vírus da dengue (DENV) (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2016).

A similaridade na sequência de aminoácidos da glicoproteína E dos flavivírus sugere uma conformação necessária nas funções desta proteína, e alterações nestes aminoácidos pode influenciar nas interações com receptores das células do hospedeiro durante a infecção.

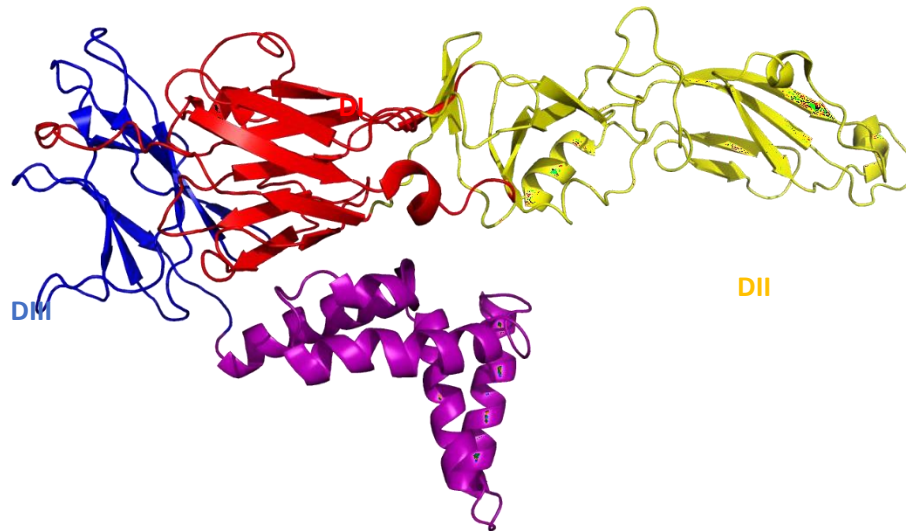


Figura 2 - A estrutura da Glicoproteína E do ZIKAV (código PDB 5IRE) . A imagem foi criada usando o MOL* (código PDB 5IRE) . O domínio DI está representado na cor vermelha, o DII na cor amarela, o DIII na cor azul, e o domínio transmembranar na cor rosa.

Fonte: Elaborado pela autora

1.6 A FENILFLUORONA COMO AGENTE ANTIVIRAL

O desenvolvimento de novas vacinas e medicamentos contra o ZIKAV é desafiador, e vários pontos específicos para as infecções contra ZIKAV aumentam essa dificuldade, tais como, reações cruzadas com outros flavivírus, segurança para gestantes, e eficácia (MASMEJAN *et al.*, 2018). Nesse sentido muitos estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de vírus atenuado e drogas com atividade antiviral contra o ZIKAV.

A 9-fenil-2,3,7-trihidroxifluorona é um derivado de catecol que pertence à classe das fluoronas. A substância pode ser encontrada na literatura com outras nomenclaturas, tais como, fluorona black, fenilfluorona e fluorona (PubChem); estruturalmente formado a partir de um anel triplo e rígido de xanteno que fornece propriedades fluorescentes se submetido a feixe de luz UV em comprimento de onda de 450 nm e observada sua emissão em 553 nm (HEPEL; STOBIECKA, 2018). Devido às suas propriedades químicas e estruturais, numerosos estudos utilizam a substância como corante (HAVLÍKOVÁ *et al.*, 2013).

O catecol mais simples (1,2-dihidroxibenzeno) é um metabólito de hidrocarboneto aromático de benzeno. Suas hidroxilas fenólicas sofrem auto-oxidação, especialmente em pH maior que 9 (MAIER; BERNT; BUTLER, 2018). A rápida oxidação leva à produção de espécies reativas de oxigênio capazes de alterar biomoléculas por estresse oxidativo (BARRETO *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2018). As quinonas reativas resultantes da oxidação dos

catecóis se ligam covalentemente às proteínas. Não há na literatura relatos sobre a modificação desses aminoácidos na glicoproteína E do ZIKAV por fenilfluorona.

Alguns trabalhos demonstraram que compostos derivados de catecol possuem atividade contra uma variedade de vírus (CALLAND *et al.*, 2012; CARNEIRO *et al.*, 2016; FERRAZ *et al.*, 2019; IDE *et al.*, 2016). Os efeitos antivirais dependem da posição e estrutura dos grupos ligados ao esqueleto aromático, mas normalmente inibe a entrada do vírus na célula hospedeira (CARNEIRO *et al.*, 2016).

Derivados de catecol atuam de forma dose-dependente sobre a viabilidade e morte celular, principalmente por apoptose (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). Um trabalho recente demonstrou que compostos fitoquímicos derivados de catecol têm potencial para inibir a proliferação do ZIKAV, entre eles a baicalina, através da interação com a glicoproteína E, assim como a epigalocatequina e a catequina, que exibiram alta energia de interação por ponte de hidrogênio com resíduos de aminoácidos da proteína não estrutural NS3, essencial para a replicação do vírus (SANGEETHA *et al.*, 2020).

Desta forma, vários estudos *in silico* e com diferentes linhagens de células têm sido desenvolvidos para demonstrar que derivados de catecol tem atividade antiviral através da limitação da entrada e replicação do vírus nas células do hospedeiro (CARNEIRO *et al.*, 2016; CALLAND *et al.*, 2012), no entanto, não foi encontrado nenhum estudo com fenilfluorona como agente antiviral.

1.7 NEUROINFLAMAÇÃO EM TECIDOS CEREBRAIS

As respostas inflamatórias que são centralizadas dentro do cérebro e da medula espinhal são geralmente referidas como "neuroinflamatórias" (DISABATO; QUAN; GODBOUT, 2016). A neuroinflamação dentro do sistema nervoso central envolve vários tipos de células que coordenam suas respostas secretando uma infinidade de mediadores inflamatórios. Estes fatores ativam múltiplas cascatas de sinalização para orquestrar resposta inflamatória inicial, assim como para restaurar as lesões subsequentes (MOCKENHAUPT; GONSIEWSKI; KORDULA, 2021).

As células da microglia são as células imunes inatas mais proeminentes no cérebro para ativação da inflamação, no entanto, outros tipos de celulares residentes do sistema nervoso central, incluindo astrócitos e neurônios, participam da resposta inflamatória (LEDUR *et al.*, 2020, VOET *et al.*, 2019).

Após a ativação da neuroinflamação há uma indução da resposta imune inata, para a secreção de citocinas inflamatórias. (VOET *et al.*, 2019). Tem-se relatado que a neuroinflamação causa e acelera doenças neurodegenerativas a longo prazo, desempenhando um papel central no desenvolvimento precoce de doenças crônicas, incluindo demência (LYMAN *et al.*, 2014).

A infecção por ZIKAV causa neuroinflamação aguda e crônica, além da ruptura da barreira hematoencefálica como resultado do aumento da expressão de quimiocinas e interleucinas, que persistem por muito tempo a partir da infecção viral (PANGANIBAN *et al.*, 2020). Estas moléculas desempenham um papel fundamental tanto na regulação do tráfico de linfócitos através da barreira hematoencefálica, quanto na mediação da reparação de tecido neural danificado. Diante disso, investigar se vírus atenuado pode alterar o perfil da expressão de mediadores inflamatórios e provocar lesões neurológicas é de importância central para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas seguras.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Zika é uma doença infecciosa que, nos últimos anos, se disseminou de forma acelerada pelo território brasileiro gerando surtos da doença em todo o país, principalmente no nordeste. A doença tem preocupado as autoridades sanitárias devido a complicações graves, como microcefalia em neonatos e Síndrome de Guillain-Barré em adultos. Com o aumento da incidência de doenças neurológicas promovidas pelo ZIKAV o estudo da patogenia da doença tornou-se uma necessidade urgente, sobretudo pela ausência de medicamentos antivirais e vacinas contra o ZIKA. Diante disto o estudo da interação dos vírus com as células do hospedeiro é de extrema importância. Nesse trabalho testou-se a hipótese de que fenilfluorona interage com o ZIKAV e interfere na sua infectividade.

2.1 OBJETIVO GERAL

Objetiva-se estudar a interação de derivados de catecol com o ZIKAV e seus efeitos na infectividade viral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar por meio de simulações computacionais as interações entre o grupamento químico catecol com a glicoproteína E do envelope do ZIKAV;
- Selecionar o catecol com melhor interação com a glicoproteína E para ser testado *in vitro*. Promover modificação do ZIKAV com o catecol selecionado;
- Identificar a concentração não citotóxica do catecol selecionado em linhagem de células U-251 de glioblastoma humano. Comparar a capacidade do vírus selvagem (não modificado) e do vírus modificado de infectar células Vero;
- Investigar a produção de citocinas da resposta inflamatória em linhagem de células de glioblastoma desafiadas com o ZIKAV selvagem e modificado com Fenilfluorona.

3 METODOLOGIA

3.1 ABORDAGEM *IN SILICO* PARA IDENTIFICAR OS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE CATECÓIS COM A GLICOPROTEÍNA E

Os estudos computacionais empregaram a técnica de acoplamento molecular a fim de investigar as interações entre os derivados de catecol e a glicoproteína E (código PDB: 5IRE, resolução 3,80 Å).

Inicialmente foram desenhados 579 catecois obtidos a partir do banco de dados Europeu da Université de Lorraine, UL (Nancy-Univ), França. Estes derivados foram desenhados no programa Marvin Sketch (CHEMAXOM; MARVINSKETCH, 2013) em 2D e 3D. Em seguida foi realizada uma etapa de minimização de energia através do programa Ghemical (HASSINEN; PERAKYLA, 2001) empregando o campo de força Tripos (LEWIS-ATWELL; TOWNSEND; GRAYSON, 2021). As cargas, hidrogênios polares e tipos de átomos foram adicionadas aos catecois no próprio programa Autodock (Morris et al., 2009) gerando os arquivos do acoplamento.

As moléculas foram filtradas pela regra de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 2001) sendo mantidos 402 compostos e posteriormente, 398 moléculas foram empregadas no AutoDock (Morris et al., 2009). O acoplamento molecular foi realizado no Autodock 4.2 (Morris et al., 2009) na cadeia A da glicoproteína E do ZIKAV (código PDB: 5IRE) aonde estão localizados os domínios I, II e III. Um estudo de protonação foi realizado empregando o programa PROPKA 3.1 (OLSSON *et al.*, 2011) para avaliar a protonação dos resíduos carregados em pH 7.4. Assim, os resíduos de arginina e lisina foram atribuídas cargas +1, os resíduos de histidina foram mantidos neutros enquanto que aos resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico, foram atribuídas cargas -1.

O espaço aonde as interações entre proteína e ligantes foram calculadas foi definido como: X= -165,265, Y=-59.,184, e Z= -129,0 e expandida para 126 pontos em x, y e z. Os parâmetros de busca empregados no algoritmo genético foram: tamanho da população de 150 indivíduos, número de corridas = 200 e número de avaliações do algoritmo genético = 2.500.000.

3.2 CULTURA CELULAR

3.2.1 Meios de cultura e soluções

3.2.1.1 Meio de Eagle Modificado por Dubelcco (DMEM)

(Life Technologies, Grand Island, NY) foi suplementado com L-(+)-glutamina (2 mM), bicarbonato de sódio 44 mM (Sigma® Aldrich, St. Louis, U.S.A); 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies, Grand Island, NY); Soro Fetal Bovino (SFB) 10% (v/v) (Life Technologies, Grand Island, NY).

3.2.1.2 Solução de Lise

Utilizou-se duodecil sulfato de sódio a 200 g/L em dimetilformamida (DMF) a 30% (v/v). O pH da solução foi ajustado para 4,7 com solução ácida (Ácido acético 80% (v/v), HCl 1 M a 2,5% (v/v).

3.2.1.3 Solução de congelamento para linhagem de células

SFB com 10% de dimetilsufóxido (DMSO) filtrado.

3.2.1.4 Solução de Tripsina

Utilizou-se 50 mg de tripsina (**Sigma – U.S.A.**) em pó, 20 mg de ácido etileno diamínico tetracético (EDTA) em 100 mL de PBS. Ajustar o pH para 7,4.

3.2.1.5 Gel de agarose

Agarose em pó diluída em água destilada para uma concentração final de 6% (p/v). O gel foi esterilizado em autoclave.

3.2.1.6 Meio semilíquido com gel de agarose

Para uma quantidade de 10 mL, adicionar 5 mL de gel de agarose a 6% (p/v) com 5 mL de meio DMEM suplementado com SFB.

3.2.1.7 Solução de Formaldeído

Formaldeído diluído em água destilada (dH₂O) para uma concentração final de 27,8% (v/v). Para uma placa de 24 poços, 7 mL de formaldeído em 18 mL de dH₂O, solução não estéril.

3.2.1.8 Preparação da solução com fluorona

10 mg de fluorona foram diluídos em 200 µL de DMSO, homogeneizado e filtrado. 100 µL da solução filtrada foi diluída em 900 µL de meio, caracterizando a solução mãe (SM) com concentração de 16,6 mM. A partir dessa solução, as diluições foram realizadas nas seguintes concentrações **C1**: 2,5 µM; **C2**: 5 µM; **C3**: 7 µM; **C4**: 15 µM; **C5**: 25 µM; **C6**: 50 µM; **C7**: 74 µM; **C8**: 148 µM; **C9**: 250 µM; **C10**: 499 µM.

3.3 CULTURA DE LINHAGEM DE CÉLULAS NERVOSAS CEREBRAIS

Para lançamento, as células U-251 de glioblastoma humano estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em 10 ml de meio, centrifugadas e resuspendidas para serem transferidas para placa de cultura de células com 10 cm de diâmetro e cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, até que todo o tapete de células tenham atingido 80% confluência. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas, o subcultivo foi realizado com intervalo máximo até 10 passagens.

3.4 TRIPSINIZAÇÃO

Nesse procedimento o meio de cultivo é retirado com bomba a vácuo, as células são lavadas 3 vezes com 3 mL de solução PBS e depois é adicionado na placa 3 mL de solução de tripsina. As placas são mantidas com a tripsina por três minutos na estufa com 5% de CO₂, a 37 °C. Após visualizar o descolamento das células do assoalho da placa, através do microscópio invertido, é inserido 3 mL do meio DMEM suplementado para inativar a ação da tripsina. O conteúdo então é transferido para tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a 3.000 RPM por 5 minutos em um raio de 10 cm. O sobrenadante é descartado e o sedimento é ressuspenso em 3 mL do meio de cultura suplementado. Após esta etapa, as células são contadas para obtenção do número de células viáveis no tubo.

3.5 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS

Para contagem de células viáveis depois da tripsinização, foi retirado 10 µL de meio com células e adicionado 10 µL de azul tripan, totalizando 20 µL em microtubo de 500 µL para homogeneização e posterior distribuição de 10 µL desse conteúdo em cada lado da câmara de Neubauer para contagem das células. As células não viáveis são coradas em azul pelo Azul de tripan.

3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA FENILFLUORONA SOBRE AS CÉLULAS

Para avaliar a citotoxicidade da fenilfluorona, as células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de $3,1 \times 10^4$ células/cm² e mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Apenas no primeiro poço da primeira coluna foi colocado meio DMEM, sem células, para ser utilizado como o branco para controle de leitura, todos os outros poços foram semeados com células. Após 48 horas do plaqueamento, o meio foi removido por aspiração. Na primeira coluna, incluindo o branco, foi adicionado meio DMEM, esta coluna foi usada como controle com meio (CM). Na segunda coluna foi adicionado meio com DMSO a 0,05%, essa coluna foi o controle com DMSO (CDMSO). A partir da terceira coluna, as células foram submetidas a concentrações crescentes de fenilfluorona por 72 horas, nas seguintes concentrações **C1**:2,5 µM; **C2**:5 µM; **C3**:7 µM; **C4**:15 µM; **C5**:25 µM; **C6**:50 µM; **C7**: 74 µM; **C8**: 148 µM; **C9**: 250 µM; **C10**: 499 µM. Após o período de exposição, o meio foi substituído por um novo meio de cultivo contendo 20% de 3-[4,5- dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolina (MTT) (5mg/mL em PBS) para determinação da viabilidade celular. Os testes de toxicidade foram realizados em linhagem de células U-251.

