



Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória
Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade
Fenotípica

Ramon Nascimento da Silva

**Efeitos do exercício físico sobre o balanço oxidativo de células linfo
mononucleares de pacientes com infecção crônica pelo vírus chikungunya**

Vitória de Santo Antão/PE

2020



Universidade Federal de Pernambuco

Centro Acadêmico de Vitória

Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade
Fenotípica



Ramon Nascimento da Silva

Efeitos do exercício físico sobre o balanço oxidativo de células linfomononucleares de pacientes com infecção crônica pelo vírus chikungunya

Dissertação apresentada a Universidade Federal de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Bases experimentais da nutrição - Nutrição

Orientadora: Dra. Mariana Pinheiro Fernandes

Coorientadora: Dra. Ana Lisa Vale Gomes

Vitória de Santo Antão/PE

2020

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4/2018

S586e Silva, Ramon Nascimento da.
Efeitos do exercício físico sobre o balanço oxidativo de células linfocitárias mononucleares de pacientes com infecção crônica pelo vírus chikungunya / Ramon Nascimento da Silva. - Vitória de Santo Antão, 2020.
98 folhas, il.: color.

Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes.

Coorientadora: Ana Lisa Vale Gomes.

Dissertação (Mestrado Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2020.

Inclui referências, apêndice e anexos.

1. Febre de Chikungunya. 2. Exercício físico. 3. Doença Crônica. 4. Estresse oxidativo. I. Fernandes, Mariana Pinheiro (Orientadora). II. Gomes, Ana Lisa Vale (Coorientadora). III. Título.

616.044CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-06/2021

RAMON NASCIMENTO DA SILVA

Efeitos do exercício físico sobre o balanço oxidativo de células linfomononucleares de pacientes com infecção crônica pelo vírus chikungunya

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.

Aprovado em: 28/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Raquel da Silva Aragão (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Claudia Jacques Lagranha (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. José Antônio dos Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha mãe
Cristiane, pelo total apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela existência, e por todas as conquistas alcançadas até aqui.

À minha mãe Cristiane Melo que abdicou de toda sua vida em prol do meu crescimento e partilhou comigo os nossos sonhos. Exercendo seu papel de mãe, pai, amiga, minha referência de amor e de me tornar quem hoje sou, te amo. Meu irmão Raul Lenilton, pelo companheirismo, amizade e por sempre estar pronto para me ajudar em qualquer situação, amo você. Minha avó Severina de Melo (*in memoriam*), pela ajuda durante os momentos da minha infância e sempre presente em nossas vidas.

À minha segunda Mãe, minha Madalena fui abençoado por Deus em ter você na minha vida, obrigado por também me tornar quem sou hoje. Tia Lanuza, minha ruiva, que me acolheu também como seu primeiro filho do coração, sou eternamente grato pelo amor de vocês.

Aos meus familiares pelo incentivo e amor, em especial a minha Tia Eliane, Tia Elisabete e Tia Edna.

À minha orientadora Dr^a. Mariana Pinheiro Fernandes, “Mari”, obrigado pela confiança e acolhimento na orientação do presente trabalho. Você é exemplo de humildade, generosidade, ética. Agradeço por toda dedicação e por transformar sonhos em realidades, nossos laços de amizade serão eternos, amo você.

À minha orientadora Dr^a. Ana Lisa, mulher de pulso forte e de uma intensidade imensurável, muito obrigado por toda partilha e ensinamento nesse processo, sem os quais este trabalho seria difícil de ser realizado, amo você.

À minha eterna professora Dr^a. Claudia Lagranha pelas inúmeras oportunidades na minha formação acadêmica e na minha vida pessoal, por me mostrar como fazer ciência de forma brilhante, você é uma das minhas fontes de inspiração, gratidão.

Ao melhor laboratório, LABMEX, pela convivência diária, trocas de saberes e inúmeras horas de experimentos, Reginaldo, Talitta, Allifer, Anderson, Rudá, Wellington, Cassia, Nilson, Will, Leticia, Dani, Flavia e Gisele, com vocês essa caminhada tornou-se mais leve, eternamente grato a vocês.

À professora Mariane Cajubá, pela disponibilidade do laboratório Tecnologia de Biomateriais e por colaborar diretamente nesse trabalho, muito obrigado. A técnica Kelly por sua ajuda e calma nos momentos do manejo das células e abertura do biorrepositório.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa e extensão Chikungunya e Exercício Físico por toda construção desse projeto, inúmeras reuniões científicas produtivas, inúmeras estratégias para fazer o melhor para nossos voluntários da pesquisa, vocês fizeram a diferença na minha vida e na vida desses indivíduos, serei eternamente grato a essa equipe.

A todos os integrantes da Unidade de Saúde da Família do bairro Redenção pelo acolhimento desse projeto, em especial as agentes comunitárias de saúde Celma e Cristina, exemplos de profissionais. Aos voluntários que disponibilizaram seu material biológico para as análises dessa pesquisa, e pela confiança depositada em todos nós durante a coleta de dados e aplicação do programa de exercício físico, obrigado pelo respeito a nossa Universidade e pela importância de vocês nas nossas vidas, espero ter contribuído de alguma forma.

A minha turma do Programa de Pós Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica; em especial Tais Helena e Ravi Marinho pelas partilhas das nossas vidas e nosso crescimento, amo vocês amigos. Aos docentes do programa pela total disponibilidade em ajudar em nossa formação.

Ao meu eterno grupo que fizeram parte da minha graduação e mesmo com o distanciamento de forma física, sempre vibram nas minhas conquistas, Ana Patrícia, Geraldo, Yuri, Alexsandra e Thaynan, vocês são demais.

A todos os meus amigos pelas palavras e atitudes, e por compreenderem os inúmeros (estou em experimento, estou preparando seminários, estou em aula, não posso sair hoje, tenho intervenção). Agradeço também aos que passaram e marcaram minha vida de alguma forma.

A Fundação de Amparo a Ciência de Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e ao Programa Pesquisa para o SUS (PPSUS) e pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

RESUMO

A febre chikungunya é uma arbovirose provocada pelo chikungunya virus (CHIKV), um alfavírus pertencente a família Togaviridae. A doença febril apresenta manifestação clínica por febre alta, mialgia, erupções cutâneas e artralgia moderada a intensa; a poliartralgia é um dos sintomas característicos dos alfavírus. As infecções por vírus geralmente estão relacionadas a um quadro de estresse oxidativo. Os mecanismos envolvidos na cronificação da doença, e formas de tratamento de ordem não farmacológica que possam ser utilizados nos indivíduos acometidos pela febre chikungunya não são encontrados na literatura. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do exercício físico sobre o balanço oxidativo de células linfocíticas mononucleares (PBMCs) em pacientes com infecção crônica pelo vírus chikungunya. Foram selecionadas 21 mulheres (40-60 anos) de uma sub-amostra do projeto Chikungunya e Exercício Físico, com diagnóstico sorológico positivo para o CHIKV submetidas ou não a um protocolo de exercício físico, com 12 sessões de treino, com duração de 40 minutos e intensidade de 50-70% da frequência cardíaca máxima, foram obtidas amostras de sangue para o isolamento de PBMCs para as seguintes análises bioquímicas: peroxidação lipídica através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), oxidação de proteínas pela dosagem de carbonilas, atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona-S-transferase (GST), além da avaliação do sistema antioxidante não enzimático pela dosagem dos níveis de glutatona reduzida (GSH), glutatona oxidada (GSSG) e estado redox celular (GSH/GSSG). Em nossos resultados, pacientes com infecção crônica pelo CHIKV, apresentou quadro de estresse oxidativo evidenciado pelo aumento significativo da peroxidação lipídica (212%, $p < 0,001$), oxidação proteica (166%, $p < 0,007$) e diminuição, sobretudo, do sistema antioxidante não enzimático, visualizado pela diminuição dos níveis de glutatona reduzida (29%, $p < 0,001$) e aumento de glutatona oxidada (8%, $p < 0,001$), além de redução do estado redox celular quando comparado ao grupo controle (GC). O modelo de programa de exercício físico proposto não apresentou alteração no estado redox celular do grupo CHIKV em relação ao grupo controle. Nossos dados mostram um quadro de estresse oxidativo em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV, o qual não foi minimizado após o protocolo de exercício físico utilizado nesse estudo.

Palavras-chaves: Arbovírus. Células imunes. Estresse oxidativo. Febre chikungunya.

ABSTRACT

Chikungunya fever is an arbovirus caused by the chikungunya virus (CHIKV), an alphavirus belonging to the *Togaviridae* family. Febrile illness has a clinical manifestation of high fever, myalgia, skin rashes and moderate to severe arthralgia; polyarthralgia is one of the characteristic symptoms of alphaviruses. Virus infections are usually related to oxidative stress. The mechanisms involved in the chronicity of the disease and forms of non-pharmacological treatment that can be used in individuals affected by chikungunya fever are still unclear. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of physical exercise on the oxidative balance of mononuclear lymphatic cells (PBMCs) in patients with chronic infection by the chikungunya virus. Twenty-one women (40-60 years old) were selected from a sub-sample of the Chikungunya and Physical Exercise project, with a positive serological diagnosis for CHIKV submitted or not to a physical exercise protocol, with 12 training sessions, lasting 40 minutes and intensity of 50-70% of the maximum cardiac frequency, blood samples were obtained for the isolation of PBMCs for the following biochemical analyzes: lipid peroxidation through the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein oxidation by the measurement of carbonyls, activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione-s-transferase (GST), in addition to the evaluation of the non-enzymatic antioxidant system by measuring the levels of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and cellular redox status (GSH / GSSG). In our results, patients with chronic CHIKV infection showed oxidative stress, evidenced by a significant increase in lipid peroxidation (212%, $p < 0.001$), protein oxidation (166%, $p < 0.007$) and a decrease, above all, in the system non-enzymatic antioxidant, visualized by decreased levels of reduced glutathione (29%, $p < 0.001$) and increased oxidized glutathione (8%, $p < 0.001$), in addition to a reduction in the cellular redox state when compared to the control group (CG). The proposed physical exercise program model showed no change in the cellular redox status of the CHIKV group compared to the control group. Our data show a picture of oxidative stress in PBMCs of patients with chronic CHIKV infection, which was not minimized after the physical exercise protocol used in this study.

Keywords: Arbovirus. Immune cells. Oxidative stress. Fever chikungunya.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo do alfavírus.....	16
Figura 2 - Estrutura do genoma do CHIKV. A. Crio-microscopia eletrônica e esquema representativo do genoma do CHIKV. B. Representação gráfica com pontos de maior acometimento nos pacientes com infecção crônica. C. Identificação das regiões do corpo com maior incidência de lesões na fase crônica da infecção pelo CHIKV.	20
Figura 3 - Esquema representativo da organela mitocôndria.....	24
Figura 4 - Modelo proposto para explicar as fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) na membrana mitocondrial interna e ação dos sistemas de defesas antioxidantes.....	27
Figura 5 - Delineamento experimental.	32
Figura 6 - Efeito do exercício físico sobre os biomarcadores de estresse oxidativo em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV.....	43
Figura 7 - Efeito do exercício físico na atividade antioxidante enzimática em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV.....	44
Figura 8 - Efeito do exercício físico no sistema antioxidante não enzimático em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP – adenosina difosfato

AINEs - antiinflamatórios não esteroides

ATP- adenosina trifosfato

BSA- albumina de soro bovino

CAT- catalase

CDNB – 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno

CHIKV – vírus chikungunya

CO₂- gás carbônico

DNA - ácido desoxirribonucleico

ERs- espécies reativas

EROs- espécies reativas de oxigênio

FBS- soro fetal bovino

FCMax – frequência cardíaca máxima

GPX- glutatona peroxidase

GSSG- glutatona oxidada

GSH- glutatona reduzida

GST- glutatona s-transferase

H₂DCF-DA – 5-(-6) -clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato

H₂O₂- peróxido de hidrogênio

KCl- cloreto de potássio

LPO- lipoperoxidação

MDA- malondialdeído

NaCl – cloreto de Sódio

O₂^{·-} - ânion radical superóxido

O₂- ânion superóxido

OH[·] – radical hidroxil

OPT – o-ftaldialdeído

PBMC - células mononucleares do sangue periférico

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoride

Pi – fosfato inorgânico

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoride

RNA- ácido ribonucleico

SFB- soro fetal bovino

SOD- superóxido dismutase

TBA- ácido tiobarbitúrico

TCA- ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Alfavírus	16
2.2 Vírus chikungunya.....	18
2.2.1 <i>Epidemiologia.....</i>	18
2.2.2 <i>Estrutura genômica do vírus</i>	19
2.2.3 <i>Doença.....</i>	21
2.2.4 <i>Diagnóstico</i>	22
2.2.5 <i>Tratamento.....</i>	23
2.3 Mitocôndrias, espécies reativas e estresse oxidativo.....	24
2.4 Estresse oxidativo e infecções virais	27
2.5 Exercício físico e estresse oxidativo	28
3 HIPÓTESE	30
4 OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo geral.....	31
4.2 Objetivos específicos	31
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5.1 Aspectos éticos	32
5.2 Delineamento experimental	32
5.3 Local de estudo e obtenção das amostras.....	33
5.4 Coleta e processamento do sangue para obtenção do plasma e de células linfomonucleares (PBMCs) do sangue	33
5.5 Ensaio imunoenzimático – ELISA	34
5.6 Programa de exercício físico e formação dos grupos experimentais.....	34
5.7 Cultura de PBMCs	35

5.8 Preparação do homogeneizado de PBMCs para utilização nas técnicas bioquímicas.....	36
5.9 Dosagem de proteína	36
5.10 Avaliação da peroxidação lipídica.....	36
5.11 Avaliação da oxidação proteica	37
5.12 Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)	37
5.13 Atividade enzimática da Catalase (CAT).....	38
5.14 Atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase (GST).....	38
5.15 Níveis de glutathione reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e estado redox celular	38
5.16 Análise estatística.....	39
6 RESULTADOS.....	40
6.1 Capítulo de livro publicado em formato Ebook Digital (Anexo C).....	40
6.3 Avaliação do exercício físico no estresse oxidativo em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV	42
6.3.1 Biomarcadores do estresse oxidativo em PBMCs.....	42
6.3.2 Atividade antioxidante enzimática em PBMCs	43
6.3.3 Atividade antioxidante não-enzimática em PBMCs.....	45
7 DISCUSSÃO	47
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL A SER SUBMETIDO NO ARQUIVES OF VIROLOGY, QUALIS B1 NA NUTRIÇÃO.....	67
ANEXO A – PARECER COMITE DE ETICA.....	80
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	81
ANEXO C - CAPÍTULO 1 IMPACTOS DA INFECÇÃO CRÔNICA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA: UMA REVISÃO.....	82

1 APRESENTAÇÃO

A febre chikungunya é uma arbovirose causada pelo vírus Chikungunya (CHIKV), um alfavírus pertencente a família *Togaviridae*, transmitido por mosquitos fêmeas do gênero *Aedes* e das espécies *aegypti* e *albopictus* (PIALOUX et al., 2007). A doença foi descrita em 1952 na Tanzânia; a palavra chikungunya é derivada do idioma Makonde, que significa "curvar-se ou o que se inclina" referindo-se a postura adotada pelos pacientes devido à poliartralgia (ROBINSON, 1955; CAREY et al., 1969).

Os indivíduos acometidos pela febre chikungunya apresentam sintomas em fases clínicas: aguda, subaguda e crônica. A manifestação clínica é caracterizada por febre alta (39°C) acompanhada de artralgia moderada a intensa, havendo persistência da artralgia em todas as fases (AN et al., 2017). A disseminação sistêmica do vírus resulta em carga viral elevada no tecido muscular, células epiteliais e endoteliais, promovendo uma resposta imune por células dendríticas, monócitos e linfócitos e produção de citocinas inflamatórias (BORGHERINI et al., 2007; NG et al., 2009; SCHILTE et al., 2010; BROECKEL et al., 2017).

Infecções por vírus geralmente são relacionadas com alteração de potencial de membrana mitocondrial, funcionalidade da mitocôndria e aumento de estresse oxidativo (RAWAT et al., 2012; CAMINI et al., 2017). O estresse oxidativo é um desequilíbrio da sinalização redox, com predomínio de agentes oxidantes em relação à capacidade dos sistemas de defesas antioxidantes (HALLIWELL, 2007; BARTERLS, 2012).

Os sistemas de defesas antioxidantes celular contra as espécies reativas (ERs) possuem componentes enzimáticos e não enzimáticos, com a finalidade de neutralizar a ação danosa que a grande quantidade de ERs pode causar. O sistema de defesa antioxidante de ordem enzimática é realizado, sobretudo, pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPX); enquanto que a defesa antioxidante não enzimática é realizada, sobretudo, pelo sistema da glutathione reduzida (GSH) e tioredoxinas, além das vitaminas E e C provenientes da dieta (HALLIWELL, 1996; BARTERLS, 2012; SUVAKOV et al., 2013)

Estudos utilizando linhagem de células de neuroblastoma infectadas com CHIKV foram observadas diminuição nos níveis das enzimas, SOD, CAT, GST e aumento do MDA que é um dos biomarcadores de estresse oxidativo (DHANWANI et al., 2011; DHANWANI et al., 2012). Aumento de peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas foram observados no plasma de pacientes com chikungunya que apresentaram poliartralgia persistente (BANERJEE; MUKHOPADHYAY, 2018).

As ERs são mediadores estabelecidos na destruição das articulações, pois degradam o fluido sinovial, resultando numa menor espessura óssea, levando a inflamação e dores nas articulações (FILIPPIN et al., 2008). Sendo a chikungunya uma infecção viral relacionada com o aumento das ERs e que eventualmente degradam o fluido sinovial, esse pode ser um dos mecanismos relacionados com a poliartralgia persistente em pacientes crônicos com chikungunya.

A prática regular do exercício físico é uma importante ferramenta na manutenção da saúde, prevenindo e/ou atenuando os efeitos decorrentes de doenças como: hipertensão, obesidade, artrose, síndrome metabólica. Apresentando melhoras do sistema locomotor, na saúde psicológica, e na qualidade de vida (ZAMAI E BANKOFF, 2010; TAKASHI et al., 2013).

Diante do exposto, merece destaque a necessidade de estudos que visem uma melhor compreensão da permanência de sintomas decorrentes da infecção durante a fase crônica, como também estudos relacionados a terapias não farmacológicas que possam ser utilizadas em pacientes com infecção crônica pelo CHIKV, uma vez que a fisiopatologia da doença é pouco conhecida. Nesse contexto, o exercício físico surge como uma estratégia que pode ser utilizado na diminuição das dores articulares e diminuição no quadro do estresse oxidativo.

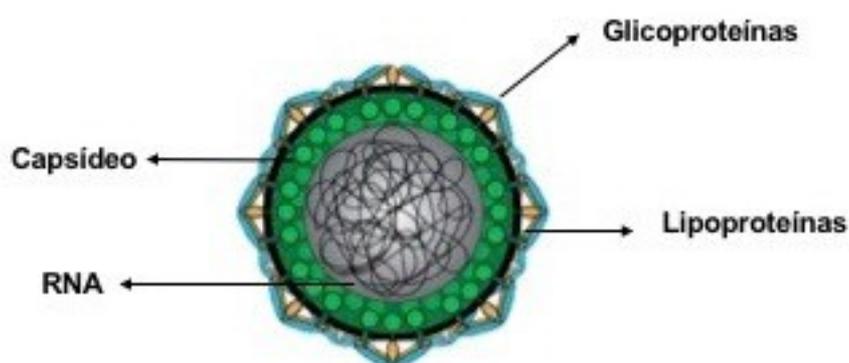
A partir da temática desse projeto, como resultados, foi publicado um capítulo de livro intitulado: Impactos da Infecção Crônica do Vírus Chikungunya: uma revisão. Esse capítulo apresentou informações acerca do vírus e a doença, com atualizações de pontos que precisam ser melhor explicados acerca da doença, prognóstico e qualidade de vida. E escrito um artigo científico original intitulado: Effects of physical exercise on the oxidative balance of lymphomononuclear cells in patients with chronic infection by Chikungunya virus, o qual será submetido a revista Archives of virology, qualis B1 na Nutrição.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alfavírus

O gênero Alfavírus é pertencente a família *Togaviridae*, compreende cerca de 30 vírus, e na sua maioria são transmitidos por artrópodes. São esféricos, de 60 a 70 nm de diâmetro, com um nucleocapsídeo envolvido em um envelope lipoprotéico e glicoproteínas, constituem um grupo de vírus que em sua maioria infectam uma gama de hospedeiros e diversos tipos celulares (**Figura 1**). Essa interação vírus/hospedeiro pode ser específica, e as vezes uma única espécie de mosquito pode ser o principal vetor sendo responsáveis por uma grande variedade de doenças em humanos e animais ao redor do mundo. (JOSE; KUHN; SNYDER 2009; WEAVER et al., 2012; BROWN et al., 2018).

Figura 1 - Esquema representativo do alfavírus.



Fonte: Adaptado de BROWN, 2018.

A infecção por alfavírus em vertebrados acontece durante o repasto sanguíneo de vetores infectados, através da inoculação de saliva contendo partículas virais durante a hematofagia. Após a inoculação viral no meio extracelular, o sítio inicial de replicação viral são as células dendríticas e de Langherans, que transportam as partículas virais aos linfonodos onde estas se disseminam via circulação sanguínea para outros órgãos e tecidos. A replicação eficiente, disseminação e imunidade determinam a intensidade da viremia e gravidade da doença (STRAUSS, STRAUSS, 1994; GRIFFIN, 2007; MUÑOZ & NAVARRO, 2012; SCHILTE et al., 2013).

De acordo com a sua origem geográfica do isolamento, os alfavírus podem ser classificados como alfavírus do novo mundo, podendo causar encefalite humana,

dentre eles, vírus da *Encefalite Equina do leste (EEEV)*, *Encefalite Equina Venezuelana (VEEV)*, *Encefalite Equina do Oeste (WEEV)*. E os alfavírus do velho mundo: *Vírus Ross river (RRV)*, *Semliki forest (SFV)*, *O’Nyong-Nyong (ONNV)* e *CHIKV*, sendo responsáveis por causar dores debilitantes no tecido musculoesquelético. A capacidade de dispersão desses vírus é preocupante uma vez que possibilitam o estabelecimento de epidemias em novas áreas do mundo, representando uma ameaça para a saúde (PIERRO et al., 2008; SYNDER et al., 2013).