As placas foram mantidas por um período de duas horas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. A atividade das desidrogenases mitocondriais reduzem o MTT, de cor amarela, em formazan, de cor purpúrea, de forma proporcional à quantidade de células viáveis, conforme a capacidade de metabolização das células e a concentração de MTT utilizada (MOSMANN, 1983). Ao final do período de incubação de duas horas, foi adicionado em cada poço 100 µL de solução de lise celular. As placas foram mantidas com o tampão de lise celular protegidas da luz por um período de 12 horas, fora da estufa, em temperatura ambiente. A medida de absorbância relativa à concentração de formazan foi feita utilizando-se o comprimento de onda de 580 nm em leitor de microplacas Varioskan Flash Thermo Científico.

3.7 PREPARAÇÃO DO VÍRUS

A cepa de ZIKAV foi gentilmente cedida pelo pesquisador Dr. Ricardo Koury, do Instituto Gonçalo Muniz, Fiocruz, Salvador, Bahia. As amostras foram isoladas a partir de pacientes de Pernambuco. Alíquotas do vírus de 1 mL foram armazenadas em *ultrafreezer* na temperatura de -80 °C.

3.8 PROTOCOLO DE *DOT BLOT* PARA VISUALIZAÇÃO DO VÍRUS MARCADO COM FENILFLUORONA

Equilibrar a membrana, lavando com tampão de transferência uma vez por 10 minutos. Posicionar a fita de nitrocelulose sobre o papel filtro umedecido e fechar bem a armação. Conectar à bomba vácuo e ligar. Pipetar 50 µL da amostra com 499 µM de fenilfluorona nas seguintes condições: (1) ZIKAV em PBS, (2) ZIKAV em fenilfluorona, (3) DMEM com fluoroma. Após a transferência secar a fita na estufa a 37 °C por 15 min. Para a visualização das marcações a membrana foi exposta a luz UV.

3.9 EXPANSÃO VIRAL

Para expandir o vírus, garrafas plásticas para cultivo celular com monocamada de células Vero confluentes foram inoculadas com uma alíquota de 1 mL do vírus diluído em 10 mL de meio DMEM suplementado durante uma hora em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após esse tempo, foi adicionado 20 mL de meio DMEM suplementado. As garrafas foram mantidas em estufa nas mesmas condições mencionadas anteriormente e observadas diariamente entre 5 e 8 dias até obter o efeito citopático caracterizado por descolamento de aproximadamente 80% das células. Depois desse período a garrafa foi retirada da estufa, embalada e colocada no *ultrafreezer* a -80 °C por 30 minutos. As garrafas foram retiradas do *ultrafreezer*, aguardou-se um tempo de 30 minutos em temperatura ambiente para coletar o meio e centrifugar a 2.400 g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubo Falcon de 50 mL e a ele foi adicionado 20% (v/v) de SFB. O sedimento foi desprezado. Os vírus foram então alíquotados em 1 mL e acondicionados em criotubos no *ultrafreezer* a -80 °C .

3.10 TESTE DE MULTIPLICIDADE DE INFECÇÃO VIRAL (MOI)

Utiliza-se o método de ensaio de placas para quantificar a multiplicidade de infecção. Nesse ensaio, placas de 24 poços com monocamada de células Vero confluentes foram lavadas três vezes com 300 μL de PBS. Foi acrescido em cada poço diluições seriadas, em triplicata, dos vírus diluídos até 10^{-7} . As placas foram mantidas por uma hora em estufa a 37 °C com 5 % de CO_2 para adsorção do vírus. Foi então acrescido em cada poço 300 μL de gel de agarose, diluído em meio DMEM em 50% (v/v) para formar uma camada semilíquida que restringe os focos de infecção às células adjacentes. As placas foram acompanhadas por 5 dias. No quinto dia foi adicionado solução de formaldeído sobre o gel. A placa foi mantida por 30 minutos em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 . Após esse tempo foi adicionado *Naphtol blue* para contagem de unidades de placas formadas (PFU) em cada poço. A unidade de medida da mutiplicidade de infecção viral (MOI) é expressa em PFU e avaliada qualitativamente de acordo com a intensidade do corante .

3.11 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO DO VÍRUS COM A FENILFLUORONA EM CÉLULAS VERO

A partir de alíquota de vírus foi extraído 100 μL para ser diluído em microtubos contendo previamente 900 μL de meio DMEM. Esta amostra foi utilizada como controle de vírus selvagem (VS). Da mesma alíquota foi extraído 100 μL para ser diluído em 900 μL de meio com fenilfluorona na concentração de 499 μM e promover interação da substância com a glicoproteína E para modificação da partícula viral. Os microtubos com as amostras foram mantidos por uma hora em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, realizou-se diluição seriada de cada amostra, utilizando fator 10 até a diluição de 10^{-7} . Foi adicionado 200 μL de cada diluição nos poços com células confluentes, em triplicata. As placas foram mantidas na estufa a 37 °C com 5% de CO_2 por uma hora. Após esse período foi adicionada solução de gel de agarose. As células foram acompanhadas por 5 dias para avaliar a capacidade de infecção através do teste de MOI.

3.12 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE GLIOBLASTOMAS, APÓS INFECÇÃO COM O ZIKAV.

Utilizando as amostras de sobrenadante das culturas de linhagem de glioblastoma U-251 infectados com o ZIKAV selvagem e modificado com fenilfluorona por 72 horas, foram

quantificadas as citocinas TNF, IL-8 e IL-10 através da técnica imunoenzimática (ELISA), utilizando reagentes comercialmente disponíveis (BD OpTEIA, San Diego, CA). Uma curva padrão foi utilizada para expressar os resultados em pg/ml.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados obtidos em cada experimento foram submetidos às análises estatísticas, sendo expressos como média e erro médio padrão, ou mediana e variação. A escolha da medida de tendência central e das medidas de dispersão foi feita de acordo com a distribuição dos dados. Para comparação entre dois grupos com distribuição normal foi utilizado o teste *t* de Student não pareado e o teste de Mann-Whitney foi usado para amostras com distribuição não normal. Em dados com distribuição normal, o teste paramétrico mais usado para analisar as comparações múltiplas com apenas um parâmetro variável foi o *One-Way* ANOVA, seguido do teste de Dunnett. Nos resultados com dados não paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (seguido do teste de Dunn's) para comparações múltiplas. O intervalo de confiança do teste foi definido por 95% de significância estatística ($p < 0,05$).

Para definir a mínima concentração citotóxica foram realizados cálculos de regressão não linear, utilizando equações de regressão não linear para inibição dose resposta fornecida pela biblioteca do software GraphPad Prism, considerando o coeficiente de determinação $R^2 > 0,8$. As análises foram realizadas em software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EUA).

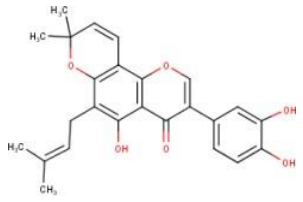
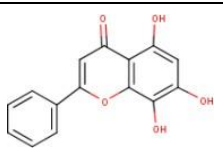
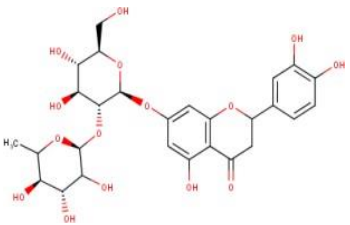
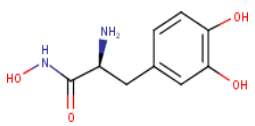
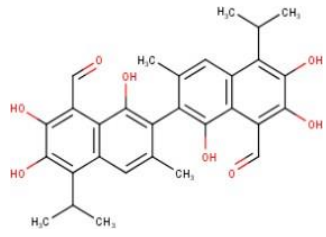
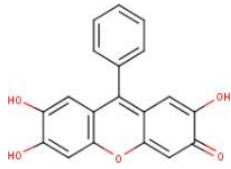
4 RESULTADOS

4.1 TRIAGEM VIRTUAL POR ACOPLAMENTO MOLECULAR

A partir dos resultados das interações computacionais entre derivados de catecol e a glicoproteína E, empregando o programa Autodock 4.2, foi selecionada a molécula mais promissora para se ligar e modificar a glicoproteína E do ZIKAV, *in vitro*. Todos os 273 derivados de catecol foram ranqueados de acordo com o menor valor de energia de interação frente à glicoproteína E, e na Tabela 1 encontram-se os seis catecóis que apresentaram melhores valores de energia de interação. Os valores mais negativos indicam maior afinidade da fenilfluorona pelo sítio de ligação e conseqüentemente ocupam as primeiras posições do *ranking*.

Entre as moléculas ligantes mais promissoras para interagir com a glicoproteína E do ZIKAV está a 9-fenil-2,3,7-trihidroxi-6-fluorona (fenilfluorona) com energia de ligação – 8,84 Kcal/mol. Entre as seis moléculas a fenilfluorona foi a mais disponível para ser adquirida comercialmente. Desta forma, para o desenvolvimento deste estudo foi utilizada a fenilfluorona com o objetivo de modificar a glicoproteína E do ZIKAV nos ensaios, *in vitro*

Tabela 1 – Derivados de catecóis com as seis melhores energia de interação.

Nome	Estrutura em 2D	Energia de Interação (Kcal/mol)
Pomiferina		-9.82
5,7,8-Trihidroxiflavona		-9.18
Eriodictiol-7-neohesperidosídeo		-9.05
L-β-3,4-Dihidroxifenilalanina hidroxâmica		-9.02
Gossipol		-8.91
9-Fenil-2,3,7-trihidroxi-6-fluorona		-8.84

Nesta tabela encontram-se os derivados de catecol que possuem os seis melhores valores de energia de interação, ou seja, os mais negativos. Entre as moléculas ligantes mais promissoras para interagir com a glicoproteína E do ZIKAV está a 9-fenil-2,3,7-trihidroxi-6-fluorona (fenilfluorona) com energia de ligação – 8,84 Kcal/mol. Entre as seis moléculas a fenilfluorona foi a mais disponível para ser adquirida comercialmente. Desta forma, para o desenvolvimento deste estudo foi utilizada a fenilfluorona com o objetivo de modificar a glicoproteína E do ZIKAV nos ensaios, *in vitro*.

Fonte: Elaborado pela autora

Após a triagem dos derivados de catecol analisados (anexo I), 75 catecóis apresentaram energia de ligação menor que -8 Kcal/mol, 190 catecóis apresentaram energia de ligação entre -5 e -8 Kcal/mol, e 8 catecóis apresentaram energia de ligação maior que -5 Kcal/mol. Estes resultados demonstram que derivados de catecol são moléculas potencialmente úteis para modificar a estrutura da glicoproteína E do vírus da Zika e possivelmente de outros Flavivírus.

Após selecionar a fenilfluorona como a droga mais promissora e disponível para modificar o vírus, *in vitro*, buscou-se investigar os tipos de interações que a fenilfluorona poderia realizar com a glicoproteína E. Na figura 3 é possível visualizar os tipos de interações proteína-ligante. Nesta imagem a fenilfluorona está no centro interagindo com resíduos de: valina (143 e 364), serina (146), glutamina (147), asparagina (163), fenilalanina (183), tirosina (305) e serina (306), na cadeia peptídica da glicoproteína E através de interações hidrofóbicas e de pontes de hidrogênio.

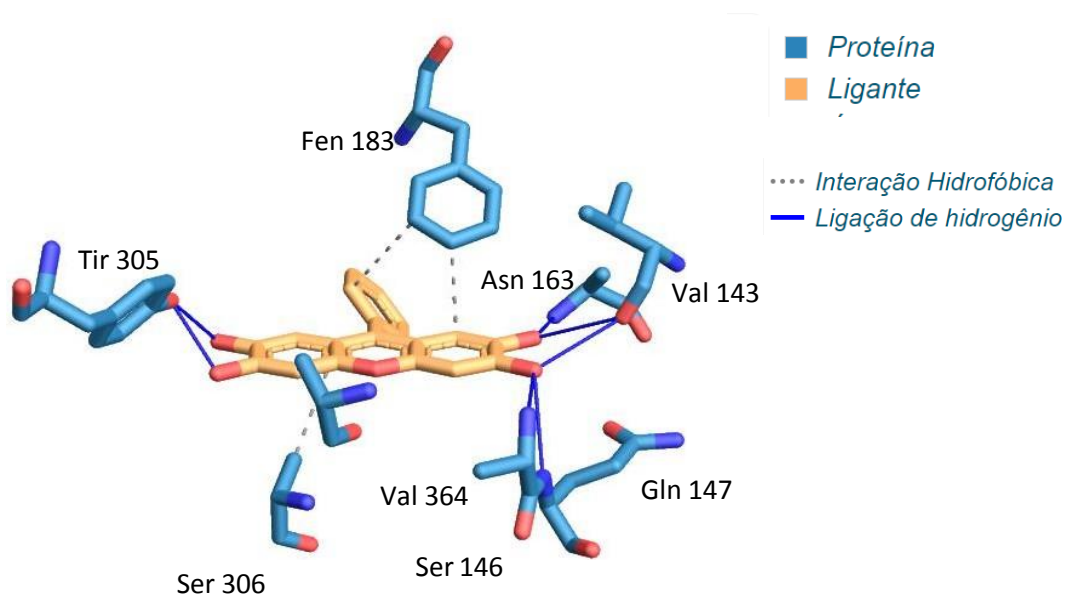


Figura 3 - Interações da fenilfluorona com a glicoproteína E do ZIKAV. Os resíduos de aminoácidos da glicoproteína E estão representados em bastões azuis (código PDB: 5IRE). Os resíduos de aminoácidos valina (143), glutamina (147), serina (146), e asparagina (163), e tirosina (305) estão interagindo com a glicoproteína E por ponte de hidrogênio. Os resíduos de fenilalanina (183) e serina (306) estão realizando interações hidrofóbicas. As interações hidrofóbicas estão representadas pela linha tracejada e as pontes de hidrogênio por linhas azuis.

Fonte: A imagem foi gerada pelo software do PLIP (PLIP - About (tu-dresden.de)).

Com a geração das imagens gráficas interativas de alta resolução foi possível analisar de forma detalhada os aminoácidos da glicoproteína E que interagiram com a fenilfluorona. Através destas análises foi possível identificar a posição dos aminoácidos que interagiram com a fenilfluorona na cadeia polipeptídica. As interações hidrofóbicas foram localizadas na fenilalanina (183) e serina (306) .

Neste mesmo programa foi gerado uma tabela com todas as possíveis interações do tipo ponte de hidrogênio proteína-ligante. Observou-se que as melhores ligações de ponte de hidrogênio ocorreram em 5 resíduos de aminoácidos da glicoproteína E (Tabela 2), entre eles: a valina (143), a serina (146), a glutamina (147), a asparagina (163) a tirosina (305), sendo a tirosina (305) um aminoácido altamente preservado entre flavivírus neurotróficos. Assim também a fenilfluorona reagiu próximo à cisteína (308) e à prolina (363), também altamente preservadas.

Tabela 2 - Identificação das posições, dos aminoácidos, e da distância das ligações de ponte de hidrogênio entre a fenilfluorona e a glicoproteína E. Estes dados foram obtidos pelo programa PLIO (Perfil de Interação Proteína-Ligante) .

Átomo do doador	Átomo do acceptor	Proteína doadora	Resíduo de aminoácido	Distância D-A	Ângulo do doador	Posição na cadeia
3851	1154[O2]	não	VALINA	2,37	161,1	143A
3847	1154[O2]	não	VALINA	3,44	155,56	143A
1176	3851[O3]	sim	SERINA	2,69	153,31	146A
1182	3851[O3]	sim	GLUTAMINA	3,38	158,85	147A
1300	3847[O3]	sim	ASPARAGINA	2,88	165,18	163A
3849	2403[O3]	sim	TIROSINA	2,83	129,58	305A
3845	2403[O3]	sim	TIROSINA	2,75	126,68	305A

Fonte: Elaborado pela autora

Nesse sentido, observa-se que as melhores interações ocorreram predominantemente no ectodomínio I da glicoproteína E. Este é um domínio importante para a manutenção da conformação molecular da Glicoproteína E. Assim como a fenilfluorona pode se associar na região que torna o vírus neurotrófico localizado no *loop* de fusão através da serina (146) e glutamina (147) (Tabela 2).

4.2 REVELAÇÃO DO ZIKAV MARCADO COM FENILFLUORONA

A interação da droga com as partículas virais presumivelmente acontece devido a transformação do anel catecólico da estrutura química da droga em semiquinonas por auto-oxidação, que por sua vez interage por ligação covalente com as glicoproteínas do vírus. Na figura 4 é possível observar a fenilfluorona associada com proteínas das partículas virais aderidas na membrana de nitrocelulose.