A artrite é um dos sintomas mais prevalentes em infecções por alfavírus, e persistem com manifestações articulares por meses ou até anos. Essas dores envolvem e afetam as pequenas e grandes articulações (BORGHERINI, 2008; TOIVANEN, 2008). Os mecanismos pelos quais os alfavírus induzem artrite têm sido extensivamente investigados, e até o momento, há evidências que podem estar associados aos seguintes fatores: a replicação do vírus em tecidos e células alvos, incluindo macrófagos e células musculares; o recrutamento e ativação de macrófagos, células Natural Killers e linfócitos T para o sítio da infecção, aumentando os mediadores inflamatórios, algumas citocinas e quimiocinas secretadas durante a infecção por alfavírus são as mesmas que estão associadas com a progressão da artrite reumatoide (ASSUNÇÃO MIRANDA, 2013; THEILACKER et al., 2013).

Um dos recentes alfavírus introduzidos no Brasil é o CHIKV, ocasionando a febre chikungunya com forte gravidade e persistência dos sintomas, no cenário brasileiro com o crescimento populacional, urbanização descontrolada, condições climáticas favorecem a expansão do vetor, delineando dessa forma um cenário marcado pelas arboviroses. O aumento dos casos graves e ocorrência de mortalidade, reflete diretamente na maior demanda de serviços de saúde e a necessidade de recursos financeiros e humanos, no intuito de minimizar seus efeitos na sociedade (CHAVES et al., 2012; DEVAUX, 2012; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA et al., 2014; MADARIAGA et al., 2016).

2.2 Vírus chikungunya

2.2.1 Epidemiologia

A origem do CHIKV teria sido africana e introduzida na Ásia, surge pela primeira vez em 1952, numa endemia localizada no Platô Makonde de Tanganyika, no sul da Tanzânia, num surto febril e com sintomas articulares fortes. A palavra Chikungunya significa “curvar-se ou o que se inclina”, isso pela postura adotada pelos indivíduos acometidos pelas dores articulares. (ROBINSON, 1955; MARTI-CARVAJAL et al., 2017). Aproximadamente 150.000 pessoas residiam nas áreas afetadas da Tanzânia espalhadas por numerosas pequenas aldeias, grandes partes dessas aldeias eram localizadas no topo e estavam longe o suficiente das fontes de água, o que exigia o armazenamento de água doce; isso provavelmente levou a grandes populações de *Aedes aegypti* promovendo uma transmissão epidêmica, como tem sido observado em epidemias recentes (ROBINSON, 1955; CHRETIEN et al. 2007).

Estudos filogenéticos identificaram três genótipos do vírus: Oeste Africano, Sul da África Oriental e Asiática, com diferença genômica em torno de 15% e os três genótipos com registros de infecção em humanos (OKEOMA, 2016). Depois de uma época com surtos esporádicos, foi observada a reemergência do vírus onde a análise filogenética sinaliza que as cepas virais circulantes em ilhas do Oceano Índico tiveram origem no Quênia e sofreram uma separação, onde os vírus se espalharam para o Sri Lanka, Ilhas da Reunião, Cingapura e Ilhas Maldivas (HOWLEY, 2013; AN, W., 2017; DIAS, et al., 2018).

Um dos surtos mais graves foi na Ilha da Reunião, onde um terço da população (265.000 casos clínicos / uma população de 770.000) foi infectada (JOSSERAN et al., 2006; CHARREL et al., 2007; SIMON et al., 2015). Após sua introdução nas ilhas do Pacífico em 2011 (CAO LORMEAU, MUSSO, 2014), o CHIKV se espalhou rapidamente e foi finalmente importado para a América em 2013 (CASSADOU et al., 2014). A expansão global mais significativa da distribuição do CHIKV ocorreu de 2011 a 2014, quando ocorreram surtos no Pacífico ocidental, no Pacífico Sul, no Caribe e nas Américas, da Flórida ao centro do Brasil e em 2015, mais de 1 milhão de casos suspeitos foram notificados em quarenta e sete países ou territórios da América do Norte e do Sul (PAHO, 2017; WHO, 2017).

No Brasil, o primeiro caso notificado se deu em junho de 2014 e no mês de setembro foi detectado o primeiro caso no estado do Amapá. Em setembro, um surto de CHIKV ocorreu em Feira de Santana, na Bahia. Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, registraram 38.499 casos prováveis da febre chikungunya com taxa de incidência de 18,8 casos/100 habitantes, distribuídos em 704 municípios, dos quais 17.971 foram confirmados nas semanas epidemiológicas 1^a a 52^a no ano de 2015 (NUNES et al., 2015; LIMA-CAMARA, 2016; MS, 2016). Em 2019 o estado de Pernambuco, até a 52^a semana epidemiológica (30/12/18 a 28/12/19) foram notificados 8.467 casos em 150 municípios, o que corresponde a um aumento de 145,4% em relação ao mesmo período de 2018, quando foram notificados 3.450 casos.

A presença durante todo o ano de vetores relevantes, especialmente em centros urbanos densamente povoados representa um grande risco do vírus se tornar endêmico em regiões tropicais (KRAEMER et al., 2015). O controle de vírus transmitido por mosquitos é destinado a reduzir a população dos mosquitos, e os métodos utilizados são esvaziar os reservatórios de água parada, instalação de telas em portas e janelas, produtos bioquímicos para matar larvas e insetos adultos (OON, 2014; MANRIQUE et al., 2015; CARVALHO et al., 2015).

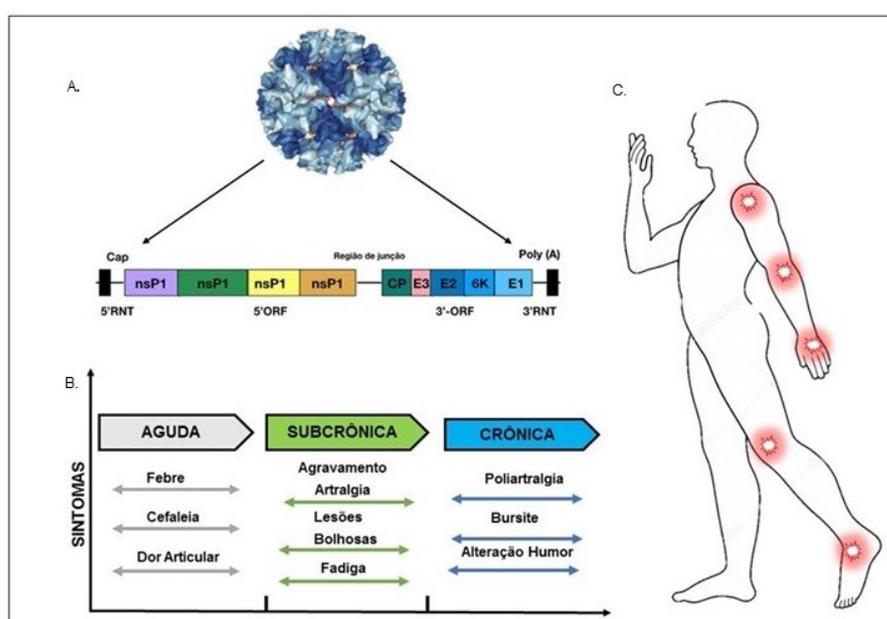
Os custos associados aos danos do CHIKV são altos e envolvem investimentos das autoridades, além de recursos de profissionais e estruturas médicas com os pacientes das diferentes fases da infecção. No entanto, a expansão do CHIKV fornece uma lição para o que virá: uma rede de vigilância global é fundamental para monitorar o movimento de patógenos zoonóticos a fim de se preparar para o próximo evento de introdução (CARDONA-OSPINA, et al. 2015; GUZZETTA, et al. 2016).

2.2.2 Estrutura genômica do vírus

CHIKV é um vírus pequeno de aproximadamente 70 nm de diâmetro, envelopado e com capsídeo formado por uma única proteína, organizado em arranjos icosaédricos com simetria. O nucleocapsídeo é protegido pelo envelope lipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira do vírus e contém as glicoproteínas E1 e E2. Sendo essas proteínas presentes em heterodímeros que são agrupados em trímeros na superfície do vírion com arranjos de 240 cópias de

capa proteínica interagindo com as 240 cópias do capsídeo. O RNA tem fita simples com polaridade positiva, de aproximadamente 11.800 nucleotídeos. Organizadas da seguinte forma, por proteínas não estruturais e de replicação: 5'NTR (nP1-nsP2-nsP3-nsP4-), e na terminação 3'NTR formada pelas proteínas estruturais (**Figura 2**) (C, E3, E2, 6K e E2) (HOWLEY et al., 2013; WEGWE et al., 2016; AN et al., 2017).

Figura 2 - Estrutura do genoma do CHIKV. A. Crio-microscopia eletrônica e esquema representativo do genoma do CHIKV. B. Representação gráfica com pontos de maior acometimento nos pacientes com infecção crônica. C. Identificação das regiões do corpo com maior incidência de lesões na fase crônica da infecção pelo CHIKV.



Fonte: A. (AS ROSE et al., 2018). B e C. (NASCIMENTO, 2019).

A interação do vírus com o receptor é mediada pela ação da glicoproteína E2 a qual reconhece o receptor e medeia uma endocitose via clatrina. Com o progresso da infecção, o endossomo se torna ácido, induzindo a dissociação do heterodímero E2-E1 e uma alteração de conformação da proteína de fusão da membrana E1, permitindo que a membrana da célula hospedeira e o envelope do vírus se fundam, seguido pela liberação de nucleocapsídeo virais no citoplasma (BERNARD et al., 2010; NASSAR *et al.*, 2012; VANEY *et al.*, 2013; WEBER et al., 2017).

2.2.3 Doença

Após a infecção do CHIKV, aproximadamente 70% dos indivíduos apresentam infecção sintomática. Em pacientes sintomáticos, o período médio de incubação é de 3 dias, variando de 1 a 12 dias. Na sua apresentação comum, a febre chikungunya é uma doença febril alta, com artralgia inflamatória, mialgia, dor de cabeça e erupção cutânea. A característica principal da doença é a dor articular, principalmente poli articular (BURT et al., 2012; LUM, LISA, 2015). Os indivíduos infectados podem experimentar pelo menos uma das três fases da doença após a infecção pelo CHIKV: estágio agudo, estágio sub-crônico e estágio crônico (SIMON et al., 2015).