Na imagem da Figura 4A é possível identificar a coluna 1 como o controle negativo, onde não houve marcação, pois o vírus foi diluído em PBS na ausência de fenilfluorona. Na coluna 2 pode-se observar uma marcação intensa, demonstrando que a fenilfluorona se ligou com proteínas das partículas virais, colorindo-as em rosa. Na coluna 3 é possível visualizar marcação com menor intensidade que na coluna 2, haja vista que a fenilfluorona pode ter se ligado a proteínas do meio.

Na Figura 4B, também foi possível observar que na coluna 1 não houve fluorescência devido a ausência de proteínas virais associadas a fenilfluorona. Na coluna 2 houve marcação por fluorescência, claramente observada em razão da associação da fenilfluorona com as partículas virais. Enquanto na coluna 3, observa-se fluorescência, no entanto mais discreta, possivelmente pela ligação inespecífica da fenilfluorona com proteínas do meio.

Revelação do Dot Blot por coloração

Revelação do Dot Blot por fluorescência

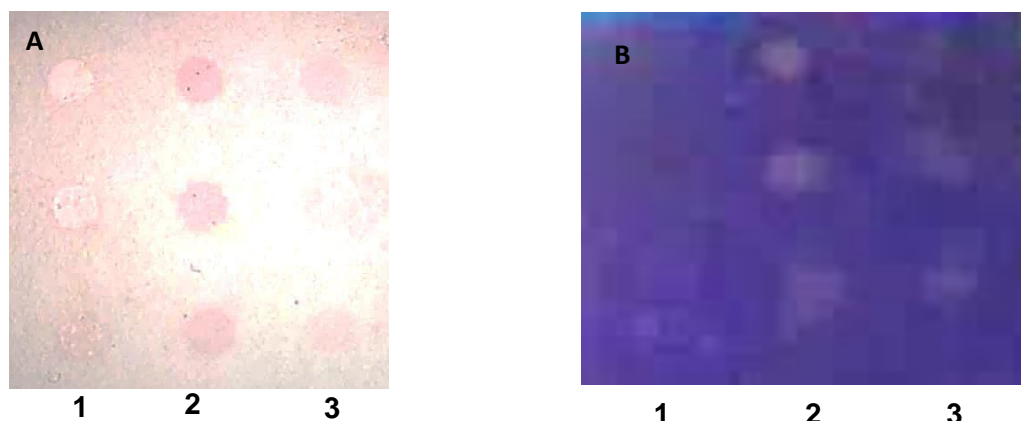


Figura 4 - Visualização do ZIKAV marcado com Fenilfluorona por DOT BLOT. ZIKAV em membrana de nitrocelulose nas três condições em triplicata. (1) ZIKAV em PBS, (2) ZIKAV com fluorona, (3) meio e fluorona. A figura 4A apresenta as marcações pela cor da droga associada a proteínas, e a figura 4B apresenta fluorescência pela presença da fenilfluorona após iluminação por lâmpada UV .

Fonte: Elaborado pela autora

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA FENILFLUORONA EM LINHAGEM DE CÉLULAS HUMANAS

Com o objetivo de obter as concentrações de fenilfluorona que possam ser utilizadas nas análises *in vitro* durante a infecção das células com o ZIKAV modificado com a droga, foi realizada uma curva de concentração-resposta com diferentes concentrações da substância.

Neste ensaio foi utilizada uma linhagem de células humanas de tecido tumoral cerebral (U-251). As análises de todas as três triplicatas foram realizadas de forma independente após tratamento por 72 horas com a fenilfluorona em diferentes concentrações crescentes. A mediana da mínima concentração citotóxica foi de 49,9 μM (variação: 14,8 μM - 74,0 μM , n = 9; Figura 5A).

Diante deste resultado foi estabelecido que as concentrações da fenilfluorona superiores a 49,9 μM apresentam toxicidade, assim como, este valor apresentou uma maior diferença estatística em comparação com as células não tratadas com a fenilfluorona ($p < 0,01$, Figura 5B). A partir deste resultado, foi padronizado que a concentração ideal para as demais investigações seriam abaixo de 49,9 μM .

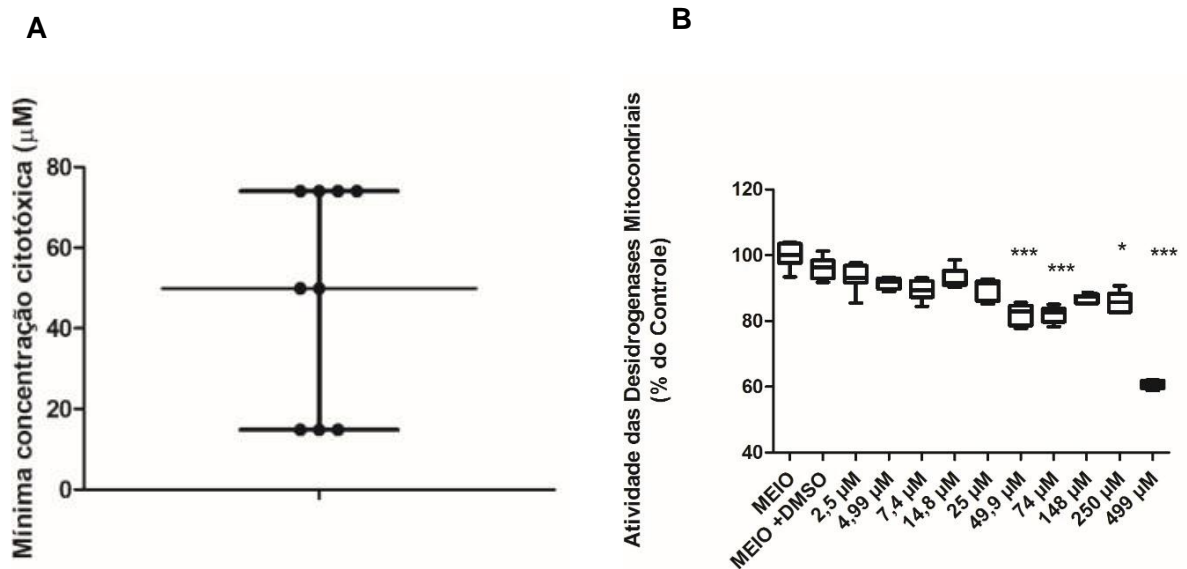


Figura 5 - Citotoxicidade da Fenilfluorona em células humanas de tecido tumoral cerebral (U-251). A Figura 5A apresenta as concentrações dos nove ensaios realizados para identificar a menor concentração citotóxica da fenilfluorona em células humanas. Estes testes foram realizados em três triplicatas independentes (n = 9) e observou-se uma mediana da menor concentração citotóxica de 49,9 μM (Variação: 14,8 μM - 74,0 μM). A figura 5B apresenta um dos nove experimentos, o mais representativo, o qual demonstra a mediana da menor concentração citotóxica em comparação com os controles. Os resultados estão apresentados em mediana e todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico Kruskal- Wallis seguido do pós teste de Dunn. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaborado pela autora

4.4 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO ATENUANTE DA FENILFLUORONA SOBRE O ZIKAV

Após estabelecer a concentração ideal da fenilfluorona que apresentou menor efeito citotóxico em células humanas, o ZIKAV foi tratado com a fenilfluorona para avaliar se havia diferença na capacidade citolítica em comparação ao vírus selvagem. As células Vero não são de origem humana mas são comumente usadas em pesquisa para monitoramento do efeito citopático do ZIKAV (MÜLLER; HARMS; SCHUBERT; MAYER *et al.*, 2017).

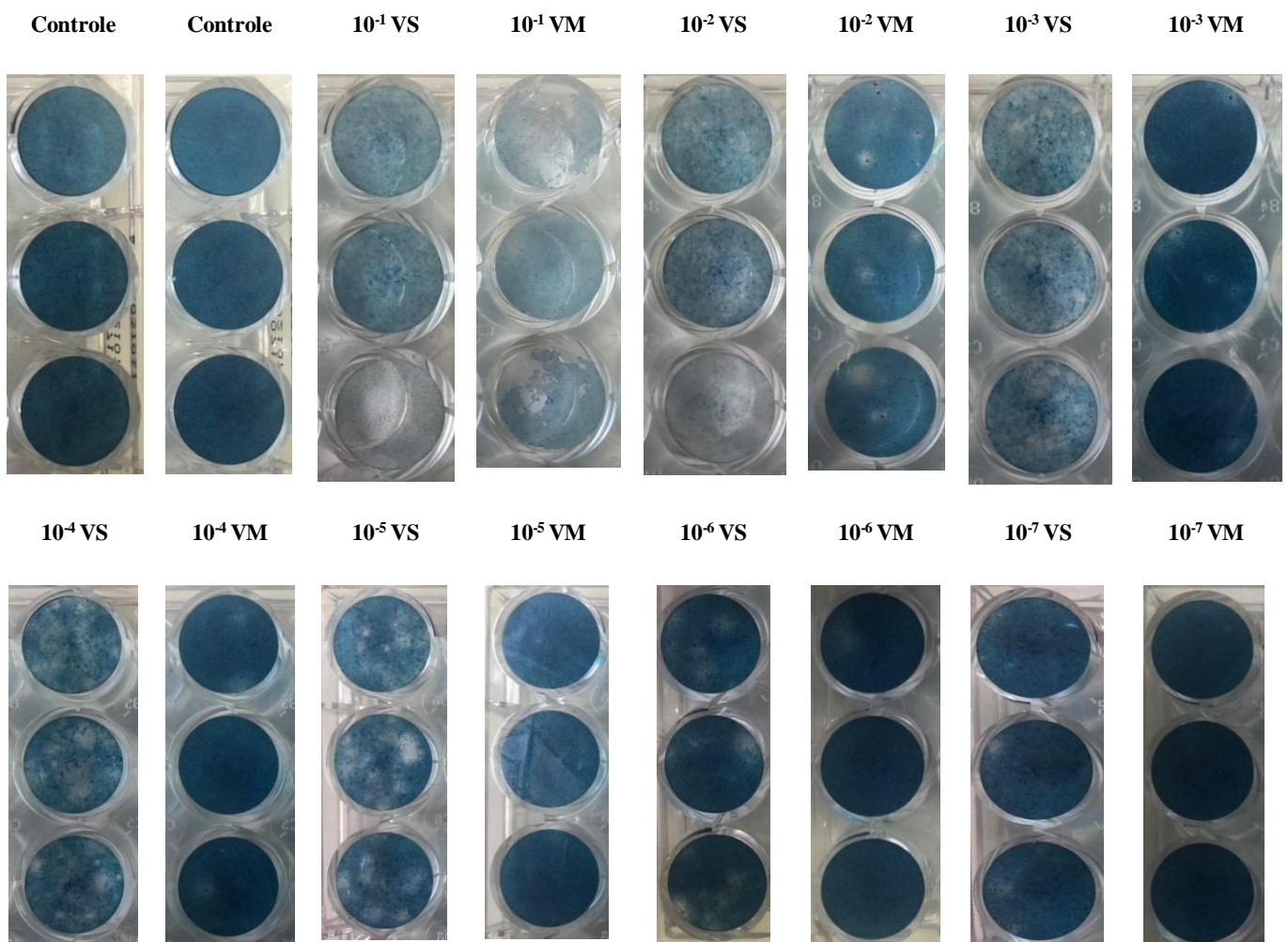


Figura 6 - Avaliação da densidade de células Vero após cinco dias de infecção com o ZIKAV selvagem (VS) e modificado (VM). Inicialmente, o vírus foi modificado com fenilfluorona em uma concentração de 499 μM e diluído para alcançar a concentração da droga não citotóxica para as células, obtida no ensaio anterior. A partir da concentração de 0,5 μM de fenilfluorona, o vírus foi submetido a diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-7} , em meio de cultura, para então infectar as células. Após o período de incubação de 72 horas as células do poço foram coradas com *naftol blue* para avaliar densidade celular. As regiões mais claras e esbranquiçadas demonstram efeito citolítico pela ausência de células. O experimento foi realizado em três triplicatas independentes.

Fonte: Elaborado pela autora

Para a modificação das partículas virais foram utilizadas concentrações da fenilfluorona de 499 μM , antes de iniciar os testes de infecção com as células Vero, *in vitro*. Após esta etapa, o vírus tratado foi diluído até que a fenilfluorona estivesse em uma concentração menor que 0,5 μM , para garantir que a droga não mataria as células.

Pôde-se observar notoriamente na figura 6 que os poços infectados com o ZIKAV atenuado com a fenilfluorona apresentaram uma maior concentração de células viáveis, o que demonstra de forma satisfatória que o vírus foi atenuado e possui menor efeito citolítico a partir de um MOI de 8.10^{-6} , principalmente entre as concentrações relacionadas à diluição do vírus 10^{-2} e 10^{-4} (Figura 6). Já nas culturas de células infectadas com o ZIKAV selvagem, houve um maior número das unidades formadoras de placas, nas mesmas diluições. Este dado configura que o ZIKAV não modificado (selvagem) possui maior efeito citolítico em células Vero, *in vitro*.

4.5 PERFIL DE EXPRESSÃO IMUNOLÓGICO DE CITOCINAS IL 8, IL-10 e TNF.

Após identificar o efeito da fenilfluorona na atenuação do ZIKAV, buscou-se investigar se as células U-251 infectadas com o vírus atenuado apresentam um perfil de produção das citocinas IL-8, TNF e IL-10 diferente das células infectadas com o vírus selvagem por 72 horas (figura 7).

Pode-se observar que não houve diferença entre os grupos na produção de IL-8 entre as células infectadas com o vírus selvagem e os grupos controles tratados apenas com meio e DMSO ou com fenilfluorona, sugerindo que o vírus selvagem não altera a resposta inflamatória pelo ZIKAV. Contudo, a produção de IL-8 foi significativamente maior nas células tratadas com o vírus modificado em comparação com os controles negativos (Figura 7A). A produção das citocinas TNF (Figura 7B) e IL-10 (Figura 7C), não apresentou diferenças entre as culturas expostas a estas citocinas. Entretanto, faz-se necessário maiores investigações sobre a resposta imune gerada após a atenuação viral.

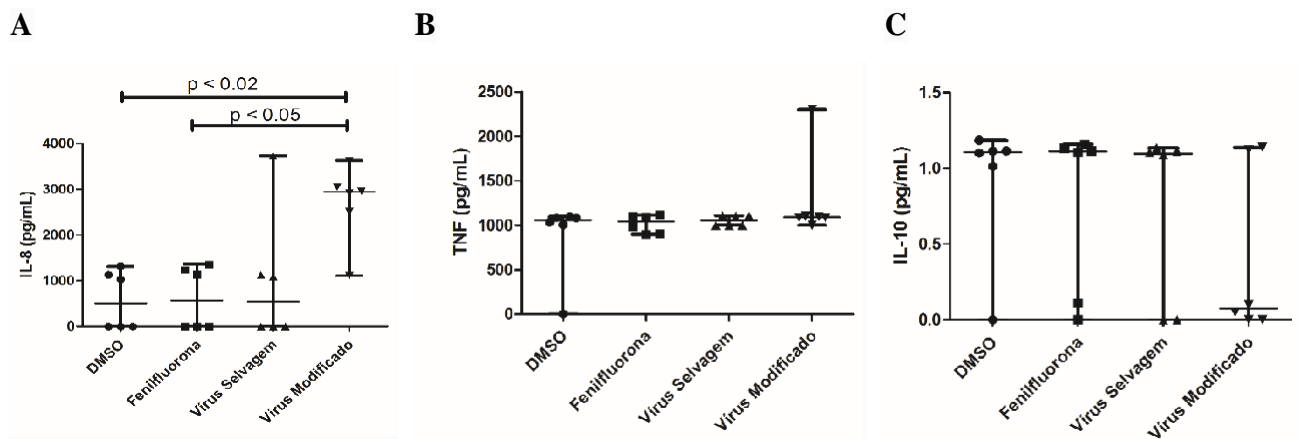


Figura 7 - Avaliação da produção das citocinas IL-8, TNF e IL-10 em linhagem de células infectadas com ZIKAV. A expressão das citocinas IL-8 (A), TNF (B) e IL-10 (C) foi avaliada pela técnica de ELISA com o sobrenadante de amostras de linhagens de células de glioblastomas U-251 infectadas com o ZIKAV por 72 horas em quatro condições (meio com DMSO a 0,5%); meio com fenilfluorona na concentração de 0,5 μ M; ZIKAV selvagem; ZIKAV modificado com fenilfluorona). Todos os resultados apresentados em medianas e variações. Todos os valores de p foram obtidos através do teste estatístico de Mann Whitney .

Fonte: Elaborado pela autora

5 DISCUSSÃO

Estudos bioquímicos têm revelado que a modificação de proteínas estruturais de superfície das partículas virais envolvidas nas interações entre o vírus e receptores celulares tem efeito atenuante na infecção pelo ZIKAV (FAN *et al.*, 2015; QADIR *et al.*, 2018). Tais estudos relatam que patógenos inativados, ou atenuados, com detergentes, calor ou radiação são bons candidatos a vacinas (BASAK *et al.*, 2019).

Um importante alvo terapêutico é a glicoproteína E, uma proteína estrutural que reveste completamente o envelope das partículas virais, e que possui importantes regiões com propriedades fusogênicas para a entrada do vírus nas células do hospedeiro (AGRELLI *et al.*, 2004). Aqui, testou-se a hipótese de que a modificação química da glicoproteína E do ZIKAV, com um derivado de catecol, a fenilfluorona, afetaria significativamente sua infectividade e nos permitiria investigar importantes resíduos de aminoácidos na estrutura da partícula viral, os quais estariam envolvidos na entrada do vírus nas células. Neste trabalho a fenilfluorona demonstrou ter boa energia de ligação com alguns aminoácidos altamente preservados, e em sítios próximos a estes resíduos.

Destes, a tirosina (305) do ZIKAV apresentou boa energia de ligação com a fenilfluorona (tabela 1). Além disso, este resíduo está próximo à cisteína (308), outro aminoácido altamente preservado entre flavivírus (KOSTYUCHENKO *et al.*, 2016). Assim também, a valina (364) interagiu com a fenilfluorona, e está próxima à prolina (163) altamente preservada entre flavivírus. Desta forma, a fenilfluorona demonstrou potencial para se ligar a sítios altamente preservados da glicoproteína E de flavivírus, e reforça a hipótese de que catecóis são promissores para modificar regiões altamente preservadas da glicoproteína E do ZIKAV e atenuar a infecção com vírus modificado.

Muitos corantes derivados de catecol, como a fenilfluorona, pertencem à classe dos corantes xantenos, estruturalmente baseados em um anel triplo que fornece propriedades pronunciadas de fluorescência. Interações supramoleculares entre corantes xantenos e biomoléculas podem ser utilizadas como sondas para métodos espectroscópicos e eletroquímicos (HEPEL; STOBIECKA, 2018). Não foi encontrada na literatura uma única droga que comprovadamente atenua e marca o ZIKAV. Neste estudo demonstrou-se que a fenilfluorona além de modificar e atenuar o ZIKAV, possui efeito colorimétrico (figura 4A), assim como mantém sua atividade fluorescente quando submetida a luz UV (figura 4B); desta forma pode ser utilizada em pesquisas como marcador ou sonda para o ZIKAV.

O uso de metodologias virtuais de rastreamento de drogas na atualidade tem sido muito promissoras para o desenvolvimento de fármacos (BYLER; OGUNGBE; SETZER, 2016; CHELLASAMY; DEVARAJAN, 2019). Estas metodologias têm a vantagem de fornecer resultados preliminares, mais rápidos, e de não utilizar animais para experimentos nas etapas iniciais da pesquisa. Trata-se de uma metodologia utilizada como uma forma de triagem para obtenção de moléculas com potencial para tratamento farmacológico, no entanto, limitando os resultados a uma predição.

Através de metodologias virtuais *in silico*, um estudo recente analisou, a atividade de 5550 fitoquímicos contra a glicoproteína E do ZIKAV. Entre eles, derivados de catecol apresentaram alto potencial como drogas promissoras com atividade anti-viral, tais como, a baicaleína, catequina, ácido elágico, epigallocatequina entre outros (SANGEETHA *et al.*, 2020b). Os resultados apresentados aqui corroboram com este trabalho, haja vista que através da técnica de acoplamento molecular identificou-se que 273 derivados de catecol possuem capacidade para interagir com a glicoproteína E com baixa energia de ligação (anexo I).

Neste estudo, entre as moléculas mais promissoras, acessíveis e disponíveis comercialmente para promover modificação do vírus nos ensaios *in vitro*, selecionou-se a fenilfluorona, que possui diferença menor que 1 kcal/mol (anexo I) e está entre as melhores posições no *ranking*. Diferente de Sangeetha e colaboradores (SANGEETHA *et al.*, 2020a) que utilizou o DIII como alvo, neste trabalho, o DI da glicoproteína E do ZIKAV foi a principal região de interação com a fenilfluorona. O domínio I é fundamental para a manutenção da conformação geral das partículas virais, e alterações neste sítio pode reduzir a infectividade do ZIKAV.

Devido às consequências neurológicas graves desencadeadas pelo tropismo do ZIKAV por células do sistema nervoso central, diversos trabalhos têm utilizado linhagem de células nervosas imortalizadas para investigar a infecção pelo ZIKAV em tecidos neurais. Além disso, células imortalizadas de glioblastomas são comumente empregadas como modelo experimental para o estudo de danos em células da glia.

As células gliais são especializadas em múltiplas funções homeostáticas para a sobrevivência celular, e possuem importantes propriedades neuroprotetoras (BECERRA-CALIXTO; CARDONA-GÓMEZ, 2017; TORSVIK *et al.*, 2014). Diante disto foi fundamental identificar a concentração não citotóxica de fenilfluorona para células gliais, que pudesse ser utilizada sem causar lesão celular. Para isso utilizou-se linhagem de glioblastoma humano U-251 no intuito de observar a preservação das células durante a exposição ao vírus modificado com fenilfluorona.

São encontradas uma ampla variação das concentrações citotóxicas de diferentes tipos de catecol em células U-251 de glioblastoma, como descrito em um estudo com o ácido gálico, que demonstrou concentrações citotóxicas maiores que 100 μM (JING *et al.*, 2021), assim como no estudo de Wang e colaboradores que investigou a concentração citotóxica de ácido elágico em uma variação entre 25 μM e 200 μM em 24, 48 e 72 horas com redução significativa da viabilidade celular (WANG *et al.*, 2016).

A citotoxicidade celular pode ser causada por eventos como estresse oxidativo, ativação de caspases, e peroxidação lipídica em membranas celulares (COMPORTI, 1989; KHORCHID *et al.*, 2002; YAMAGUCHI *et al.*, 2002). Estes mecanismos podem estar envolvidos no efeito citotóxico da fenilfluorona, que em nossos ensaios demonstrou ser tóxica nas concentrações que variam entre 14,8 μM e 74,0 μM , com mediana de 49,9 μM após 72 horas de incubação com células de linhagem humana de glioblastoma U-251. Ao final deste ensaio foi possível identificar a partir de qual concentração as células poderiam ser expostas à droga, sem interferir na viabilidade celular.

Na literatura tem sido relatado que células Vero são muito susceptíveis a infecção por vírus e, portanto, são comumente utilizadas como um excelente modelo de linhagem celular para testes de infecção viral (SRIVASTAVA *et al.*, 2020). Neste estudo, foi observado uma alta susceptibilidade das células Vero ao ZIKAV, no entanto, houve diferença do efeito citolítico do vírus modificado comparado ao vírus selvagem. Esta diferença foi observada de forma qualitativa uma vez que pôde-se observar que as células infectadas com vírus modificado com a fenilfluorona apresentaram maior intensidade na coloração azul, do *naftol blue*, e menor número de unidades formadoras de placas (PFU), a partir de um MOI de $8 \cdot 10^{-6}$ (Figura 6), quando comparado com as células infectadas com o vírus selvagem. Estes dados demonstram maior sobrevivência das células expostas ao vírus modificado.

Alguns trabalhos relatam que anticorpos neutralizantes são capazes de inibir a infecção do ZIKAV associando-se com domínios específicos da glicoproteína E, como o domínio III (GALLICHOTTE *et al.*, 2019; HASAN *et al.*, 2017). Neste trabalho, a ação do vírus em células Vero foi atenuada utilizando a fenilfluorona como molécula neutralizante. De acordo com as análises *in silico*, a fenilfluorona possuiu maior afinidade para interagir com o domínio I da glicoproteína E do ZIKAV, uma região fundamental para a manutenção da viabilidade das partículas virais. No entanto, uma vez que a fenilfluorona não é uma droga altamente seletiva, ela pode interagir com os ectodomínios DII e DIII, bem como com outras porções da glicoproteína E, e desta forma, intensificar ainda mais a modificação e atenuação do ZIKAV.

Isto pode apresentar uma vantagem com relação à utilização de anticorpos neutralizantes que possuem alta especificidade.

De acordo com os resultados das análises *in silico* adquiridos neste estudo, foi possível inferir que a fenilfluorona possui capacidade para reagir com a glicoproteína E de superfície das partículas virais. Desta forma, a redução da infecção do ZIKAV modificado com fenilfluorona observadas neste trabalho (Figura 6), pode ser justificada pela ação direta da fenilfluorona sobre as proteínas estruturais do envelope do ZIKAV e bloqueio de sua ligação com receptores da célula-alvo, indicando uma expressiva ação deste composto contra o ZIKAV.

Alguns derivados de catecol já foram testados contra ZIKAV, entre eles a epigallocatequina galato, que apresenta efeito antiviral em estudos de ligante-receptor com a glicoproteína E, e demonstra ser capaz de inibir a entrada do ZIKAV em pelo menos 90% em concentrações mais elevadas que 100 μ M (CARNEIRO *et al.*, 2016). Nessa perspectiva, o estudo de Sharma e colaboradores utilizou esta mesma molécula na atenuação da ação do vírus em células Vero (SHARMA *et al.*, 2017). Desta forma, os nossos estudos com a fenilfluorona contribuíram com uma nova possibilidade da utilização de moléculas derivadas de catecol como uma droga atenuadora do ZIKAV.

Diante do fato de que o Sistema Nervoso Central desencadeia reação inflamatória em resposta a infecção pelo ZIKAV (LIMA *et al.*, 2019; BOBERMIN *et al.*, 2020), e por se tratar de um vírus altamente neurotrópico, avaliou-se a resposta imunológica de células do Sistema Nervoso Central na presença do ZIKAV atenuado com fenilfluorona.

Sabe-se que o aumento súbito de mediadores químicos inflamatórios promove morte celular precoce (RAYCHAUDHURI; VOGELBAUM, 2011), assim, considerando o papel central da neuroinflamação em distúrbios neurológicos, procurou-se compreender o perfil de expressão de interleucinas em células nervosas infectadas pelo ZIKAV, a fim de compreender possíveis estratégias de combate ao vírus.

Tendo em vista que astrócitos humanos constituem uma importante célula da barreira hematoencefálica, são sensíveis à infecção pelo ZIKAV, e podem ser uma fonte de citocinas próinflamatórias no tecido cerebral (STEFANIK *et al.*, 2018), utilizou-se linhagem de células de tumor cerebral U-251 (astrocitoma) para investigar a expressão de citocinas TNF, IL-8 e IL-10 como resposta imunológica contra o vírus em tecidos neurais

As células da microglia são as principais produtoras de IL-10 em gliomas (WAGNER *et al.*, 1999), uma citocina com amplo espectro de atividade imunomoduladora em humanos (DE VRIES, 1995). Os níveis de expressão de IL-10 estão envolvidos na proliferação celular e atenuam a resposta imune de células T (HUETTNER; PAULUS; ROGGENDORF, 1994;

ZHANG; HUANG; LI; FAN *et al.*, 2019). Aqui foi demonstrado que o vírus modificado não alterou a produção de IL-10, quando comparado com o vírus selvagem (Figura 7C).

Um estudo recente caracterizou a produção de um grande número de citocinas em astrócitos infectados com o ZIKAV (STEFANIK *et al.*, 2018). Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas na produção de IL-10 e TNF, assim como o trabalho de Tappe também não demonstrou alteração na produção de TNF em células com inflamação aguda provocada por ZIKAV (TAPPE *et al.*, 2016). Nossos dados corroboram com estes estudos, uma vez que não foram observadas alterações significativas na produção de TNF e IL-10 (Figura 7B e 7C), demonstrando que o vírus modificado com fenilfluorona não alterou o perfil de resposta inflamatória destas interleucinas, quando comparado com o vírus selvagem, e desta forma o vírus modificado pode não induzir efeitos deletérios por inflamação em tecidos neurais.

Na literatura encontra-se que a produção de TNF na resposta inflamatória em glioblastomas está normalmente associada à expressão de IL-8 (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2007). Neste estudo não foi possível identificar elevação de TNF associada ao aumento da expressão de IL-8 por células nervosas infectadas com ZIKAV selvagem e modificado.

A interleucina 8 é um importante marcador de inflamação neural (NITTA *et al.*, 1992). No estudo do Stefanik e colaboradores a infecção de astrócitos humanos com ZIKAV promoveu aumento na expressão de IL-8, a despeito do TNF e IL-10 (STEFANIK *et al.*, 2018). Nesse trabalho não foi identificado diferença estatisticamente significativa na expressão de IL-8 em células infectadas com o ZIKAVselvagem, no entanto, houve aumento de IL-8 nas células infectadas com o vírus modificado com fenilfluorona em comparação com os controles. (Figura 7A). Contudo, outros estudos devem ser realizados, para investigar respostas imunológicas provocadas pelo ZIKAV.

Por fim, este estudo demonstrou que derivados de catecol, como a fenilfluorona, são substâncias promissoras para interagir com a glicoproteína E do ZIKAV, e podem ser testados na investigação para o desenvolvimento de terapias contra o ZIKAV, especialmente para o desenvolvimento de vacinas de vírus atenuado. Entretanto, ainda se faz necessário mais estudos, *in vitro* e *in vivo*, para efetivar a implementação de uma vacina com vírus atenuado por catecóis como a fenilfluorona.

6 CONCLUSÃO

- Entende-se que a Fenilfluorona interage com a glicoproteína E do vírus da Zika.
- A fluoroma é citotóxica para as células U-251 em concentrações acima de 49,9 μM (variação: 14,8-74,0 μM ; n= 9)
- Vírus modificado com fenilfluorona tem sua infectividade reduzida em células Vero.
- O vírus modificado não altera o perfil de expressão das interleucinas IL-10 e TNF em glioblastomas em relação ao vírus selvagem,, mas houve aumento de IL-8 em comparação com os controles.

REFERÊNCIAS

- ABÍLIO, A. P.; KAMPANGO, A.; ARMANDO, E. J.; GUDO, E. S. *et al.* First confirmed occurrence of the yellow fever virus and dengue virus vector *Aedes (Stegomyia) luteocephalus* (Newstead, 1907) in Mozambique. **Parasit Vectors**, 13, n. 1, p. 350, Jul 2020.
- ADCOCK, R. S.; CHU, Y. K.; GOLDEN, J. E.; CHUNG, D. H. Evaluation of anti-Zika virus activities of broad-spectrum antivirals and NIH clinical collection compounds using a cell-based, high-throughput screen assay. **Antiviral Res**, 138, p. 47-56, 02 2017.
- AGRELLI, A.; DE MOURA, R. R.; CROVELLA, S.; BRANDÃO, L. A. C. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. **Infect Genet Evol**, 69, p. 22-29, 04 2019.
- AKHRAS, S.; HERRLEIN, M. L.; ELGNER, F.; HOLZHAUSER, T. *et al.* ZIKV Envelope Domain-Specific Antibodies: Production, Purification and Characterization. **Viruses**, 11, n. 8, 08 2019.
- ALBUQUERQUE, M. F. P. M.; SOUZA, W. V.; ARAÚJO, T. V. B.; BRAGA, M. C. *et al.* The microcephaly epidemic and Zika virus: building knowledge in epidemiology. **Cad Saude Publica**, 34, n. 10, p. e00069018, 10 2018.
- ANGELO, J. R.; FULLER, T. L.; LEANDRO, B. B. S.; PRAÇA, H. L. F. *et al.* Neurological complications associated with emerging viruses in Brazil. **Int J Gynaecol Obstet**, 148 Suppl 2, p. 70-75, Jan 2020.
- ASIF, A.; MANZOOR, S.; TUZ-ZAHRA, F.; SAALIM, M. *et al.* Zika Virus: Immune Evasion Mechanisms, Currently Available Therapeutic Regimens, and Vaccines. **Viral Immunol**, 30, n. 10, p. 682-690, 12 2017.
- BAGASRA, O.; ADDANKI, K. C.; GOODWIN, G. R.; HUGHES, B. W. *et al.* Cellular Targets and Receptor of Sexual Transmission of Zika Virus. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, 25, n. 10, p. 679-686, 2017 Nov/Dec 2017.
- BARRETO, G.; MADUREIRA, D.; CAPANI, F.; AON-BERTOLINO, L. *et al.* The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway. **Environ Mol Mutagen**, 50, n. 9, p. 771-780, Dec 2009.
- BASAK, S. C.; MAJUMDAR, S.; NANDY, A.; ROY, P. *et al.* Computer-Assisted and Data Driven Approaches for Surveillance, Drug Discovery, and Vaccine Design for the Zika Virus. **Pharmaceuticals (Basel)**, 12, n. 4, Oct 2019.
- BELL, T. M.; FIELD, E. J.; NARANG, H. K. Zika virus infection of the central nervous system of mice. **Arch Gesamte Virusforsch**, 35, n. 2, p. 183-193, 1971.
- BERNATCHEZ, J. A.; TRAN, L. T.; LI, J.; LUAN, Y. *et al.* Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. **J Med Chem**, 63, n. 2, p. 470-489, Jan 2020.