A fase aguda é o período correspondente as 3 primeiras semanas após a inoculação do vírus. Os sintomas da fase aguda têm duração de aproximadamente 14 dias, os mais comuns são febre alta e de difícil controle farmacológico, artralgia inflamatória e artrite seguida de fortes dores e inchaço afetando principalmente as articulações interfalângicas, pulsos e tornozelos, com baixa responsividade a analgésicos (AN et al. 2017; SIMON 2015). A febre geralmente é alta e incontrolável pelos antipiréticos. As articulações periféricas, especialmente articulações interfalângicas, pulsos e tornozelos, geralmente são muito dolorosas e inchadas, sangramentos gengivais podem ocorrer em crianças, mas incomuns em adultos; algumas apresentações e complicações atípicas podem ocorrer durante a fase aguda, incluindo sintomas gastrintestinais, sintomas neurológicos, danos às membranas mucosas, mal-estar e doenças mais graves, como rabdomiólise. Outras complicações incomuns, mas graves, incluindo descompensação de doenças cardiovasculares, falhas respiratórias, insuficiência renal, extensa epidermólise, pancreatite e distúrbios endócrinos agudos também foram relatadas (BORGHERINI et al., 2008; RENAULT et al., 2008; SIMON et al., 2011). Apesar da maioria dos pacientes experimentarem melhora clínica significativa dentro de 1 a 2 semanas, eles frequentemente experimentam recaída (SIMON et al., 2011).

Na fase subaguda, os sintomas se manifestam entre o 15° ao 90° dia, é caracterizada principalmente por dor articular persistente em aproximadamente 60% dos pacientes, a maior incidência é observada após os 40 anos de idade e em pacientes do sexo feminino, podendo ser observado permanência da artrite e a propagação da inflamação para estruturas adjacentes a articulação como tendões e ligamentos, assim como distúrbios vasculares periféricos, depressão, neuropatia e

distúrbios neuropsiquiátricos. A permanência e associação dos sintomas está relacionada a falta de repouso no estado agudo e/ou comodidades musculoesqueléticas prévias (MARTI-CARVAJAL et al., 2017; AN et al. 2017; SIMON, 2015). A abordagem diagnóstica consiste em qualificar a nosologia de cada paciente de acordo com a presença ou ausência de sintomas inflamatórios (artrite, entesite, tenossinovite) e o número de articulações envolvidas (poliarticular se ≥ 4 articulações) (SIMON et al., 2011).

A fase crônica pode durar de alguns meses a vários anos. A prevalência dessa fase é muito variável entre os estudos, podendo atingir mais da metade dos pacientes. Os principais fatores de risco para a cronificação são: idade acima de 45 anos, significativamente maior no sexo feminino, desordem articular preexistente e maior intensidade das lesões articulares na fase aguda. Os sintomas clínicos observados são os mesmos que no estágio pós-agudo, e o acometimento articular são os mesmos atingidos na fase aguda, caracterizado por dor com ou sem edema, limitação de movimento, deformidade e ausência de eritema. A qualidade de vida prejudicada foi relatada pela maioria dos pacientes crônicos, ao longo dos anos, após a infecção pelo CHIKV. A proporção de pacientes com chikungunya que se recuperaram totalmente, parcialmente, que melhoraram ou tiveram sintomas persistentes varia entre a literatura, de acordo com o tempo de avaliação do estudo desde o início da doença. (BORGHERINI et al., 2008; BOUQUILLARD, COMBE, 2009; BURT et al., 2012; GÉRARDIN et al., 2013; MS, 2016).

2.2.4 Diagnóstico

Nos primeiros 5-7 dias da infecção, detecções de ácido nucleico do CHIKV são mais amplamente utilizadas no diagnóstico precoce devido à sua sensibilidade e rapidez. Técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase transcricional (RT-PCR) e/ou em tempo real (RT-PCR), ensaio de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) usando *primers* específicos para genes estruturais e não estruturais são ferramentas úteis no diagnóstico rápido do CHIKV (MARTIN et al., 2008; SÁNCHEZ et al., 2009). Um método alternativo que rastreia o vírus no espécime, é a detecção de antígenos virais utilizando as técnicas de ELISA cuja janela de detecção se estende alguns dias após a viremia (PFEFFER et al., 2002; AN et al., 2017).

Nesse período, o diagnóstico do CHIKV também pode ser feito pela detecção de anticorpos para imunoglobulinas IgM e imunoglobulinas IgG anti-CHIKV. A IgM é detectável em 5-7 dias após o início da doença e permanece elevada por semanas a meses. A IgG pode ser detectada em aproximadamente 7 a 10 dias após o início da doença, geralmente após o desaparecimento da viremia, e permanece detectável por meses a anos (JOHNSON et al., 2016; SILVA, DERMODY, 2017).

Exames específicos moleculares e testes sorológicos são realizados rotineiramente nos períodos entre epidemias, a fim de detectar os primeiros casos e identificar o início de uma epidemia. No entanto, uma vez identificada uma epidemia pelo CHIKV, nem todos os pacientes são submetidos a uma confirmação laboratorial. Nesse contexto, a investigação laboratorial é reservada para pacientes com sinais alarmantes, grupos de riscos (gestantes, pacientes imunossuprimidos, por exemplo), casos graves, aqueles com manifestações atípicas, ou em casos de difícil diagnóstico diferencial. O diagnóstico pode ser confirmado com base em critérios clínico-epidemiológicos (BRITO et al., 2016).

2.2.5 Tratamento

As terapias mais utilizadas são os usos de analgésicos, antipiréticos e agentes antiinflamatórios, que destinam a aliviar os sintomas associados à doença. O tratamento com alguns agentes antivirais comuns é utilizado contra o vírus como, ribavirina (RBV), o favipiravir (FAV) e o interferon-alfa IFN- α), porém, estes contemplam atividade de amplo espectro contra uma variedade de vírus, necessitando de mais testes em modelos animais e humanos para se chegar ao avanço clínico dessas drogas (THIBERVILLE *et al.*, 2013; SILVA, 2017; FRANCO, *et al.* 2018).

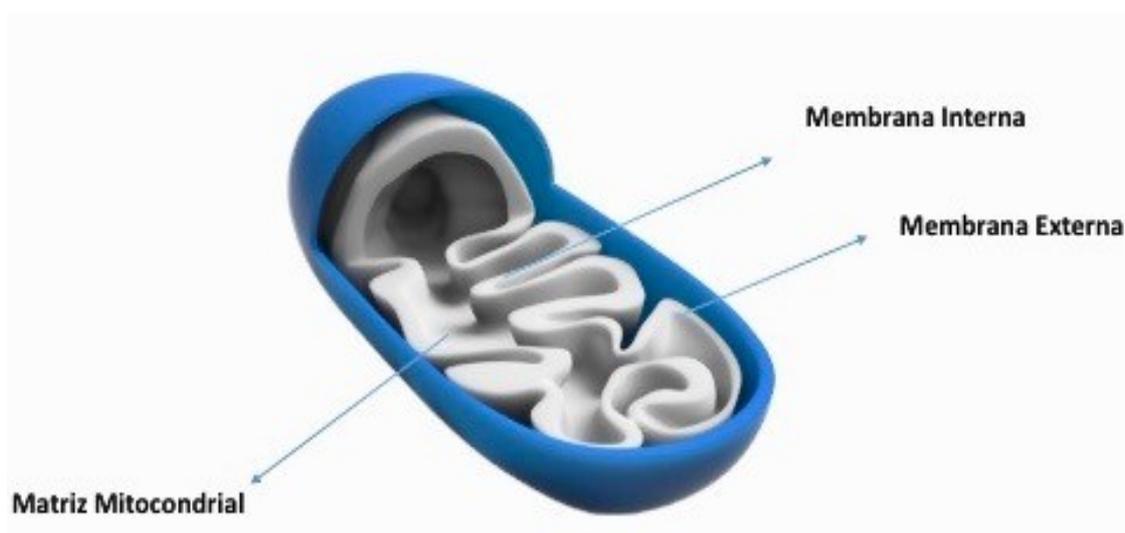
Existem alguns tipos de vacinas e antivirais envolvendo tecnologias que previnam ou tratem a infecção por CHIKV, sabe-se que as terapias com vacinas se encontram num estágio de sucesso limitado, na tentativa de combater o mecanismo de ação deste vírus (ROTHAN et al., 2015; SILVA, 2017; FRANCO et al., 2018). A vacina de vírus inativado é considerada altamente segura, mas o processo de inativação pode alterar os epítomos do vírus, resultando na alteração da imunogenicidade (DEZURE et al., 2016; ERASMUS et al., 2016).

Vários estudos mostram ensaios com vacinas no foco de reduzir a expressão de genes da proteína do CHIKV ou até mesmo neutralizar os genótipos envolvidos na replicação do vírus (ROY, et al., 2014; GOO, et al., 2016). As imunizações precisam realizar uma proteção contra todos os genótipos do CHIKV, pois se realizada a imunidade para apenas um tipo de cepa viral, a doença pode se tornar cada vez mais grave e resistente a tratamentos, requerendo sempre um adjuvante para auxiliar no combate ao vírus (SCHWAMEIS, 2015).

2.3 Mitocôndrias, espécies reativas e estresse oxidativo

As mitocôndrias são organelas citoplasmáticas que estão presentes em muitas células eucarióticas, possuem uma forma cilíndrica e alongada (**Figura 3**), além de sua função primordial na síntese de adenosina trifosfato (ATP), desempenham importante função na homeostase metabólica, biossíntese de aminoácidos, produção e detoxificação de espécies reativas de oxigênio (EROs), produção de calor e contribuição genética a partir do DNA mitocondrial (DNAm) e na morte celular por apoptose (ALBERTS et al., 2004; NICHOLLS, 2009; SHAUGHNESSY et al., 2014).

Figura 3 - Esquema representativo da organela mitocôndria.



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox 2011

<https://freelancers3d.com/en/portfolio/5686/mitochondria>

Danos às mitocôndrias podem ter consequências generalizadas, mecanismos subjacentes a estados de doença têm se concentrado predominantemente no dano ao DNA e na geração de ERs. A disfunção mitocondrial pode ser de origem primária (inerente) ou secundária (disfunção adquirida) (COHEN; GOLD, 2001; PIECZENIK, NEUSTADT, 2007; NUNNARI; SUOMALAINEN, 2012).

As ERs podem ser definidas como moléculas que apresentam ou não elétrons desemparelhados na sua camada orbital externa. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos de metabólitos parcialmente reduzidos de oxigênio, que possuem capacidade oxidante nas células. Em concentrações fisiológicas, as EROs funcionam como moléculas sinalizadoras que regulam o crescimento celular, a adesão celular, diferenciação e apoptose. Em altas concentrações podem ser deletérias para as células, causando danos em lipídeos, proteínas e no próprio DNA (HALLIWEL et al., 1991; TURRENS, 2003; SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

Existem algumas EROs que são consideradas biologicamente relevantes e amplamente estudadas, dentre elas, o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $O_2^{\bullet -}$ é considerada a ERO “primária” e pode interagir com outras moléculas para gerar ERO “secundária”. O $O_2^{\bullet -}$ é rapidamente dismutado a H_2O_2 pela superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é um produto secundário da dismutação da SOD, na presença de ferro, o H_2O_2 é convertido no OH^{\bullet} , que possui um tempo de meia vida curto, mas é altamente reativo. Essa geração de OH^{\bullet} é realizada pelas reações de Fenton e de Haber-Weiss: (1) Reação de Fenton: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$, (2) Reação de Haber-Weiss: $O_2^{\bullet -} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{\bullet} + OH^-$ (LAMBETH, 2004; VALKO et al., 2005; HALLIWELL, 2012; HANDY, LOSCALZO, 2012). Nas mitocôndrias, as principais fontes de EROs ocorrem nos complexos I e III da CTE, onde do total de O_2 mitocondrial consumido, cerca de 1% a 2% é desviado para a formação de EROs, e este desvio, acredita-se, ser tecido e espécies dependentes (STOWE, 2009).