BJORLAND, L. S.; FLUGE, O.; GILJE, B.; MAHESPARAN, R. *et al.* Treatment approach and survival from glioblastoma: results from a population-based retrospective cohort study from Western Norway. **BMJ Open**, 11, n. 3, p. e043208, 03 2021.

BLOHM, G. M.; LEDNICKY, J. A.; MÁRQUEZ, M.; WHITE, S. K. *et al.* Evidence for Mother-to-Child Transmission of Zika Virus Through Breast Milk. **Clin Infect Dis**, 66, n. 7, p. 1120-1121, 03 2018.

BOBERMIN, L. D.; QUINCOZES-SANTOS, A.; SANTOS, C. L.; VARELA, A. P. M. *et al.* Zika virus exposure affects neuron-glia communication in the hippocampal slices of adult rats. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 21604, 12 10 2020.

BORCHERING, R. K.; HUANG, A. T.; MIER-Y-TERAN-ROMERO, L.; ROJAS, D. P. *et al.* Impacts of Zika emergence in Latin America on endemic dengue transmission. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 5730, 12 2019.

BREW, R.; ERIKSON, J. S.; WEST, D. C.; KINSELLA, A. R. *et al.* Interleukin-8 as an autocrine growth factor for human colon carcinoma cells in vitro. **Cytokine**, 12, n. 1, p. 78-85, Jan 2000.

BYLER, K. G.; OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. In-silico screening for anti-Zika virus phytochemicals. **J Mol Graph Model**, 69, p. 78-91, 09 2016.

CABRAL-MIRANDA, G.; LIM, S. M.; MOHSEN, M. O.; POBELOV, I. V. *et al.* -Derived E-DIII Protein Displayed on Immunologically Optimized VLPs Induces Neutralizing Antibodies without Causing Enhancement of. **Vaccines (Basel)**, 7, n. 3, Jul 2019.

CALLAND, N.; ALBECKA, A.; BELOUZARD, S.; WYCHOWSKI, C. *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-gallate is a new inhibitor of hepatitis C virus entry. **Hepatology**, 55, n. 3, p. 720-729, Mar 2012.

CALVEZ, E.; MOUSSON, L.; VAZEILLE, M.; O'CONNOR, O. *et al.* Zika virus outbreak in the Pacific: Vector competence of regional vectors. **PLoS Negl Trop Dis**, 12, n. 7, p. e0006637, 07 2018.

CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 21, n. 10, p. 1885-1886, Oct 2015.

CAO-LORMEAU, V. M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; ROBIN, E. *et al.* Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerg Infect Dis**, 20, n. 6, p. 1085-1086, Jun 2014.

CAPLIVSKI, D. Zika Virus Infection and Its Devastating Consequences. **Ann Glob Health**, 85, n. 1, 08 2019.

CARBAUGH, D. L.; LAZEAR, H. M. Flavivirus Envelope Protein Glycosylation: Impacts on Viral Infection and Pathogenesis. **J Virol**, 94, n. 11, May 2020.

CARNEIRO, B. M.; BATISTA, M. N.; BRAGA, A. C. S.; NOGUEIRA, M. L. *et al.* The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. **Virology**, 496, p. 215-218, 09 2016.

CHELLASAMY, S. K.; DEVARAJAN, S. Identification of Potential Lead Molecules for Zika Envelope Protein from In Silico Perspective. **Avicenna J Med Biotechnol**, 11, n. 1, p. 94-103, 2019 Jan-Mar 2019.

CHEMAXOM, MARVINSKETCH version 5.12.1. [S.l], ChemAxon, [2013]

CHEN, L.; LIU, Y.; WANG, S.; SUN, J. *et al.* Antiviral activity of peptide inhibitors derived from the protein E stem against Japanese encephalitis and Zika viruses. **Antiviral Res**, 141, p. 140-149, 05 2017.

CHEN, Q.; WU, J.; YE, Q.; MA, F. *et al.* Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate. **mBio**, 9, n. 5, 09 2018.

CHEN, X.; LI, C.; LIN, W.; LI, T. *et al.* A Novel Neutralizing Antibody Targeting a Unique Cross-Reactive Epitope on the hi Loop of Domain II of the Envelope Protein Protects Mice against Duck Tembusu Virus. **J Immunol**, 204, n. 7, p. 1836-1848, Apr 2020.

CHIU, C. F.; CHU, L. W.; LIAO, I. C.; SIMANJUNTAK, Y. *et al.* The Mechanism of the Zika Virus Crossing the Placental Barrier and the Blood-Brain Barrier. **Front Microbiol**, 11, p. 214, 2020.

CHONG, H. Y.; LEOW, C. Y.; ABDUL MAJEED, A. B.; LEOW, C. H. Flavivirus infection- A review of immunopathogenesis, immunological response, and immunodiagnosis. **Virus Res**, 274, p. 197770, 12 2019.

COMPORTI, M. Three models of free radical-induced cell injury. **Chem Biol Interact**, 72, n. 1-2, p. 1-56, 1989.

CONZELMANN, C.; ZOU, M.; GROß, R.; HARMS, M. *et al.* Storage-Dependent Generation of Potent Anti-ZIKV Activity in Human Breast Milk. **Viruses**, 11, n. 7, 06 2019.

DABAJA, M. Z.; LIMA, E. D. O.; DE OLIVEIRA, D. N.; GUERREIRO, T. M. *et al.* Metabolic alterations induced by attenuated Zika virus in glioblastoma cells. **Cell & Bioscience**, 8, n. 1, p. 47, 2018/09/04 2018.

DAI, L.; SONG, J.; LU, X.; DENG, Y. Q. *et al.* Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. **Cell Host Microbe**, 19, n. 5, p. 696-704, May 2016.

DE OLIVEIRA, D. M.; PITANGA, B. P.; GRANGEIRO, M. S.; LIMA, R. M. *et al.* Catechol cytotoxicity in vitro: induction of glioblastoma cell death by apoptosis. **Hum Exp Toxicol**, 29, n. 3, p. 199-212, Mar 2010.

DE QUENTAL, O. B.; FRANÇA, E. L.; HONÓRIO-FRANÇA, A. C.; MORAIS, T. C. *et al.* Zika Virus Alters the Viscosity and Cytokines Profile in Human Colostrum. **J Immunol Res**, 2019, p. 9020519, 2019.

DE THOISY, B.; SILVA, N. I. O.; SACCHETTO, L.; DE SOUZA TRINDADE, G. *et al.* Spatial epidemiology of yellow fever: Identification of determinants of the 2016-2018 epidemics and at-risk areas in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, 14, n. 10, p. e0008691, Oct 2020.

DE VRIES, J. E. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. **Ann Med**, 27, n. 5, p. 537-541, Oct 1995.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 46, n. 5, p. 509-520, Sep 1952.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **J Neurochem**, 139 Suppl 2, p. 136-153, 10 2016.

DUFFY, M. R.; CHEN, T. H.; HANCOCK, W. T.; POWERS, A. M. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N Engl J Med**, 360, n. 24, p. 2536-2543, Jun 2009.

EFREMOV, L.; ABERA, S. F.; BEDIR, A.; VORDERMARK, D. *et al.* Patterns of glioblastoma treatment and survival over a 16-years period: pooled data from the German Cancer Registries. **J Cancer Res Clin Oncol**, Mar 2021.

EL SAYED, K. A. Natural Products as Antiviral Agents. **Studies in Natural Products Chemistry**, 24, p. 473-572, 2000.

FARIA, N. R.; AZEVEDO, R. D. S. D.; KRAEMER, M. U. G.; SOUZA, R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, 352, n. 6283, p. 345-349, Apr 2016.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas--Yet Another Arbovirus Threat. **N Engl J Med**, 374, n. 7, p. 601-604, Feb 2016.

FAN, Y. C.; CHIU, H. C.; CHEN, L. K.; CHANG, G. J. *et al.* Formalin Inactivation of Japanese Encephalitis Virus Vaccine Alters the Antigenicity and Immunogenicity of a Neutralization Epitope in Envelope Protein Domain III. **PLoS Negl Trop Dis**, 9, n. 10, p. e0004167, Oct 2015.

FERRARIS, P.; COCHET, M.; HAMEL, R.; GLADWYN-NG, I. *et al.* Zika virus differentially infects human neural progenitor cells according to their state of differentiation and dysregulates neurogenesis through the Notch pathway. **Emerg Microbes Infect**, 8, n. 1, p. 1003-1016, 2019.

FERRAZ, A. C.; MORAES, T. F. S.; NIZER, W. S. D. C.; SANTOS, M. D. *et al.* Virucidal activity of proanthocyanidin against Mayaro virus. **Antiviral Res**, 168, p. 76-81, 08 2019.

GIRALDO, M. I.; XIA, H.; AGUILERA-AGUIRRE, L.; HAGE, A. *et al.* Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. **Nature**, 585, n. 7825, p. 414-419, 09 2020.

GOEBEL, S.; SNYDER, B.; SELLATI, T.; SAEED, M. *et al.* A sensitive virus yield assay for evaluation of Antivirals against Zika Virus. **J Virol Methods**, 238, p. 13-20, 12 2016.

GOO, L.; DOWD, K. A.; SMITH, A. R.; PELC, R. S. *et al.* Zika Virus Is Not Uniquely Stable at Physiological Temperatures Compared to Other Flaviviruses. **mBio**, 7, n. 5, 09 06 2016.

GOO, L.; DEMASO, C. R.; PELC, R. S.; LEDGERWOOD, J. E. *et al.* The Zika virus envelope protein glycan loop regulates virion antigenicity. **Virology**, 515, p. 191-202, 02 2018.

GOO, L.; VANBLARGAN, L. A.; DOWD, K. A.; DIAMOND, M. S. *et al.* A single mutation in the envelope protein modulates flavivirus antigenicity, stability, and pathogenesis. **PLoS Pathog**, 13, n. 2, p. e1006178, 02 2017.

GOODFELLOW, F. T.; WILLARD, K. A.; WU, X.; SCOVILLE, S. *et al.* Strain-Dependent Consequences of Zika Virus Infection and Differential Impact on Neural Development. **Viruses**, 10, n. 10, 10 2018.

GOURINAT, A. C.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E.; GOARANT, C. *et al.* Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis**, 21, n. 1, p. 84-86, Jan 2015.

GOVORKOVA, E. A.; MURTI, G.; MEIGNIER, B.; DE TAISNE, C. *et al.* African green monkey kidney (Vero) cells provide an alternative host cell system for influenza A and B viruses. **J Virol**, 70, n. 8, p. 5519-5524, Aug 1996.

GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **BMJ**, 352, p. i657, Feb 2016.

GUO, X.; LI, C.; DENG, Y.; JIANG, Y. *et al.* Vector Competence and Vertical Transmission of Zika Virus in. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 20, n. 5, p. 374-379, May 2020.

GURUNG, S.; NADEAU, H.; MAXTED, M.; PEREGRINE, J. *et al.* Maternal Zika Virus (ZIKV) Infection following Vaginal Inoculation with ZIKV-Infected Semen in Timed-Pregnant Olive Baboons. **J Virol**, 94, n. 11, May 2020.

GUTIÉRREZ SÁNCHEZ, L. A.; SANDOVAL MARTÍNEZ, D. K.; DÍAZ-MARTÍNEZ, L. A.; BECERRA MOJICA, C. H. Zika virus infection: A correlation between prenatal ultrasonographic and postmortem neuropathologic changes. **Neuropathology**, 39, n. 6, p. 434-440, Dec 2019.

GÖERTZ, G. P.; ABBO, S. R.; FROS, J. J.; PIJLMAN, G. P. Functional RNA during Zika virus infection. **Virus Res**, 254, p. 41-53, 08 2018.

HABY, M. M.; PINART, M.; ELIAS, V.; REVEIZ, L. Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. **Bull World Health Organ**, 96, n. 6, p. 402-413D, Jun 2018.

HADDOW, A. D.; SCHUH, A. J.; YASUDA, C. Y.; KASPER, M. R. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, 6, n. 2, p. e1477, 2012.

HARRIS, M.; CALDWELL, J. M.; MORDECAI, E. A. Climate drives spatial variation in Zika epidemics in Latin America. **Proc Biol Sci**, 286, n. 1909, p. 20191578, 08 2019.

HARVILLE, E. W.; BUEKENS, P. M.; CAFFERATA, M. L.; GILBOA, S. *et al.* Measurement error, microcephaly prevalence and implications for Zika: an analysis of Uruguay perinatal data. **Arch Dis Child**, 105, n. 5, p. 428-432, May 2020.

HASSINEN, T.; PERAKYLA, M. New energy terms for reduced protein models implemented in an off-lattice force field. **Journal of Computational Chemistry**, v. 22, p. 1229-1242, 2001.

HAVLÍKOVÁ, M.; HULIČIAK, M.; BAZGIER, V.; BERKA, K. *et al.* Fluorone dyes have binding sites on both cytoplasmic and extracellular domains of Na,K-ATPase. **Biochim Biophys Acta**, 1828, n. 2, p. 568-576, Feb 2013.

HAYES, E. B. Zika virus outside Africa. **Emerg Infect Dis**, 15, n. 9, p. 1347-1350, Sep 2009.

HEPEL, M.; STOBIECKA, M. Supramolecular interactions of oxidative stress biomarker glutathione with fluorone black. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, 192, p. 146-152, Mar 2018

HEUKELBACH, J.; ALENCAR, C. H.; KELVIN, A. A.; DE OLIVEIRA, W. K. *et al.* Zika virus outbreak in Brazil. **J Infect Dev Ctries**, 10, n. 2, p. 116-120, Feb 2016.

HILLS, S. L.; RUSSELL, K.; HENNESSEY, M.; WILLIAMS, C. *et al.* Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, 65, n. 8, p. 215-216, Mar 2016.

HÖRMANN, P.; DELCAMBRE, S.; HANKE, J.; GEFFERS, R. *et al.* Impairment of neuronal mitochondrial function by L-DOPA in the absence of oxygen-dependent auto-oxidation and oxidative cell damage. **Cell Death Discov**, 7, n. 1, p. 151, Jun 28 2021.

HUETTNER, C.; CZUB, S.; KERKAU, S.; ROGGENDORF, W. *et al.* Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. **Anticancer Res**, 17, n. 5A, p. 3217-3224, 1997 Sep-Oct 1997.

HUETTNER, C.; PAULUS, W.; ROGGENDORF, W. [Increased amounts of IL-10 mRNA in anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme]. **Verh Dtsch Ges Pathol**, 78, p. 418-422, 1994.

HUITS, R.; DE SMET, B.; GRARD, G.; EGGERMONT, K. *et al.* Detection of Zika virus replication in human semen by reverse transcription polymerase chain reaction targeting of antisense RNA. **J Infect Dis**, Feb 2020.

IDE, K.; KAWASAKI, Y.; KAWAKAMI, K.; YAMADA, H. Anti-influenza Virus Effects of Catechins: A Molecular and Clinical Review. **Curr Med Chem**, 23, n. 42, p. 4773-4783, 2016.