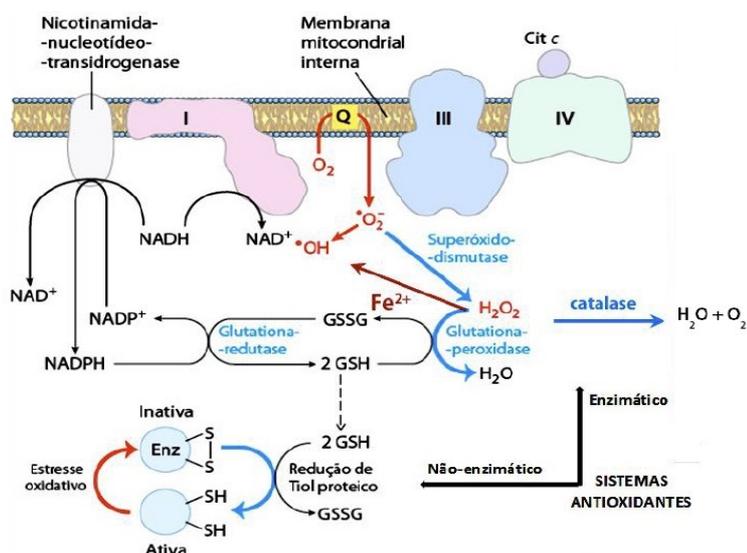
No combate à produção elevada de EROs, existem sistemas de defesas antioxidantes complexos, compostos por várias enzimas antioxidantes (**Figura 5**), além de compostos endógenos ou não, que constituem o sistema antioxidante não enzimático, necessários para manter os níveis fisiológicos de agentes oxidantes e dessa forma evitar os efeitos prejudiciais dos mesmos a órgãos e tecidos. A eficácia dos sistemas antioxidantes depende da molécula, localização e velocidade de reação, e mesmo em condições fisiológicas, tais sistemas não são totalmente

capazes de prevenir a formação de EROs (RATNAM et al., 2006; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O sistema de defesa antioxidante se divide em enzimático e não enzimático. Entre os antioxidantes não enzimáticos, a grande maioria deles são obtidos da dieta, e incluem as vitaminas C, E (α -tocoferol), carotenoides, compostos organosulfurados, minerais e cofatores, além das glutations, que desempenham um papel importante na manutenção da saúde humana (RATNAM et al., 2006). Entre as principais enzimas antioxidantes estão a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona peroxidase (GPx) e Glutaciona-s-transferase (GST). A SOD é uma metaloenzima que protege os alvos do ataque do ânion radical superóxido em até 97%, elas são a primeira e mais importante linha do sistema de defesa enzimático. A catalase, promove a decomposição do H_2O_2 a H_2O e O_2 . Baixos níveis da expressão da CAT está correlacionada como o aumento do H_2O_2 . O sistema que também converte o H_2O_2 a H_2O e O_2 é a GPx. O sistema das glutations, constitui um sistema de defesa endógeno muito importante que tem sido implicado na modulação imune e em respostas inflamatórias, além disso, a glutaciona se apresenta, em mais de 98% do seu total, como Glutaciona reduzida (GSH) e o restante na forma de Glutaciona oxidada (GSSG).

A GSH é convertida a GSSG pela GPx, e é revertido para a forma reduzida pela Glutaciona redutase (GR). A razão GSH/GSSG é utilizada para estimar o estado REDOX (MEISTER; ANDERSON, 1983; MITTLER, 2002; RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006; HANDY, 2012). A GS-T são enzimas desintoxicantes, envolvidas na manutenção da integridade celular, estresse oxidativo e proteção contra danos no DNA, catalisando a conjugação da glutaciona a uma ampla variedade de substratos (CHATTERJE, GUPTA, 2018).

Figura 4 - Modelo proposto para explicar as fontes de espécies reativas de oxigênio (EROs) na membrana mitocondrial interna e ação dos sistemas de defesas antioxidantes.



Fonte: Adaptado de NELSON e COX (2014)

2.4 Estresse oxidativo e infecções virais

As infecções causadas por vírus resultam em alterações da fisiologia e das funções celulares, estabelecendo um ambiente propício a proliferação viral (PETERHANS, 1997). Modificações do estado REDOX estão relacionadas com o progresso da infecção, as EROs são formadas a fim de conter a multiplicação viral, aumentando o quadro do estresse oxidativo e seus efeitos tóxicos para o hospedeiro. Alterações do estado REDOX já foram observadas em diversos agentes etiológicos virais, como vírus influenza, vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), dengue vírus (DENV), vírus Rift Valley (RVFV), sindbis vírus (SINV) e vírus chikungunya (CHIKV) (HUANG et al., 2010; PAL et al., 2010; HOSAKOTE et al., 2011; DHANWANI et al., 2011; JOUBERT et al., 2012; WANG et al., 2013; CLAUS et al., 2013).

Em casos humanos de infecção pelo DENV, estudos apontam alterações nos marcadores do dano oxidativo durante as fases da infecção, que contribuem para a patogênese da doença e podendo funcionar como marcadores da evolução da doença (GIL et al., 2004; KLASSEN et al., 2004; SEET et al., 2009).

Em linhagens de células de hepatócitos humanos (HepG2) infectadas por alfavírus foi observado um aumento da peroxidação lipídica e oxidação de proteínas,

indicando um dano oxidativo (CAMINI et al., 2017). Alterações na atividade da CAT, vias apoptóticas e inflamatórias foram observadas em camundongos recém-nascidos infectados com o CHIKV (DHANWANI et al., 2011).

Aumento da produção de EROs em células de fibroblastos embrionários de camundongos infectadas pelo CHIKV, também que essas espécies reativas estão envolvidas na regulação da autofagia e apoptose induzidos pelo vírus. O CHIKV também resulta em uma maior presença intracelular de EROS e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (JOUBERT et al., 2012; WILLIAMS et al., 2014).

2.5 Exercício físico e estresse oxidativo

O exercício físico é uma subdivisão da atividade física, sendo planejado de forma estruturada e repetitiva, tem como principal objetivo gerar alterações no metabolismo que levam a ativação de mecanismos de adaptação no organismo, afim de promover efeitos benéficos específicos no corpo humano (CASPERSEN et al., 1985).

Dentre as adaptações geradas pelo exercício físico, pode-se destacar mudanças na função imune e capacidade redox, que a depender da intensidade do exercício pode ser gerada uma resposta positiva ou negativa. De acordo com a literatura, exercícios praticados com intensidade moderada tende a causar melhora na função imune, quando comparado com nível sedentário ou exercícios excessivos e de alta intensidade (GLEESON, 2007; MAGHERINI *et al.*, 2019).

Existe um consenso na literatura no qual o exercício físico é tido como um estressor, que quando praticado de forma regular pode gerar benefícios como a longevidade (TAKASHI et al., 2013). Além disso está ligado a produção de EROs, uma vez que o fluxo de oxigênio tende a aumentar durante o esforço. No entanto, o exercício também está ligado a diminuição do estresse oxidativo, uma vez que a produção de EROs pode gerar adaptações relacionadas à ativação do sistema antioxidante e interferência no sistema de reparo de dano celular (RADAK; CHUNG; GOTO, 2008).

Sessões agudas de exercício intenso tendem a gerar danos oxidativos, mas em resposta ao treinamento, o organismo responde diferente as sessões agudas de exercício, de forma a não produzir grandes danos oxidativo (RADAK et al., 2013)

Wadley e colaboradores (2015) demonstraram que em PBMCs de homens sedentários submetidos a três diferentes sessões curtas de exercício (60%, 80% e

90% do VO_{2max}), há aumento da ativação do NF- κ B em todas as intensidades e concomitantemente a isso, os autores mostraram uma redução da atividade antioxidante da tioredoxina no exercício moderado em relação ao de alta intensidade, acompanhado de um aumento da expressão dessa enzima (WADLEY et al., 2015).

3 HIPÓTESE

A infecção crônica pelo vírus chikungunya induz estresse oxidativo em células linfo mononucleares e o exercício físico modula positivamente o balanço oxidativo celular desses pacientes.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do exercício físico sobre o balanço oxidativo de células linfo mononucleares de pacientes com infecção crônica pelo vírus chikungunya.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar em células linfo mononucleares de pacientes com infecção crônica pelo vírus chikungunya:

- Biomarcadores de estresse oxidativo (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e conteúdo de carbonilas);
- Atividade do sistema antioxidante enzimático (superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT e glutathione-S-transferase-GST);
- Sistema antioxidante não enzimático (níveis de glutathione reduzida-GSH, oxidada-GSSG e estado redox celular, obtido pela razão GSH/GSSG).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O projeto foi submetido a avaliação e aprovado pelo comitê de ética em humanos da UFPE (2.459.058) C.A.A.E nº 72123817.4.0000.5208, sendo conduzido seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos definidas pela resolução 466/12 (**ANEXO A**). Aos indivíduos foi apresentado o Termo de Livre Consentimento Esclarecido (TCLE) (**ANEXO B**).

5.2 Delineamento experimental

O projeto chikungunya foi realizado no bairro Redenção, localizado no município de Vitória de Santo Antão - PE, após a apresentação do TCLE foi realizado a coleta de sangue, com separação do plasma para realização do ensaio imunoenzimático e isolamento de PBMCs para realização das análises bioquímicas no pré-exercício e pós exercício.

Figura 5 - Delineamento experimental.



Fonte: NASCIMENTO, 2020.

5.3 Local de estudo e obtenção das amostras

O estudo foi realizado no LABMEX - Laboratório de Bioquímica Geral, Molecular e Exercício do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco.

A amostra (N=21) foi composta de indivíduos do sexo feminino, com idade no intervalo de 40-60 anos de idade residentes do município de Vitória de Santo Antão localizado na Zona da Mata Sul do estado de Pernambuco e a 55 km da capital, Recife.

O critério de inclusão para esse estudo foi ser do município de Vitória de Santo Antão, e residente no bairro de Redenção, com resultado imunológico positivo para infecção pelo CHIKV e que apresentassem sintomatologia articular, pós-infecção. A escolha desse bairro deu-se através de análise dos dados do Levantamento de Índice Rápido para o *Aedes aegypti* (LIRAA) do ano de 2015-16 do município, que segundo a vigilância epidemiológica e ambiental da Secretaria de Saúde do município, considerou Redenção como região crítica e de alto risco de transmissão do CHIKV e outras arboviroses tropicais devido a alta presença de vetores e criadores. Com a orientação das Agentes Comunitárias de Saúde foi realizada busca ativa dos pacientes.

5.4 Coleta e processamento do sangue para obtenção do plasma e de células linfo monucleares (PBMCs) do sangue

Foram coletadas amostras de sangue de cada paciente através da punção de veia em dois tubos (9 mL) com vácuo, em tubo de coleta (BD Vacutainer® Plus com Heparina de Sódio) com posterior separação do plasma. Para separação do sangue e do plasma, as amostras foram centrifugadas à 200 g, por 10 min. Após a separação, as alíquotas de plasma foram armazenadas em biorrepositório (freezer - 80°C).