IWATA, R.; HYOUNG LEE, J.; HAYASHI, M.; DIANZANI, U. *et al.* ICOSLG-mediated regulatory T-cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. **Neuro Oncol**, 22, n. 3, p. 333-344, 03 2020.

J.R. Lakowicz. **Princípios da Espectroscopia da Fluorescência** (terceiro ed.), Springer, Nova York (2006).

JABRANE-FERRAT, N.; VEAS, F. Zika Virus Targets Multiple Tissues and Cell Types During the First Trimester of Pregnancy. **Methods Mol Biol**, 2142, p. 235-249, 2020.

JING, Z.; LI, M.; WANG, H.; YANG, Z. *et al.* Gallic acid-gold nanoparticles enhance radiation-induced cell death of human glioma U251 cells. **IUBMB Life**, 73, n. 2, p. 398-407, Feb 2021.

KAMGANG, B.; VAZEILLE, M.; TEDJOU, A.; YOUNGANG, A. P. *et al.* Different populations of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Central Africa are susceptible to Zika virus infection. **PLoS Negl Trop Dis**, 14, n. 3, p. e0008163, 03 2020.

KASPRZYKOWSKI, J. I.; FUKUTANI, K. F.; FABIO, H.; FUKUTANI, E. R. *et al.* A recursive sub-typing screening surveillance system detects the appearance of the ZIKV African lineage in Brazil: Is there a risk of a new epidemic? **Int J Infect Dis**, 96, p. 579-581, Jul 2020.

KAZMI, S. S.; ALI, W.; BIBI, N.; NOUROZ, F. A review on Zika virus outbreak, epidemiology, transmission and infection dynamics. **J Biol Res (Thessalon)**, 27, p. 5, Dec 2020.

KHORCHID, A.; FRAGOSO, G.; SHORE, G.; ALMAZAN, G. Catecholamine-induced oligodendrocyte cell death in culture is developmentally regulated and involves free radical generation and differential activation of caspase-3. **Glia**, 40, n. 3, p. 283-299, Dec 2002.

KIM, S. Y.; ZHAO, J.; LIU, X.; FRASER, K. *et al.* Interaction of Zika Virus Envelope Protein with Glycosaminoglycans. **Biochemistry**, 56, n. 8, p. 1151-1162, 02 2017.

KHORCHID, A.; FRAGOSO, G.; SHORE, G.; ALMAZAN, G. Catecholamine-induced oligodendrocyte cell death in culture is developmentally regulated and involves free radical generation and differential activation of caspase-3. **Glia**, 40, n. 3, p. 283-299, Dec 2002.

KOSMOPOULOS, M.; CHRISTOFIDES, A.; DREKOLIAS, D.; ZAVRAS, P. D. *et al.* Critical Role of IL-8 Targeting in Gliomas. **Curr Med Chem**, 25, n. 17, p. 1954-1967, 2018.

KOSTYUCHENKO, V. A.; LIM, E. X.; ZHANG, S.; FIBRIANSAH, G. *et al.* Structure of the thermally stable Zika virus. **Nature**, 533, n. 7603, p. 425-428, 05 2016.

KUHN, R. J.; ZHANG, W.; ROSSMANN, M. G.; PLETNEV, S. V. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, 108, n. 5, p. 717-725, Mar 2002.

LEDNICKY, J.; BEAU DE ROCHARS, V. M.; EL BADRY, M.; LOEB, J. *et al.* Zika Virus Outbreak in Haiti in 2014: Molecular and Clinical Data. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 4, p. e0004687, Apr 2016.

LEDUR, P. F.; KARMIRIAN, K.; PEDROSA, C. D. S. G.; SOUZA, L. R. Q. *et al.* Zika virus infection leads to mitochondrial failure, oxidative stress and DNA damage in human iPSC-derived astrocytes. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 1218, Jan 2020.

LEWIS-ATWELL, T.; TOWNSEND, P. A.; GRAYSON, M. N. Comparisons of different force fields in conformational analysis and searching of organic molecules: A review. **Tetrahedron**, 79, p. 131865, 2021/01/22/ 2021.

LI, R.; NARITA, R.; OUDA, R.; KIMURA, C. *et al.* Structure-dependent antiviral activity of catechol derivatives in pyroligneous acid against the encephalomyocarditis virus. **RSC Advances**, 8, n. 63, p. 35888-35896, 2018. 10.1039/C8RA07096B.

- LIMA, M. C.; DE MENDONÇA, L. R.; REZENDE, A. M.; CARRERA, R. M. *et al.* The Transcriptional and Protein Profile From Human Infected Neuroprogenitor Cells Is Strongly Correlated to Zika Virus Microcephaly Cytokines Phenotype Evidencing a Persistent Inflammation in the CNS. **Front Immunol**, 10, p. 1928, 2019.
- LYMAN, M.; LLOYD, D. G.; JI, X.; VIZCAYCHIPI, M. P. *et al.* Neuroinflammation: the role and consequences. **Neurosci Res**, 79, p. 1-12, Feb 2014.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv Virus Res**, 59, p. 23-61, 2003.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv Drug Deliv Rev**, 46, n. 1-3, p. 3-26, Mar 01 2001.
- LIU, Y.; TANG, Z. G.; LIN, Y.; QU, X. G. *et al.* Effects of quercetin on proliferation and migration of human glioblastoma U251 cells. **Biomed Pharmacother**, 92, p. 33-38, Aug 2017.
- LUBIN, J. A.; ZHANG, R. R.; KUO, J. S. Zika Virus has Oncolytic Activity Against Glioblastoma Stem Cells. **Neurosurgery**, 82, n. 5, p. E113-E114, 05 2018.
- MAIER, G. P.; BERNT, C. M.; BUTLER, A. Catechol oxidation: considerations in the design of wet adhesive materials. **Biomater Sci**, 6, n. 2, p. 332-339, Jan 2018.
- MARTÍN-GARCÍA, J.; GONZÁLEZ-SCARANO, F. Glial Responses to Virus Infection. **Encyclopedia of Neuroscience**, p. 861-869, 2009.
- MASMEJAN, S.; BAUD, D.; MUSSO, D.; PANCHAUD, A. Zika virus, vaccines, and antiviral strategies. **Expert Rev Anti Infect Ther**, 16, n. 6, p. 471-483, 06 2018.
- MCALLISTER, J. C.; PORCELLI, M.; MEDINA, J. M.; DELOREY, M. J. *et al.* Mosquito Control Activities during Local Transmission of Zika Virus, Miami-Dade County, Florida, USA, 2016. **Emerg Infect Dis**, 26, n. 5, p. 881-890, May 2020.
- MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host Microbe**, 21, n. 2, p. 134-142, Feb 2017.
- MISHRA, N.; NG, J.; RAKEMAN, J. L.; PERRY, M. J. *et al.* One-step pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of zika, dengue, chikungunya, West Nile viruses and a human housekeeping gene. **J Clin Virol**, 120, p. 44-50, 11 2019.
- MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; POPOVIĆ, M. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med**, 374, n. 10, p. 951-958, Mar 2016.
- MOCKENHAUPT, K.; GONSIEWSKI, A.; KORDULA, T. RelB and Neuroinflammation. **Cells**, 10, n. 7, 06 27 2021.
- MODIS, Y.; OGATA, S.; CLEMENTS, D.; HARRISON, S. C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature**, 427, n. 6972, p. 313-319, Jan 2004.

MONAGHAN, A. J.; EISEN, R. J.; EISEN, L.; MCALLISTER, J. *et al.* Consensus and uncertainty in the geographic range of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the contiguous United States: Multi-model assessment and synthesis. **PLoS Comput Biol**, 15, n. 10, p. e1007369, 10 2019.

MONTES-GRAJALES, D.; PUERTA-GUARDO, H.; ESPINOSA, D. A.; HARRIS, E. *et al.* In silico drug repurposing for the identification of potential candidate molecules against arboviruses infection. **Antiviral Res**, 173, p. 104668, 01 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 1983.

MOUSAVI, S. A.; MALERØD, L.; BERG, T.; KJEKEN, R. Clathrin-dependent endocytosis. **Biochem J**, 377, n. Pt 1, p. 1-16, Jan 2004.

MUSSO, D.; RICHARD, V.; TEISSIER, A.; STONE, M. *et al.* Detection of Zika virus RNA in semen of asymptomatic blood donors. **Clin Microbiol Infect**, 23, n. 12, p. 1001.e1001-1001.e1003, Dec 2017.

NAPOLITANO, A.; MANINI, P.; D'ISCHIA, M. Oxidation chemistry of catecholamines and neuronal degeneration: an update. **Curr Med Chem**, 18, n. 12, p. 1832-1845, 2011.

NITTA, T.; ALLEGRETTA, M.; OKUMURA, K.; SATO, K. *et al.* Neoplastic and reactive human astrocytes express interleukin-8 gene. **Neurosurg Rev**, 15, n. 3, p. 203-207, 1992.

NOWAKOWSKI, T. J.; POLLEN, A. A.; DI LULLO, E.; SANDOVAL-ESPINOSA, C. *et al.* Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell**, 18, n. 5, p. 591-596, 05 2016.

OLSON, S. M.; DELANEY, A.; JONES, A. M.; CARR, C. P. *et al.* Updated baseline prevalence of birth defects potentially related to Zika virus infection. **Birth Defects Res**, 111, n. 13, p. 938-940, 08 2019.

PANGANIBAN, A. T.; BLAIR, R. V.; HATTLER, J. B.; BOHANNON, D. G. *et al.* A Zika virus primary isolate induces neuroinflammation, compromises the blood-brain barrier and upregulates CXCL12 in adult macaques. **Brain Pathol**, 30, n. 6, p. 1017-1027, 11 2020.

PATTNAIK, A.; SAHOO, B. R.; PATTNAIK, A. K. Current Status of Zika Virus Vaccines: Successes and Challenges. **Vaccines (Basel)**, 8, n. 2, May 2020.

PFAENDER, S.; VIELLE, N. J.; EBERT, N.; STEINMANN, E. *et al.* Inactivation of Zika virus in human breast milk by prolonged storage or pasteurization. **Virus Res**, 228, p. 58-60, 01 2017.

POLY DA SILVA, Í.; LOPES DA SILVA, M.; DIAS, R. S.; SANTOS, E. G. *et al.* Xanthenedione (and intermediates involved in their synthesis) inhibit Zika virus migration to the central nervous system in murine neonatal models. **Microbes Infect**, Apr 2020.

QADIR, A.; RIAZ, M.; SAEED, M.; SHAHZAD-UL-HUSSAN, S. Potential targets for therapeutic intervention and structure based vaccine design against Zika virus. **Eur J Med Chem**, 156, p. 444-460, Aug 2018.

- QIU, B.; ZHANG, D.; WANG, C.; TAO, J. *et al.* IL-10 and TGF- β 2 are overexpressed in tumor spheres cultured from human gliomas. **Mol Biol Rep**, 38, n. 5, p. 3585-3591, Jun 2011.
- RAYCHAUDHURI, B.; HAN, Y.; LU, T.; VOGELBAUM, M. A. Aberrant constitutive activation of nuclear factor kappaB in glioblastoma multiforme drives invasive phenotype. **J Neurooncol**, 85, n. 1, p. 39-47, Oct 2007.
- RAYCHAUDHURI, B.; VOGELBAUM, M. A. IL-8 is a mediator of NF- κ B induced invasion by gliomas. **J Neurooncol**, 101, n. 2, p. 227-235, Jan 2011.
- ROMERO-BREY, I.; BARTENSCHLAGER, R. Endoplasmic Reticulum: The Favorite Intracellular Niche for Viral Replication and Assembly. **Viruses**, 8, n. 6, 06 2016.
- RUSTHOVEN, C. G.; KOSHY, M.; SHER, D. J.; NEY, D. E. *et al.* Combined-Modality Therapy With Radiation and Chemotherapy for Elderly Patients With Glioblastoma in the Temozolomide Era: A National Cancer Database Analysis. **JAMA Neurol**, 73, n. 7, p. 821-828, 07 2016.
- SAIZ, J. C.; VÁZQUEZ-CALVO, Á.; BLÁZQUEZ, A. B.; MERINO-RAMOS, T. *et al.* Zika Virus: the Latest Newcomer. **Front Microbiol**, 7, p. 496, 2016.
- SANGEETHA, K.; MARTÍN-ACEBES, M. A.; SAIZ, J. C.; MEENA, K. S. Molecular docking and antiviral activities of plant derived compounds against zika virus. **Microb Pathog**, p. 104540, Oct 2020.
- SARDI, S. I.; SOMASEKAR, S.; NACCACHE, S. N.; BANDEIRA, A. C. *et al.* Coinfections of Zika and Chikungunya Viruses in Bahia, Brazil, Identified by Metagenomic Next-Generation Sequencing. **J Clin Microbiol**, 54, n. 9, p. 2348-2353, 09 2016.
- SARKAR, A.; DESAI, U. R. A Simple Method for Discovering Druggable, Specific Glycosaminoglycan-Protein Systems. Elucidation of Key Principles from Heparin/Heparan Sulfate-Binding Proteins. **PLoS One**, 10, n. 10, p. e0141127, 2015.
- SARNO, M.; SACRAMENTO, G. A.; KHOURI, R.; DO ROSÁRIO, M. S. *et al.* Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. **PLoS Negl Trop Dis**, 10, n. 2, p. e0004517, Feb 2016.
- SCHOUEST, B.; PETERSON, T. A.; SZELTNER, D. M.; SCHEEF, E. A. *et al.* Transcriptional signatures of Zika virus infection in astrocytes. **J Neurovirol**, 27, n. 1, p. 116-125, 02 2021.
- SHAN, C.; MURUATO, A. E.; NUNES, B. T. D.; LUO, H. *et al.* A live-attenuated Zika virus vaccine candidate induces sterilizing immunity in mouse models. **Nat Med**, 23, n. 6, p. 763-767, Jun 2017.
- SHARMA, I.; SINGH, A.; SIRAJ, F.; SAXENA, S. IL-8/CXCR1/2 signalling promotes tumor cell proliferation, invasion and vascular mimicry in glioblastoma. **J Biomed Sci**, 25, n. 1, p. 62, Aug 2018.

SHARMA, N.; MURALI, A.; SINGH, S. K.; GIRI, R. Epigallocatechin gallate, an active green tea compound inhibits the Zika virus entry into host cells via binding the envelope protein. **Int J Biol Macromol**, 104, n. Pt A, p. 1046-1054, Nov 2017.

SIMON, O.; ACKET, B.; FORFAIT, C.; GIRAULT, D. *et al.* Zika virus outbreak in New Caledonia and Guillain-Barré syndrome: a case-control study. **J Neurovirol**, 24, n. 3, p. 362-368, 06 2018.

SIMONIN, Y.; VAN RIEL, D.; VAN DE PERRE, P.; ROCKX, B. *et al.* Differential virulence between Asian and African lineages of Zika virus. **PLoS Negl Trop Dis**, 11, n. 9, p. e0005821, 09 2017.

SRIVASTAVA, M.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; SIROHI, D. *et al.* Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 3896, 08 04 2020.

SIROHI, D.; CHEN, Z.; SUN, L.; KLOSE, T. *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, 352, n. 6284, p. 467-470, Apr 2016.

SMITHBURN, K. C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **J Immunol**, 69, n. 2, p. 223-234, Aug 1952.

SOH, Y.; SHIN, M.-H.; LEE, J.-S.; JANG, J.-H. *et al.* Oxidative DNA damage and glioma cell death induced by tetrahydropapaveroline. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 544, n. 2, p. 129-142, 2003/11/01/ 2003.

SRIVASTAVA, M.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; SIROHI, D. *et al.* Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. **Nat Commun**, 11, n. 1, p. 3896, 08 04 2020.

STEFANIK, M.; FORMANOVA, P.; BILY, T.; VANCOVA, M. *et al.* Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. **BMC Neuroscience**, 19, n. 1, p. 5, 2018/02/20 2018.

STRANGE, D. P.; JIYAROM, B.; POURHABIBI ZARANDI, N.; XIE, X. *et al.* Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. **mBio**, 10, n. 4, 07 2019.

SUN, J.; LIANG, Y.; HU, H.; ZHANG, B. Zika Virus Infects Primary Human Glial Cells and Results in Neuroinflammation and Cell Death. **The Journal of Immunology**, 204, n. 1 Supplement, p. 249.213, 2020.

TAPPE, D.; PÉREZ-GIRÓN, J. V.; ZAMMARCHI, L.; RISSLAND, J. *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Med Microbiol Immunol**, 205, n. 3, p. 269-273, Jun 2016.