O sangue obtido foi transferido para dois tubos falcon de 15 mL, contendo 6 mL de sangue e 4mL de Histopaque para a obtenção da camada de PBMCs. O isolamento dessas células foi feito por separação de gradiente de densidade (BOYUM, 1968), realizado pelo manual (Histopaque-Sigma) de acordo com o

seguinte procedimento: O sangue foi centrifugado a 400g, por 30 min a 23⁰C, após formação da camada de PBMCs a mesma foi aspirada por micropipeta para um novo tubo falcon (15mL) contendo 3mL de meio RPMI-1640 (Sigma). Após a separação por densidade das PBMCs, as células foram lavadas duas vezes em meio RPMI-1640 (Sigma), 200 g, por 10 min a 23⁰C. Em seguida, as PBMCs foram ressuspensas em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibiótico 1%.

5.5 Ensaio imunoenzimático – ELISA

Todas as amostras de soro foram submetidas a pesquisa de anticorpos classe IgG, específicos para o CHIKV, por ELISA. Em todas as amostras foi utilizado o Kit Antivírus Chikungunya Elisa IgG da *Euroimmun*® (Lübeck, Alemanha), seguindo orientações do fabricante. Foi adicionado 100µL de amostras de plasma diluídas em tampão de amostra nos poços da microplaca, revestidos com antígeno recombinante específico CHIKV. Para validação da reação foram utilizados controles positivo e negativo, bem como um calibrador, fornecidos pelo kit. A medição fotométrica da intensidade da cor foi feita em espectrofotômetro (TP READER NM) num comprimento de onda de 450nm após a adição da solução de parada. A obtenção do resultado semiquantitativo foi avaliado através do cálculo do valor de extinção do controle ou da amostra do paciente pelo valor de extinção do valor de calibrador de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Extinção do controle ou amostra do paciente}}{\text{Extinção do calibrador 2}} = \text{Razão}$$

Os resultados foram interpretados de acordo com a seguinte razão: Razão <0,8= **negativo**; Razão ≥ 0,8 a > 1,1= **boderline**; Razão ≥ 1,1 = **positivo**

5.6 Programa de exercício físico e formação do grupos experimentais

Após a confirmação do IgG positivo para o CHIKV, as voluntárias foram convidadas a participarem do programa de exercício físico. Os indivíduos que aceitaram participar do programa foram submetidos a uma anamnese e avaliação física no Centro Acadêmico de Vitória - UFPE para obtenção de informações para as seguintes análises: qualidade de vida do sujeito (SF-36), inventário resumido da dor

(Brief Pain Inventory), nível de atividade física (IPAQ), composição corporal (JACKSON; POLOCK, 1978), força (BETCHOL, 1954), flexibilidade (ARAÚJO, 2004) e volume de oxigênio máximo (VO_2Max) (COOPER, 1968). Como critério de inclusão do programa de exercício físico, as voluntárias não poderiam apresentar diagnóstico prévio de doença com comprometimento articular crônico e estar fora da faixa etária do estudo.

A partir do resultado das avaliações, as voluntárias foram subdivididas no grupo Controle: não participaram do programa de exercício (GC); grupo Chikungunya: não participaram do programa de exercício (GCHIKV) e Grupo Chikungunya+EF: participaram do programa de exercício (GCHIKV+EF).

O programa de exercício físico foi elaborado segundo as recomendações do Colégio Americano de Medicina do Esporte (ACSM) e pela Sociedade Brasileira de Reumatologia (SBR), uma vez que não existe na literatura um programa de exercício físico para pacientes acometidos por arboviroses e que apresentem dor articular crônica.

As intervenções ocorreram na associação dos comunitários do bairro de Redenção, Vitória de Santo Antão – PE e foram realizadas com frequência semanal de três vezes na semana, com duração de 40 minutos por sessão, e intensidade de 50-70% da frequência cardíaca máxima (FCMax). A duração do programa foi de 4 semanas, com 12 sessões de treino total; o programa proposto teve predominância da via metabólica aeróbia. As atividades foram realizadas através de um circuito com exercícios de mobilidade articular, exercícios de resistência para grandes grupos musculares e caminhada. Em todas as sessões, a intensidade do exercício físico foi monitorada através da frequência cardíaca (FC) e pela percepção subjetiva do esforço (PSE), além da avaliação da pressão arterial realizada pré e pós exercício físico.

5.7 Cultura de PBMCs

As PBMCs foram cultivadas em frascos de cultivo contendo meio RPMI-1640, SFB 10% e 1% de solução com antibiótico/antimicótico. Todas as culturas cresceram por 72 horas, a 37°C, sob 5% de CO_2 em condições de umidade. Após a cultura, as células e os sobrenadantes foram centrifugados a 200 g, por 5 min a 23 °C. As células foram avaliadas quanto a viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul de Trypan. Este método é baseado no princípio de que as células vivas

(viáveis) não são coradas, enquanto que, as células inviáveis são coradas. Para quantificação das mesmas, 10 μ L de células foram adicionadas em 90 μ L de Azul de Trypan, e contadas em câmara de Neubauer (CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 2001). Os experimentos foram feitos considerando um percentual de viabilidade celular acima de 90%.

5.8 Preparação do homogeneizado de PBMCs para utilização nas técnicas bioquímicas

As PBMCs foram homogeneizadas em tampão de extração (Tris Base 50mM, pH 7,4; com adição de ortovanadato de sódio 1 mM, PMSF 2mM e Nonidet 1mM), e rompidas por processador ultrassônico (Bandelin SonoPuls, Berlim) durante 1 min, com 55% de potência, ininterruptos no gelo. Após a sonicação, as células foram centrifugadas a 15.000g, durante 15 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi submetido a dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

5.9 Dosagem de proteína

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de BRADFORD (BRADFORD, 1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo proteína-corante. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA (2mg/mL) foi utilizada como padrão. A leitura da absorbância a 595nm foi realizada em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA).

5.10 Avaliação da peroxidação lipídica

Para a dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizada a técnica colorimétrica de BUEGE e AUST (1978), que é comumente utilizada para avaliar a lipoperoxidação (LPO), onde o ácido tiobarbitúrico reage com os produtos da LPO, entre eles o malondialdeído e outros aldeídos.

Foram adicionados 300 μ g de proteína do homogenato de PBMCs à 200 μ L de ácido tricloroacético (TCA) a 30% e agitado por 1 min. Um volume de 200 μ L de TRIS - HCl 10 mM, pH 7,4, foi adicionado ao material, agitado por 1 min e então centrifugado a 1180 g durante, 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante coletado (450 μ L)

foi misturado ao ácido tiobarbitúrico a 0,73% (450 μ L). A mistura foi incubada por 15 min, a 100°C e em seguida resfriada; posteriormente foi realizada a leitura da absorbância a 535nm, em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em μ M/mg de proteína.

5.11 Avaliação da oxidação proteica

A avaliação da oxidação de proteínas ocorre através da reação com o composto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) descrito por ZANATTA (ZANATTA et al., 2013). As proteínas foram precipitadas em TCA a 30%, seguido de centrifugação a 1180g, por 15 minutos, em seguida, o pellet foi ressuspenso e adicionado DNPH 10mM dissolvido em HCl 2.5 N e incubado em local livre de luz a temperatura ambiente, durante 1 hora.

Posteriormente, as proteínas precipitadas em adição ao TCA 20% foram centrifugadas e passaram por uma série de lavagens com tampão contendo acetato de etila e etanol, até o precipitado ser ressuspenso em cloridrato de guanidina e lavado. A leitura deu-se por comprimento de onda de 370nm em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em μ M/mg de proteína.

5.12 Atividade enzimática da Superóxido Dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD foi feita de acordo com Misra e Fridovich (1972). Este método avalia a atividade da superóxido dismutase através do método de oxidação da adrenalina, o qual compete com a SOD podendo ser medido em espectrofotômetro. Em uma cubeta de quartzo de 1mL, adicionou-se tampão fosfato 0,05M (pH 10,2), PBMCs (300 μ g de proteína) e adrenalina 150mM.

A absorbância foi lida a 480 nm por um período de aproximadamente 3 minutos, a 37 °C, em espectrofotômetro (Biochrom Libra S12 Visible, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de SOD será definida como a quantidade de proteína requerida para inibir a auto-oxidação de 1 μ mol de epinefrina por minuto.

5.13 Atividade enzimática da Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada através da taxa proporcional de decomposição do peróxido de hidrogênio (AEBI, 1984). Em uma cubeta de quartzo de 1mL, adicionou-se tampão fosfato a 50 mM, pH 7,0, a 37°C, PBMCs (150 µg de proteína) e uma solução de H₂O₂ a 0,3M. A absorbância foi lida a 240 nm em espectrofotômetro (Espectrofotômetro digital UV- China). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de proteína requerida para converter 1µmol de H₂O₂ em H₂O por minuto.

5.14 Atividade enzimática da Glutathione-S-Transferase (GST)

A atividade da GST é diretamente proporcional a taxa de formação do composto DNP-SG (2,4-dinitro-fenil-S-glutathione), podendo desta forma ser medida através do monitoramento da taxa de formação do composto, como descrito por HABIG & JAKOBY (1974). O ensaio foi realizado com tampão fosfato de potássio (pH=6,5), PBMCs (150 µg), GSH (60 mM) e CDNB (30 mM).

A enzima foi avaliada a partir da formação de DNP-SG por minuto a 25°C, o qual foi monitorado via espectrofotômetro (Espectrofotômetro digital UV- China) em comprimento de onda igual a 340nm. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de atividade enzimática da GST foi definida como a quantidade necessária para catalisar a formação de 1mmol do composto DNP-SG por minuto.

5.15 Níveis de glutathione reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e estado redox celular

Para avaliar os níveis de GSH, as PBMCs (300 µg de proteína) foram primeiramente diluídas em tampão fosfato 0,1 M contendo EDTA 5 mM, pH 8,0. Em seguida, uma alíquota da amostra diluída foi incubada com o-Phthallialdeído (OPT) à temperatura ambiente (TA), durante 15 min.

As intensidades de fluorescência foram medidas a excitação de 350 nm e comprimentos de onda de emissão de 420 nm em um espectrofluorímetro (FLUOstar Omega - BMG Labtech, EUA), e comparadas com uma curva padrão de concentrações conhecidas de GSH (0,25-10 nM) também incubadas com OPT. Para determinar os níveis de GSSG, as PBMCs (300 µg de proteína) foram incubadas com N-etilmaleimida 0,04 M, durante 30 min em TA, seguido pela adição de tampão

NaOH 0,1 M. Após preparação dessa mistura, os mesmos passos do ensaio GSH foram seguidos para determinar os níveis de GSSG. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína. O estado redox celular foi determinado pela razão de GSH/GSSG como previamente descrito por Hissin e Hilf (1976) (HISSIN; HILF, 1976).

5.16 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) e expressos com média \pm erro padrão, os dados foram considerados com quando $p \leq 0,05$. O teste Anova One Way com 95% de confiança, seguido pelo pós teste de TUKEY, foi utilizado para avaliar a diferença entre o grupo infectado pelo vírus chikungunya e seu respectivo controle.

6 RESULTADOS

6.1 Capítulo de livro publicado em formato Ebook Digital (Anexo C)

IMPACTOS DA INFECÇÃO CRÔNICA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA: UMA
REVISÃO
CAPÍTULO 42

**IMPACTOS DA INFECÇÃO CRÔNICA DO
VÍRUS CHIKUNGUNYA: UMA REVISÃO**

Ramon Nascimento da SILVA ¹
Talitta Ricarly Lopes de Arruda LIMA ²
Allifer Rosendo PEREIRA ³
Mariana Pinheiro FERNANDES ^{1,3}
Ana Lisa do Vale GOMES ^{1,4}

¹ Programa de Pós graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica – UFPE, Vitória de Santo Antão – PE; ² Programa de Pós Graduação em Nutrição – UFPE, Recife – PE; ³ Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – UFPE, Vitória de Santo Antão – PE; ⁴ Núcleo de Enfermagem – UFPE, Vitória de Santo Antão – PE.
analisagomes@gmail.com

RESUMO: A chikungunya é uma arbovirose cujas as manifestações clínicas são febre alta de início súbito, cefaléia, calafrios, erupções cutâneas, mialgia e dor articular intensa dividido em três fases: aguda, subcrônica e crônica, sendo a última caracterizada pela poliartralgia, que pode durar meses e até anos. Dentre os sintomas clínicos observados na fase aguda a poliartralgia ocorre de maneira mais regular com potencial de ser incapacitante, afastando os indivíduos das suas atividades de vida. Não há tratamento específico, sendo os anti-inflamatórios (esteroides ou não), somados a imunossuppressores e terapias manuais despontam como recursos básicos no combate aos sintomas clínicos da fase aguda e o exercício físico emerge como meio de tratamento não farmacológico promovendo aptidão física e autossuficiência funcional indicado na fase subcrônica e crônica. Esta revisão tem como objetivo apresentar informações sobre o vírus e a doença, atualizar o conhecimento e identificar pontos que precisam ser melhor explicados e sugestões de melhoria acerca da doença, prognóstico e qualidade de vida desses pacientes.

Instituto Medeiros de Educação Avançada - IMEA

Editor Chefe

Giselle Medeiros da Costa One

Corpo Editorial

Beatriz Susana Ovruski de Ceballos
Giselle Medeiros da Costa One
Helder Neves de Albuquerque
Sylvana Maria Onofre Duarte Mahon

Revisão Final

Giselle Medeiros da Costa One

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados de Acordo com AACR2, CDU e CUTTER

O59s	One, Giselle Medeiros da Costa. Saúde interativa, 1./ Organizador: Giselle Medeiros da Costa One. IMEA, 2019. 1677 fis. Prefixo editorial: 53005 ISBN: 978-85-53005-12-3 (on-line) Modelo de acesso: Word Wilbe Web < http://www.cinasama.com.br >
Pessoa - PB	Instituto Medeiros de Educação Avançada – IMEA – João 1. Educação em saúde 2. Saúde Pública 3. Atenção à saúde. I. Giselle Medeiros da Costa One II. Saúde interativa 1 CDU: 614

Laureno Marques Sales, Bibliotecário especialista. CRB -15/121

Direitos desta Edição reservados ao Instituto Medeiros de Educação Avançada –
IMEA

Impresso no Brasil / Printed in Brazil

6.2 Marcadores imunológicos no soro de pacientes na fase crônica da infecção pelo CHIKV.

A fim de confirmar a infecção crônica pelo CHIKV, foi realizado o teste de ELISA para detecção de anticorpos IgG (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Amostras utilizadas no estudo para confirmação do IgG

Grupo	Número de Pacientes	Razão IgG+ CHIKV	Média
CONTROLE	9	<0,8	0,570
CHIKV	13	≥ 1,1	162,81

Fonte: NASCIMENTO, 2020

6.3 Avaliação do exercício físico no estresse oxidativo em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV

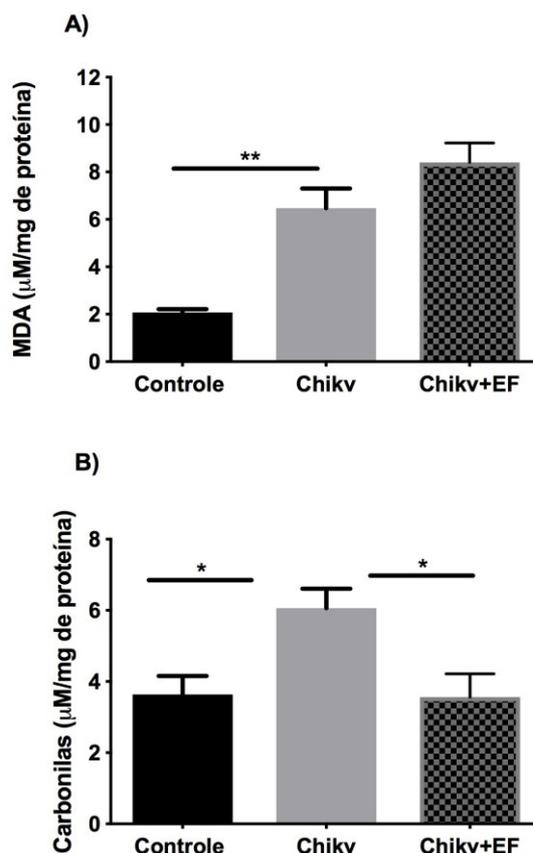
6.3.1 Biomarcadores do estresse oxidativo em PBMCs

Para avaliação da peroxidação lipídica foi feita a dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, sendo o malondealdeído (MDA) a substância que se apresenta em maior quantidade, considerado um biomarcador de estresse oxidativo. Nossos resultados mostraram que a infecção crônica pelo CHIKV causou um aumento de 212% nos níveis de MDA no grupo chikungunya (GCHIKV) em relação ao grupo controle (GC) (GC=2,071±0,13 µM/mg de prot. vs GCHIKV= 6,469 ± 0,82 µM/mg de prot., p<0,001). Não foi observada diferença significativa nos níveis de MDA pós exercício físico no grupo Grupo Chikungunya + Exercício Físico (GCHIK+EF) em comparação com o grupo GCHIKV (GCHIKV= 6,469 ± 0,82 µM/mg de prot. vs GCHIK+EF=8,400±0,82 µM/mg de prot., p=0,212) (**Figura 6A**).

Em relação a avaliação da oxidação proteica, o grupo CHIKV apresentou aumento de 166% em relação ao grupo controle (GCHIKV= 6,06 ± 0,54 µM/mg de prot., vs GC=3,63±0,52 µM/mg de prot., p=<0,007) no grupo CHIKV+EF foi

observada uma diminuição de 41% dos níveis de carbonilas em PBMCs quando comparado com o grupo CHIKV (GCHIKV= $6,06 \pm 0,54 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot., vs GCHIK+EF= $3,56 \pm 0,64 \mu\text{M}/\text{mg}$ de prot., $p < 0,03$) (**Figura 6B**).

Figura 6 - Efeito do exercício físico sobre os biomarcadores de estresse oxidativo em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV.



Níveis de malondialdeído, MDA (A) e Carbonilas (B). Controle (n=7), Chikv (n=13) e Chikv+EF (n=7). Os gráficos foram expressos em média \pm EPM considerando o teste Anova One Way, seguido pelo pos-teste de TUKEY. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fonte: NASCIMENTO, 2020.

6.3.2 Atividade antioxidante enzimática em PBMCs

O aumento na concentração de agentes pró-oxidantes pode ser balanceado pela existência de defesas antioxidantes. Nessa perspectiva, foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST.

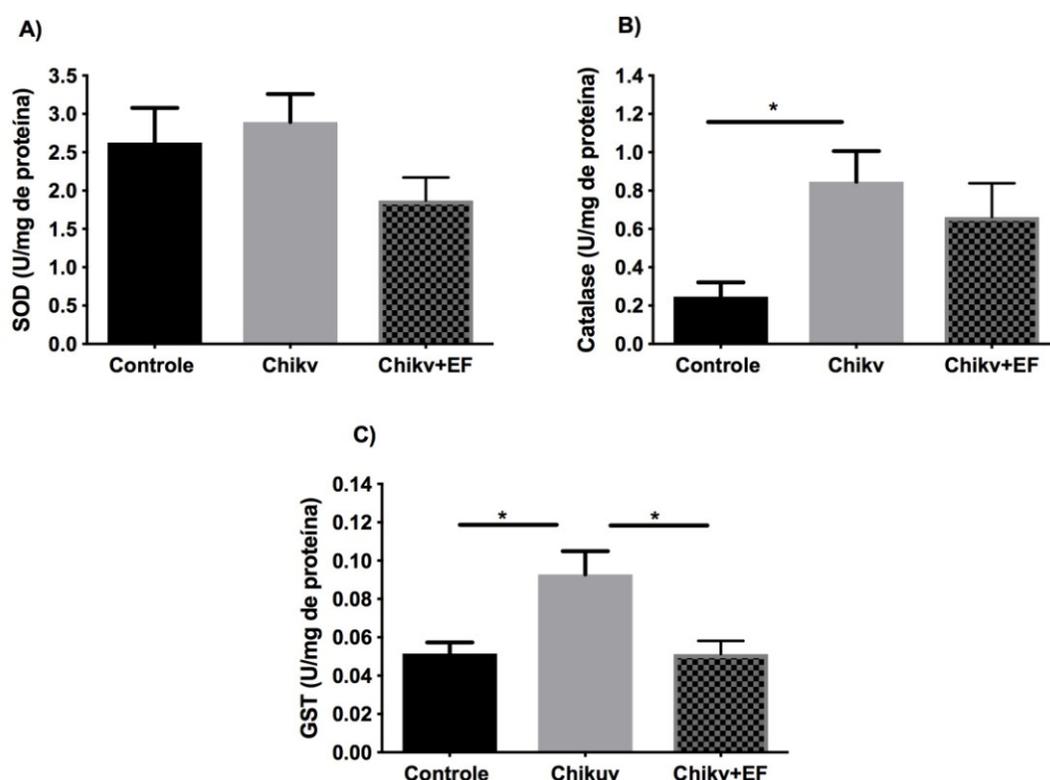
Na avaliação da SOD, os resultados mostraram que não houve diferença entre os grupos GC e GCHIKV (GC= $2,627 \pm 0,45$ U/mg de prot. vs GCHIKV= $2,899 \pm 0,36$

U/mg de prot., $p=0,87$); o exercício físico não alterou significativamente a atividade da SOD entre os grupos GCHIKV e GCHIKV+EF (GCHIKV= $2,899 \pm 0,36$ U/mg de prot. vs GCHIKV+EF= $1,871 \pm 0,30$ U/mg de prot., $p=0,18$) (**Figura 7A**).

A atividade da CAT apresentou aumento de 242% no GCHIKV em relação ao GC (GC= $0,247 \pm 0,07$ U/mg de prot. vs GCHIKV= $0,846 \pm 0,15$ U/mg de prot., $p=0,03$); após o exercício físico não houve diferença significativa entre o GCHIKV e GCHIKV+EF (GCHIKV= $0,846 \pm 0,15$ U/mg de prot. vs GCHIKV+EF= $0,662 \pm 0,17$ U/mg de prot., $p=0,69$) (**Figura 7B**).