TRICARICO, P. M.; CARACCILO, I.; CROVELLA, S.; D'AGARO, P. Zika virus induces inflammasome activation in the glial cell line U87-MG. **Biochem Biophys Res Commun**, 492, n. 4, p. 597-602, 10 28 2017.

TORSVIK, A.; STIEBER, D.; ENGER, P.; GOLEBIEWSKA, A. *et al.* U-251 revisited: genetic drift and phenotypic consequences of long-term cultures of glioblastoma cells. **Cancer Med**, 3, n. 4, p. 812-824, Aug 2014.

VALDES, V.; ZORRILLA, C. D.; GABARD-DURNAM, L.; MULDER-MENDEZ, N. *et al.* Cognitive Development of Infants Exposed to the Zika Virus in Puerto Rico. **JAMA Netw Open**, 2, n. 10, p. e1914061, 10 2019.

VALENTE, A. P.; MORAES, A. H. Zika virus proteins at an atomic scale: how does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 25, p. e20190013, Aug 2019.

VICENTI, I.; BOCCUTO, A.; GIANNINI, A.; DRAGONI, F. *et al.* Comparative analysis of different cell systems for Zika virus (ZIKV) propagation and evaluation of anti-ZIKV compounds in vitro. **Virus Res**, 244, p. 64-70, 01 15 2018.

VOET, S.; SRINIVASAN, S.; LAMKANFI, M.; VAN LOO, G. Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. **EMBO Mol Med**, 11, n. 6, 06 2019.
WAGNER, S.; CZUB, S.; GREIF, M.; VINCE, G. H. *et al.* Microglial/macrophage expression of interleukin 10 in human glioblastomas. **Int J Cancer**, 82, n. 1, p. 12-16, Jul 1999.

WALLIN, H.; MELIN, P.; SCHELIN, C.; JERGIL, B. Evidence that covalent binding of metabolically activated phenol to microsomal proteins is caused by oxidised products of hydroquinone and catechol. **Chem Biol Interact**, 55, n. 3, p. 335-346, Nov 1985.

WAUGH, D. J.; WILSON, C. The interleukin-8 pathway in cancer. **Clin Cancer Res**, 14, n. 21, p. 6735-6741, Nov 2008.

WANG, D.; CHEN, Q.; LIU, B.; LI, Y. *et al.* Ellagic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in human glioblastoma cells. **Acta Cir Bras**, 31, n. 2, p. 143-149, Feb 2016.

WANG, Z. Y.; WANG, Z.; ZHEN, Z. D.; FENG, K. H. *et al.* Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. **J Gen Virol**, 98, n. 8, p. 2061-2068, Aug 2017.

WELLER, M.; FELSBERG, J.; HARTMANN, C.; BERGER, H. *et al.* Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. **J Clin Oncol**, 27, n. 34, p. 5743-5750, Dec 2009.

WIRSCHING, H. G.; GALANIS, E.; WELLER, M. Glioblastoma. **Handb Clin Neurol**, 134, p. 381-397, 2016.

YUN, S. I.; LEE, Y. M. Zika virus: An emerging flavivirus. **J Microbiol**, 55, n. 3, p. 204-219, Mar 2017.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C.; MOSIMANN, A. L.; SANTOS, G. I. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 110, n. 4, p. 569-572, Jun 2015.

ZHANG, X.; JIA, R.; SHEN, H.; WANG, M. *et al.* Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. **Viruses**, 9, n. 11, 11 2017.

ZHANG, Y.; ZHANG, W.; OGATA, S.; CLEMENTS, D. *et al.* Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. **Structure**, 12, n. 9, p. 1607-1618, Sep 2004.

ZHANG, Z.; HUANG, X.; LI, J.; FAN, H. *et al.* Interleukin 10 promotes growth and invasion of glioma cells by up-regulating KPNA 2. **J Cancer Res Ther**, 15, n. 4, p. 927-932, 2019.

ZHAO, H.; FERNANDEZ, E.; DOWD, K. A.; SPEER, S. D. *et al.* Structural Basis of Zika Virus-Specific Antibody Protection. **Cell**, 166, n. 4, p. 1016-1027, Aug 2016.

ANEXO I

	Energia de ligação (Kcal/mol)	Derivado de catecol
1°	-9.82	3-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-8,8-dimetil-6-(3-metilbut-2-en-1-il)-4h,8h-pirano[2,3-f]cromos4-ona.
2°	-9.66	6,6',7,7'-tetrahidroxi-3,3'-dimetil-1,1',4,4'tetraoxo-5,5'-bis(propan-2-il)-1h,1'h,4h,4'h-[2,2'-binaftaleno]-8,8'-dicarbaldeído
3°	-9.39	(2e)-2-[(3,4-di-hidroxifenil)metilideno]-3-oxo-6-fenilhexanitrilo
4°	-9.20	2-(3,4-di-hidroxifenil)-1,4,4,4,8a-tetrahidrofenanthren-4-ona
5°	-9.18	5,7,8-trihidroxi-2-fenil-4h-crom-4-ona
6°	-9.17	3-(4,5-difenil-1h-imidazol-2-il)benzeno-1,2-diol
7°	-9.08	2',7'-dibromo-1,1-dioxospiro[2,1]lambda6-benzoxatiale-3,9'-xanteno]-3',4',5',6'-tetrol
8°	-9.05	(2s)-7-[(2s,3s,4s,5s,6r)-4,5-di-hidroxi-6-(hidroximetil)-3-[(2s,3r,4r,5r,6s)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxioxan-2-il]oxi-2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-2,3-di-hidroxi-4-ona
9°	-9.02	1_beta_3_4_dihydroxyphenyl_alanine hydroxamic
10°	-8.91	1,1',6,6',7,7'-hexahidroxi-3,3'-dimetil-5,5'-bis(propan-2-il)-[2,2'-binaftaleno]-8,8'-dicarbaldeído.
11°	-8.89	5,6,10-trihidroxi-8-oxapentaciclo[11.7.1.0 ^{2,7} .0 ⁹ , ²¹ .0 ^{5 5} , ²⁰]henicosa-1(21),2(7),3,5,9,12,15,17,19-nonaeno-11,14-diona
12°	-8.88	7-(3,4-di-hidroxifenil)-2,2,1.10-tetrametil-8,10,11,12-tetrahidro-2h-1,5,9-trioxatripifenileno-8-ona

13°	-8.87	2-(3,4-di-hidroxifenil)-4h-benzo[h]crom-4-ona
14°	-8.84	2,6,7-trihidroxi-9-fenilxanten-3-ona
15°	-8.83	4-[(1e)-2-(4-nitrofenil)diazen-1-il]benzeno-1,2-diol
16°	-8.79	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-6-[(2s,3r,4r,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]-4h-crom-4-ona
17°	-8.73	ácido 3-(3,4-di-hidroxifenil)-2-[[2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enoil]oxi}propanóico
18°	-8.70	3-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-7-metoxi-4h-crom-4-ona
19°	-8.70	(2s)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-7-[(2s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-[(3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il)oxi]metil}oxan-2-il]oxi}-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
20°	-8.68	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
21°	-8.67	(2z)-n-benzil-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enamide
22°	-8.64	ácido 2,3-bis({[(2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enoil]oxi})butanodióico
23°	-8.63	(2e)-2-ciano-n-{3-[(2e)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enamido]propil}-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enamida.
24°	-8.57	(2e)-3-fenilprop-2-en-1-il(2e)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enoato
25°	-8.56	(2e)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)-n-(4-fenilbutil)prop-2-enamida
26°	-8.55	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-4H-crom-4-ona
27°	-8.54	(2e)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)-n-[(1s)-1-feniletíl]prop-2-enamide

28°	-8.51	[(2r,3R)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3,4-di-hidro-2H-crom-3-il]3,4,5-trihidroxibenzoato
29°	-8.49	2-(3,4,5-trihidroxifenil)-3,4-di-hidro-2H-1-benzopirano-3,5,7-triol
30°	-8.48	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-[(3,4,5-trihidroxioxan-2-il)oxi]-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
31°	-8.48	3-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3,4-di-hidro-2H-1-benzopiran-4-ona
32°	-8.47	(2s,3s)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,4-di-hidro-2h-1-benzopirano-3,5,7-triol
33°	-8.47	2-(3,4-di-hidroxifenil)crom-4-ona
34°	-8.41	2-(3,4-di-hidroxifenil)-8-hidroxi-7-[[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi]-3,4-di-hidro-2h-1-benzopirão-4-ona
35°	-8.37	13-cloro-9-(2,3-di-hidroxifenil)-5,5-dimetil-2-azatriciclo[9.4.0.0 ^{3,8}]pentadeca-1(11),12,14-trien-7-ona
36°	-8.36	(e)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enamida
37°	-8.34	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-6,7-dimetoxi-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
38°	-8.33	(2z)-2-[(3,4-di-hidroxifenil)metilideno]-6-hidroxi-4-metoxi-2,3-di-hidro-1-benzofurano-3-ona
39°	-8.33	(2E)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)-n-[(1R)-1-feniletil]prop-2-enamide
40°	-8.32	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3-hidroxi-4h-crom-4-ona
41°	-8.32	2-(3,4-di-hidroxifenil)-7,8-di-hidroxi-4h-crom-4-ona
42°	-8.31	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,4-di-hidro-2h-1-benzopirano-3,5,7-triol

43°	-8.31	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-7-[(2s,3s,4s,5s,6r)-3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxicos-4-ona.
44°	-8.31	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-6,7,8-trimetoxi-4h-crom-4-ona
45°	-8.30	4-[(1R)-2-amino-1-hidroxi(1- ³ h)etil]benzeno-1,2-diol
46°	-8.30	(2s)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-7-[(2s,3r,4s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi-2,3-dihidrocrom-4-ona
47°	-8.28	(3z)-2-amino-3-[(3,4,5-tri-hidroxifenil)metilideno]prop-1-eno-1,1,3-tricarbonitrilo
48°	-8.25	8-(4,5,6-trihidroxi-3-oxo-3h-xanten-9-il)naftaleno-1-carboxílico
49°	-8.25	n-[2-(4-clorofenil)etil]-7,8-di-hidroxi-2,3,4,5-tetrahidro-1h-2-benzazepina-2-carbothioamida
50°	-8.25	1-(3,4-di-hidroxifenil)-3-etil-2-metil-2,3-di-hidro-1h-indeno-5,6-diol
51°	-8.24	(2E)-n-benzil-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enamide
52°	-8.23	(4e)-4-[(3,4-di-hidroxifenil)metilideno]-2-[(furan-2-il)metil]-5-sulfanilideno-1,2-tiazolidin-3-ona
53°	-8.22	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-oxicrom-4-ona
54°	-8.19	2-[(4-clorofenil)sulfanil]-1-(3,4-di-hidroxifenil)etan-1-ona
55°	-8.19	4-[4-(3,4-di-hidroxifenil)-2,3-dimetilbutil]benzeno-1,2-diol
56°	-8.18	9-[4-(dimetilamino)fenil]-2,6,7-trihidroxi-3h-xant-3-ona
57°	-8.18	2-(benzenosulfonil)-1-(3,4-di-hidroxifenil)etan-1-ona

58°	-8.16	(8r,9s,13s,14s,16r,17r)-13-metil-67,8,9,11,12,14,15,16,17-decahidrociclopenas[a]fenanteno-2,3,16,17-tetrol.
59°	-8.15	(2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-(2,3,4-trihidroxifenil)prop-2-en-1-ona
60°	-8.15	2-(3,4-di-hidroxifenil)-7-hidroxi-4h-crom-4-ona
61°	-8.13	(2z)-n-benzil-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enamide
62°	-8.13	5-[(1e)-2-(3,4-di-hidroxifenil)etenil]benzeno-1,3-diol
63°	-8.12	4-(2-amino-1,2-di-hidroxietyl)benzeno-1,2-diol
64°	-8.12	4,5,6,7-tetracloro-3',4',5',6'-tetrahidroxi-3h-spiro[2-benzofurano-1,9'-xanten]-3-ona
65°	-8.10	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,6,7-tetrahidroxi-4h-crom-4-ona
66°	-8.08	(2z)-2-[(3,4-di-hidroxifenil)metilideno]-6-hidroxi-2,3-di-hidro-1-benzofurano-3-ona
67°	-8.07	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-4h-crom-4-ona
68°	-8.07	2-(2,3-di-hidroxifenil)-4h-crom-4-ona
69°	-8.06	4-[(1r)-2-amino-1-hidroxietyl]benzeno-1,2-diol
70°	-8.05	(2z)-2-[(3,4-di-hidroxifenil)metilideno]-7-hidroxi-6-[[[(2s,3r,4s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetilo)oxan-2-il]oxi]-2,3-di-hidro-1-benzofurano-3-ona
71°	-8.04	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicrom-4-ona
72°	-8.04	5,6,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)crom-4-ona

73°	-8.03	(1s,3br,9bs,11as)-11a-metil-1h,2h,3h,3h,3bh,4h,5h,9bh,10h,11h,11h-ciclopenta[a]fenanteno-1,7,8-triol
74°	-8.02	3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-(2,4,6-trihidroxifenil)propan-1-ona
75°	-8.00	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,7,8-trihidroxil-4h-crom-4-ona
76°	-7.99	(2e)-1-(2,4-di-hidroxifenil)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona
77°	-7.98	(2r)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenilo)-2-metilpropanilo
78°	-7.96	(2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona
79°	-7.95	7,2-(3,4,5-trihidroxifenil)-3,4-di-hidro-2H-1-benzopirano-3,5,7-triol
80°	-7.94	2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil)-3-hidroxiopropanóico
81°	-7.93	ácido (2r)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil)-propanóico
82°	-7.90	5,6-di-hidroxi-7-metoxi-2-fenil-4h-crom-4-ona
83°	-7.90	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-6-metoxicrom-4-ona
84°	-7.90	trihidroxibenzoil)benzeno-1,2,3-triol
85°	-7.90	5,7-di-hidroxi-3-[(2s,3r,4r,5r,6s)-3,4,5-trihidroxil-6-metiloxan-2-il]oxi-2-(3,4,5-trihidroxifenilo)crom-4-ona
86°	-7.89	4-benzoilbenzeno-1,2,3-triol
87°	-7.87	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5-di-hidroxi-7-metoxiacrom-4-ona

88°	-7.86	3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-(4-hidroxifenil)-2-propen-1-ona
89°	-7.86	1,2-di-hidroxi-3-nitro-9,10-di-hidroantraceno-9,10-diona
90°	-7.86	3,4-di-hidroxi-9,10-dioxos-9,10-di-hidroantraceno-2-sulfônico
91°	-7.86	[(2r,3R)-5,7-di-hidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-3,4-di-hidro-2H-crom-3-il]3,4,5-trihidroxibenzoato
92°	-7.85	8-oxatotracial[8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{12,77}]heptadeca-2(7),3,5,12(17),13,15-hexaeno-5,10,14,15-tetrol
93°	-7.84	3,7-di-hidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-2,3-di-hidrocrom-4-ona
94°	-7.83	ácido 2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil)(1- ^{4 4} c)propanóico
95°	-7.82	1-({n'-[(e)-(3,4-di-hidroxifenil)metilideno]hidrazinocarbonil}metilo)-3-(1,3-tiazol-2-il)ureia
96°	-7.81	3',4',5',6'-tetrahidroxi-3h-spiro[2-benzofurano-1,9'-xanten]-3-ona
97°	-7.80	7,8-di-hidroxi-2-fenil-4h-crom-4-ona
98°	-7.80	2,6,7-trihidroxi-9-metil-3h-xanten-3-ona
99°	-7.80	ácido (1r,3r,4s,5r)-1,3-bis[[e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enoil]oxi]-4,5-di-hidroxiciclohexano-1-carboxílico
100°	-7.78	3-(3,4-di-hidroxifenil)-1-(2,3,4-trihidroxifenil)propan-1-ona
101°	-7.77	(6-{[2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-4-oxo-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-3-il]oxi}-3,4,5-trihidroxioxan-2-il)metiloacetato
102°	-7.76	3,7-di-hidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-4h-crom-4-ona

103°	-7.76	6,7-di-hidroxi-4-fenil-2h-crom-2-ona
104°	-7.76	2-(3,4-di-hidroxi-fenil)-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-3,5,7-triol
105°	-7.76	(2e)-3-(2,3-di-hidroxi-fenil)-1-(2,4-di-hidroxi-fenil)prop-2-en-1-ona
106°	-7.75	4-[(1r)-1-hidroxi-2-(metilamino)etil]benzeno-1,2-diol
107°	-7.72	ácido 5,6-di-hidroxi-9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-1-sulfônico
108°	-7.68	5,6,7-trihidroxi-2-fenil-4h-crom-4-ona
109°	-7.66	3,5,7,8-tetrahidroxi-2-(4-hidroxi-fenil)-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
110°	-7.64	5,7,8-trihidroxi-2-fenil-4H-crom-4-ona
111°	-7.63	6-acetil-2,5,7,8-tetrahidroxi-4-metil-9,10-dioxo-9,10-di-hidroantraceno-1-carboxílico
112°	-7.63	5-[(1e)-1-(fenilamino)pent-1-en-2-il]benzeno-1,2,4-triol
113°	-7.62	ácido (2s,3s,4s,6r)-6-[(5,6-di-hidroxi-4-oxo-2-fenil-4h-crom-7-il)oxi]-3,4,5-trihidroxioxano-2-carboxílico
114°	-7.61	5,6,7-trihidroxi-2-(4-hidroxi-fenil)-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
115°	-7.60	5,6,10,15-tetrahidroxi-8-oxatetracíclico[8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{12,7}] ^{7 7} heptadeca-1(17),2,4,6,12,15-hexaen-14-ona
116°	-7.59	(8r,9s,13s,14s,17s)-13-metil-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahistropenas[a]fenanteno-3,4,17-triol
117°	-7.59	2-(3,4,5-trihidroxi-fenil)-3,4-di-hidro-2h-1-benzopirano-3,5,7-triol

118°	-7.59	6,7-di-hidroxi-3-(4-hidroxifenil)-4h-crom-4-ona
119°	-7.56	3-[[[(2s,3r,4r,5s)-3,4-di-hidroxi-5-(hidroximetil)oxolano-2-il]oxi]-2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-4h-crom-4-ona
120°	-7.56	4-(4-hidroxibenzoil)benzeno-1,2,3-triol
121°	-7.55	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7,8-tetra-hidroxi-4h-crom-4-ona
122°	-7.55	2-(3,4-di-hidroxibenzoil)benzeno-1,3,5-triol
123°	-7.54	7,8-di-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
124°	-7.54	1,2-di-hidroxi-9,10-di-hidroantraceno-9,10-diona
125°	-7.53	1,3,6,7-tetrahidroxi-2-[[[(2s,3r,4r,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]xanten-9-ona
126°	-7.51	(2e)-1-(2,3-di-hidroxi-4-[[[(2s,3s,4s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi]fenil]-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-en-1-ona
127°	-7.49	6,7-di-hidroxi-2-fenil-4h-crom-4-ona
128°	-7.49	(2r,3s)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
129°	-7.49	ácido rac-(2r)-2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil)propanóico
130°	-7.49	2-(3,4-di-hidroxifenilo)-5-hidroxi-7-metoxi-6-[[[(3r,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
131°	-7.47	3,4,6-trihidroxi-9,10-dioxos-9,10-di-hidroantraceno-2-sulfônico

132°	-7.47	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-[[2s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi]-4h-crom-4-ona
133°	-7.45	(2r,3s)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-3,4-dihidro-2h-1-benzopiran-4-ona
134°	-7.43	6,7-di-hidroxi-3-(4-metoxifenil)-4h-crom-4-ona
135°	-7.43	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5-hidroxi-3,7-dimetoxi-4h-crom-4-ona
136°	-7.42	1,2,7-trihidroxiantraceno-9,10-diona
137°	-7.42	2-[3,4-di-hidroxi-5-[(2s,3r,4s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]-3,5,7-trihidroxicrom-4-ona
138°	-7.42	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,4-dihidro-2h-1-benzopirano-3,4,5,7-tetrol
139°	-7.41	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-[[2s,3s,4s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-[[2s,3r,4s,5s)-3,4,5-trihidroxioxan-2-il]oxi]metil]oxan-2-il]oxi]-4h-crom-4-ona
140°	-7.41	(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)zinciobis(ilium)3,4,5-trihidroxibenzoato
141°	-7.40	8-oxatotracial[8.7.0.0 ^{2,7} .0 ^{12,7} .7 ⁷]heptadeca-2,4,6,12,14,16-hexaeno-5,10,14,15-tetrol
142°	-7.40	ácido 2-amino-3-(3,4-di-hidroxifenil)(1- ⁴ c)propanóico
143°	-7.37	4-(4-hidroxibenzoil)benzeno-1,2,3-triol
144°	-7.37	3,4,5-trihidroxi-n'-(3,4,5-trimetoxibenzoil)benzohidrazida
145°	-7.36	5-(2-fluorobenzoil)-3-nitrobenzeno-1,2-diol
146°	-7.34	Dihydrocanabiscitrin
147°	-7.33	n'-(furan-2-carbonil)-3,4,5-trihidroxibenzohidrazida

148°	-7.26	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-[[2s,3r,4r,5r,6s)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi]-4h-crom-4-ona
149°	-7.25	(2e)-3-(4-hidroxifenil)-1-(3,4,6-trihidroxi-2-[[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxiano-2-il]oxi]fenilo)prop-2-en-1-ona
150°	-7.22	2-[(3,4-di-hidroxi-5-nitrofenil)metilideno]propanodinitrilo
151°	-7.21	3-metil-5-(2,4,4-trimetilpentan-2-il)benzeno-1,2-diol
152°	-7.21	ácido 4,5-di-hidroxi-2-(3,5,7-trihidroxi-4-oxo-4h-crom-2-il)benzeno-1-sulfônico
153°	-7.21	6,6'-dimetil-[1,1'-bifenil]-3,3',4,4'-tetrol
154°	-7.20	3-[3,4-di-hidroxi-6-metoxi-2-(3-metilbut-2-en-1-il)fenil]-5,7-di-hidroxi-4h-crom-4-ona
155°	-7.19	1,2,3-trihidroxi-9,10-di-hidroantraceno-9,10-diona
156°	-7.17	[1,1'-bifenil]-3,3',4,4'-tetrol
157°	-7.14	1,4-dibromonaftaleno-2,3-diol
158°	-7.13	antraceno-1,2,10-triol
159°	-7.13	4-[(1e)-1-(benzilimino)etil]benzeno-1,2,3-triol
160°	-7.12	1,2,4-trihidroxi-9,10-di-hidroantraceno-9,10-diona
161°	-7.11	3,5,7-trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-3,4-di-hidro-2h-1-benzopiran-4-ona
161°	-7.08	ácido 8,9-di-hidroxi-2-metil-4-oxo-5h-pirano[3,2-c]cromo-10-carboxílico
163°	-7.07	4-(2,4-di-hidroxibenzoil)benzeno-1,2,3-triol

164°	-7.07	3-metil-5-(2,4,4-trimetilpentan-2-il)benzeno-1,2-diol
165°	-7.06	1-(2,3,4-trihidroxifenil)decan-1-ona
166°	-7.05	6,7,13,14-tetrahidroxi-2,9-dioxatotraccico[6.6.2.0 ⁴ , 6 ⁶ .0 ¹¹ , 5 ⁵]hexadeca-1(14),4(16),5,7,1,1(15),hexaeno-3,10-diona
167°	-6.98	5-(2-aminoetil)benzeno-1,2,4-triol
168°	-6.98	1,2,5,8-tetrahidroxi-9,10-di-hidroantraceno-9,10-diona
169°	-6.96	(2e)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enotioamida
170°	-6.93	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-[(3,4,5-trihidroxi-6-[(3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il)oxi]metil}oxan-2-il)oxi]-4h-crom-4-ona
171°	-6.93	(e)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enamida
172°	-6.91	3,4,5,6-tetrabromobenzeno-1,2-diol
173°	-6.90	1,5,6-trihidroxi-9h-xanten-9-ona
174°	-6.90	2-[(3,4,5-trihidroxifenil)metilideno]propanodinitrilo
175°	-6.90	3,5-di-terc-butilbenzeno-1,2-diol
176°	-6.79	etilo(2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enoato
177°	-6.79	[1,1'-bifenil]-3,4-diol
178°	-6.75	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-[(3,4,5-trihidroxi-6-[(3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il)oxi]metil}oxan-2-il)oxi]-4h-crom-4-ona

179°	-6.69	2-[(3,4-di-hidroxifenil)metilideno]propanodinitrilo
180°	-6.68	[1,1'-bifenil]-2,3-diol
181°	-6.59	descuil3,4,5-trihidroxibenzoato
182°	-6.59	2-metilpropilo3,4,5-trihidroxibenzoato
183°	-6.58	metilo(2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enoato
184°	-6.57	7,8-di-hidroxi-4-metil-2h-crom-2-ona
185°	-6.56	2-(3,4-di-hidroxifenil)pentanamida
186°	-6.55	4-[(1R)-1-hidroxi-2-[(propan-2-il)amino]etil]benzeno-1,2-diol
187°	-6.54	2-(3,4-di-hidroxifenil)-5,7-di-hidroxi-3-[[2s,5r,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi]-4h-crom-4-ona
188°	-6.52	hexil3,4,5-trihidroxibenzoato
189°	-6.49	nonil3,4,5-trihidroxibenzoato
190°	-6.46	3-terc-butil-6-metilbenzeno-1,2-diol
191°	-6.43	4-{1-hidroxi-2-[(propan-2-il)amino]etil}benzeno-1,2-diol
192°	-6.41	7,8-di-hidroxi-6-metoxi-2h-crom-2-ona
193°	-6.39	(2e)-3-(2,3-di-hidroxi-4-metoxifenil)prop-2-enói
194°	-6.38	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-8-[[2s,3r,4s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxicrom-4-ona

195°	-6.38	n-[2-(3,4-di-hidroxifenil)etil]acetamida
195°	-6.38	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5-di-hidroxi-6-metoksi-7-[[3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oksi-2-il]oksi]-4h-crom4-ona.
197°	-6.35	butil3,4,5-trihidroxibenzoato
198°	-6.35	7,8-di-hidroxi-2h-crom-2-ona
199°	-6.33	octil3,4,5-trihidroxibenzoato
200°	-6.31	6,7-di-hidroxi-4-metil-2h-crom-2-ona
201°	-6.29	1-(3,4-di-hidroxifenil)-2-metilpropano-1-ona
202°	-6.27	(1s,3r,4r,5r)-3-[[2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enoil]oksi]-1,4,5-trihidroxiciclohexano-1-carboxílico
203°	-6.25	tetradecil3,4,5-trihidroxibenzoato
204°	-6.25	2,3,4,6-tetrahidroxi-5h-benzo[7]anule-5-ona
205°	-6.24	1,2,3,4,5,8-hexahidroxi-9,10-di-hidroantraceno-9,10-diona
206°	-6.20	6,7-di-hidroxicrom-2-ona
207°	-6.19	5-terc-butil-3-metilbenzeno-1,2-diol
208°	-6.12	2-(3,4-di-hidroxifenil)acetamida
209°	-6.09	3-terc-butil-5-metoxibenzeno-1,2-diol
210°	-6.08	propan-2-il3,4,5-trihidroxibenzoato

211°	-6.08	3,5-dinitrobenzeno-1,2-diol
212°	-6.06	2-(3,4-di-hidroxifenil)acetonitrilo
213°	-6.05	etil3,4-di-hidroxibenzoato
214°	-6.03	4,5-di-hidroxi-2-nitrobenzaldeído
215°	-6.02	2-(3,4-di-hidroxifenil)-7-hidroxi-3,5-bis({[(3r,4s,5s,6r)-3,4,5-tri-hidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi})-4h-crom-4-ona
216°	-6.00	2,3-dibromo-4,5-di-hidroxibenzaldeído
217°	-5.99	metilo2,3-di-hidroxibenzoato
218°	-5.99	(2e)-2-ciano-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enotioamida
219°	-5.99	(2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enói
220°	-5.94	naftaleno-1,2-diol
221°	-5.90	2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-8-[(2s,3r,4s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxicrom-4-ona
222°	-5.89	4-(1,2-di-hidroxi-etil)benzeno-1,2-diol
223°	-5.89	1-(2,3-di-hidroxi-4-metoxifenil)etanona
224°	-5.88	3-terc-butil-5-metoxibenzeno-1,2-diol
225°	-5.86	3-bromo-4,5-di-hidroxibenzaldeído
226°	-5.86	4-cloroobenzeno-1,2-diol

227°	-5.84	etilo3,4,5-trihidroxibenzoato
228°	-5.83	ido3-bromo-4,5-di-hidroxibenzóico
229°	-5.83	3,4-dibromo-5-(hidroximetil)benzeno-1,2-diol
230°	-5.80	1-(3,4-di-hidroxifenil)propan-1-ona
231°	-5.79	2-(3,4-di-hidroxifenilo)etilo2-[(2s,3s,4s,4s)-3-etilideno-5-propanoil-2-[(2s,3r,4s,5s,6r)-3,4,5-trihidroxil-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi}-3,4-di-hidro-2h-piran-4-il]acetato
232°	-5.78	4-terc-butilbenzeno-1,2-diol
233°	-5.77	4,6-di-terc-butilbenzeno-1,2,3-triol
234°	-5.75	ácido 2-amino-3-(2,4,5-trihidroxifenil)propanóico
235°	-5.68	1-(2,3,4-trihidroxifenil)etanona
236°	-5.67	2,3-di-hidroxi-4-metoxibenzóico
237°	-5.66	4-(propan-2-il)benzeno-1,2-diol
238°	-5.66	ácido 3-(3,4-dimetilfenil)-2-hidrazinil-2-metilpropanóico
239°	-5.65	metilo3,4-di-hidroxibenzoato
240°	-5.62	ácido 3,4-di-hidroxibenzóico
241°	-5.58	metilo3,4,5-trihidroxibenzoato

242°	-5.54	hexadecil3,4,5-trihidroxibenzoato
243°	-5.52	3,4-di-hidroxibenzo-hidrazida
244°	-5.51	2-(3,4-di-hidroxifenil)-2-hidroxiacético
245°	-5.51	3,4-di-hidroxibenzonitrilo
246°	-5.51	3,4,5-trihidroxibenzamida
247°	-5.50	3,4,5-trihidroxibenzóico
248°	-5.46	4-metilbenzeno-1,2-diol
249°	-5.46	3,4-di-hidroisoquinolina-6,7-diol
250°	-5.45	3-(propan-2-il)benzeno-1,2-diol
251°	-5.44	2,3-di-hidroxi-4-metoxibenzaldeído
252°	-5.43	4,5-di-hidroxi-2-metilbenzóico
253°	-5.35	4-(hidroximetil)benzeno-1,2-diol
254°	-5.35	3-metoxibenzeno-1,2-diol
255°	-5.34	2,3,4-trihidroxibenzóico
256°	-5.31	4-cloro(1,2,3,4,5,6- ¹)benzeno-1,2-diol
257°	-5.29	ácido 2-[3,4-di-hidroxi(1,2,3,4,5,6- ¹)ciclohexa-1,5-dien-1-il]acético

258°	-5.28	3,4-di-hidroxibenzaldeído
259°	-5.27	6-metilbenzeno-1,2,3-triol
260°	-5.20	ácido 2,3-di-hidroxibenzóico
261°	-5.13	2,3,4-trihidroxibenzaldeído
262°	-5.09	benzeno-1,2,4-triol
263°	-5.01	2,4,5-trihidroxibenzaldeído
264°	-5.00	benzeno-1,2,3-triol
265°	-5.00	3-clorobenzeno-1,2-diol
266°	-4.99	3-metilbenzeno-1,2-diol
267°	-4.85	(1,2,3,4,5,6- ¹³ C ₆)benzeno-1,2-diol
268°	-4.84	1_2_dihydroxybenzene_1_13c
269°	-4.83	benzeno-1,2-diol
270°	-4.83	(1,2,3,4,5,6- ⁴ C ₆)benzeno-1,2-diol
271°	-4.79	3-fluorobenzeno-1,2-diol
272°	-4.44	6-[2-(3,4-di-hidroxifenil)etoxi]-5-hidroxi-2-([3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)oxan-2-il]oxi)metilo)-4-[(3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il)oxi]oxan-3-il(2e)-3-(3,4-di-hidroxifenil)prop-2-enoato

273°	-4.38	benzeno-1,2,3,4,5,2,5-hexol
------	-------	-----------------------------