Aumento de 80% foi observado na atividade da GST no GCHIKV quando comparado ao GC (GC= $0,051 \pm 0,00$ U/mg de prot. vs GCHIKV= $0,092 \pm 0,01$ U/mg de prot., $p<0,01$). Diminuição de 55% na atividade da GST ocorreu no GCHIKV+EF em relação ao GCHIKV (GCHIKV= $0,092 \pm 0,01$ U/mg de prot. vs GCHIKV+EF= $0,05 \pm 0,00$ U/mg de prot., $p=0,04$) (**Figura 7C**).

Figura 7 - Efeito do exercício físico na atividade antioxidante enzimática em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV.



Superóxido Dismutase, SOD (**A**), Catalase, CAT (**B**) e glutathiona-S-transferase (GST) (**C**). Controle (n=7), Chikv (n=13) e Chikv+EF (n=7). Os gráficos foram

expressos em média \pm EPM considerando o teste Anova One Way, seguido pelo pos-teste de TUKEY. * $p < 0,05$.

Fonte: NASCIMENTO, 2020.

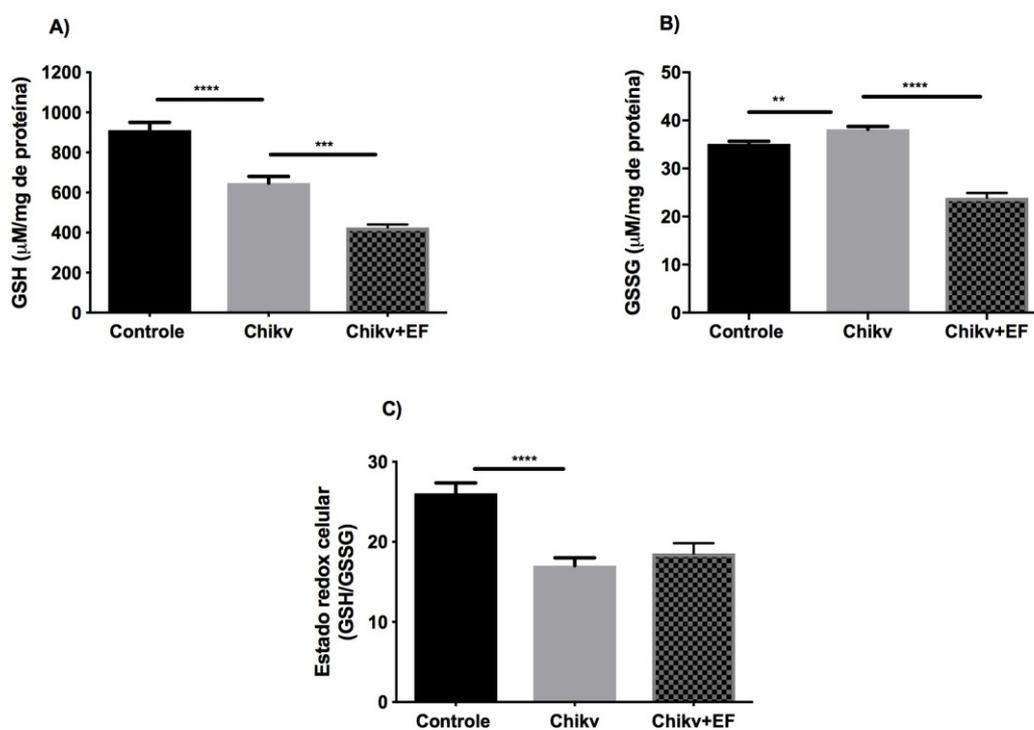
6.3.3 Atividade antioxidante não-enzimática em PBMCs

Avaliando os níveis de glutatona das PBMCs, foi observado diminuição dos níveis de GSH de 29% no GCHIKV quando comparado ao GC (GC=911,1 \pm 38,91 μ M/mg de prot. vs GCHIKV=647,5 \pm 33,48 μ M/mg de prot., $p < 0,0001$) e o exercício físico apresentou uma diminuição de 34% de GSH no GCHIKV+EF em comparação com o grupo GCHIKV (GCHIKV=647,5 \pm 33,48 μ M/mg de prot. vs GCHIKV+EF=425,6 \pm 15,16 μ M/mg de prot., $p = 0,0009$) (**Figura 8A**).

Foi observado aumento de 8% nos níveis de GSSG em PBMCs no GCHIKV em relação ao GC (GC= 35,10 \pm 0,52 μ M/mg de prot., vs GCHIKV=38,10 \pm 0,57 μ M/mg de prot., $p < 0,007$). Uma redução de 37% dos níveis de GSSG foi observada no GCHIKV+EF quando comparado com o grupo GCHIKV (GCHIKV=38,10 \pm 0,57 μ M/mg de prot. vs GCHIKV+EF= 23,88 \pm 1,02, $p < 0,0001$) (**Figura 8B**).

Em relação ao estado redox celular foi observado redução de 35% no GCHIKV em relação ao GC (GC=26,071 \pm 1,28 μ M/mg de prot. vs GCHIKV= 17,04 \pm 0,96 μ M/mg de prot., $p < 0,0001$). O exercício físico não apresentou diferença no estado redox quando comparado GCHIKV e GCHIKV+EF (GCHIKV=17,04 \pm 0,96 μ M/mg de prot. vs GCHIKV+EF=18,57 \pm 1,26 μ M/mg de prot., $p = 0,63$) (**Figura 8C**).

Figura 8 - Efeito do exercício físico no sistema antioxidante não enzimático em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV.



Níveis de glutathiona reduzida (GSH) (**A**), glutathiona oxidada (GSSG) (**B**) e estado redox celular (razão GSH/GSSG) (**C**). Controle (n=9), Chikv (n=13) e Chikv+EF (n=7). Os gráficos foram expressos em média \pm EPM considerando o teste Anova One Way, seguido pelo pos-teste de TUKEY. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Fonte: NASCIMENTO, 2020.

7 DISCUSSÃO

A exposição de forma crônica a infecções virais é uma fonte constante de geração de espécies reativas, que podem levar a um quadro de estresse oxidativo (PETERHANS, 1979; RESHI et al., 2014). Em nosso estudo, investigamos as alterações do estado redox celular em PBMCs e o efeito de um programa de exercício físico em pacientes crônicos da febre chikungunya. A fisiopatologia de arbovírus artritogênicos é escassa, assim como os recursos utilizados para o tratamento dos indivíduos acometidos por arboviroses. Diante disso, a importância de compreender os mecanismos relacionados a patogênese da febre chikungunya faz-se necessário.

De acordo com os resultados deste estudo, houve diferença no equilíbrio oxidante/antioxidante em PBMCs de pacientes com febre chikungunya em fase crônica. Sendo evidenciado pelo aumento de biomarcadores da peroxidação lipídica e oxidação proteica, representado pelo aumento dos níveis de MDA e carbonilas. Esse achado é consistente com Banerjee e Mukhopadhyay (2018), que observaram níveis elevados de MDA e carbonilas no plasma de indivíduos com febre chikungunya em fase crônica (BANERJEE; MUKHOPADHYAY, 2018). Estudo utilizando linhagens celulares SH-SY5Y de neuroblastoma infectadas com o CHIKV apresentaram elevados níveis de MDA, 48 horas pós infecção pelo vírus (DHANWANI et al., 2012).

O Mayaro Vírus (MAYV) é uma outra espécie do gênero alfavírus, que apresenta as mesmas manifestações clínicas da febre chikungunya, sendo também observado um aumento dos biomarcadores de estresse oxidativo, 24 horas pós infecção em células de hepatócitos humanos (CAMINI et al., 2017). Em outras doenças causadas por infecções por vírus, assim como a Dengue, também são encontradas alterações dos níveis de biomarcadores em proteínas plasmáticas (SOUNDRAVALLEY et al., 2008).

Além da avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo, analisamos os sistemas de defesas antioxidantes de PBMCs. Nos resultados obtidos, as defesas antioxidantes dos pacientes crônicos do GCHIKV exibiram aumento da atividade enzimática da CAT, GST e não foi observado alteração na atividade da SOD em PBMCs. Este aumento na atividade da CAT pode ser visto como uma tentativa de proteção ao dano oxidativo causado pelo aumento dos biomarcadores, ou seja, a

atividade da CAT está aumentada a fim de diminuir a quantidade de H_2O_2 formado, o qual pode levar a formação de outras espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxil (OH^\cdot) que é altamente reativo (RESHI et al., 2014).

Dhanwani et al (2012) observaram diminuição dos níveis transcricionais da CAT com o avanço da infecção após 48 horas pelo CHIKV (DHANWANI et al 2012). Em um outro estudo feito por Camini et al (2017) foi verificado que 24 horas pós infecção por CHIKV, células de hepatócitos humanos apresentaram redução na atividade da CAT mostrando o resultado do efeito agudo da infecção na atividade dessa enzima antioxidante (CAMINI et al., 2017).

A GST é uma enzima importante no processo de detoxificação metabólica. O aumento da GST em PBMCs no grupo CHIKV sugere um mecanismo de tentativa de proteção celular, em resposta a produção aumentada de espécies reativas e/ou atividade inflamatória. Estudos, como o de Chen et al (2011), mostram que a GST combate os efeitos deletérios de espécies reativas decorrentes do estresse oxidativo causado por infecções virais (CHEN et al., 2011). Já foi demonstrado que no plasma de pacientes com hepatite B e em células epiteliais humanas de vias aéreas infectadas pelo vírus sincicial respiratório houve aumento da atividade da GST (HOSAKOTE et al., 2001; ZHAO et al., 2013). A literatura também mostra que aumento na atividade de GST está relacionado a uma atividade anti-inflamatória (LEONG et al., 2016). As glutations na célula encontram-se sob a forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). A GSH desempenha um papel importante na manutenção do estado redox celular participando da troca de tiois-dissulfeto, que regula várias funções celulares, incluindo a expressão gênica e a atividade de enzimas individuais e sistemas enzimáticos. Manter a proporção ideal de GSH/GSSG é essencial para a viabilidade celular (KALININA et al., 2014). Em nossos resultados, as PBMCs de pacientes infectados pelo CHIKV apresentaram uma diminuição dos níveis de GSH, aumento de GSSG e redução do estado redox celular. A diminuição dessa proporção pode servir como um indicador de dano ao estado redox da célula e de alterações na regulação gênica redox dependente. As consequências da proporção inadequada de GSH/GSSG incluem mudanças significativas no mecanismo de sinalização celular redox dependente, controlado de forma não enzimática e enzimática, com a participação de isoformas de GST e glutaredoxina (KALININA et al., 2014). Em infecções virais, a glutaciona tem mostrado grande importância uma vez que é responsável pela regulação da

resposta imune (FORMAN, 2009). Infecções com vírus da gripe, rinovírus e hepatite apresentam diminuição dos níveis de GSH intracelular (CIRIOLO et al., 1997; ACAR et al., 2009).

De acordo com os nossos resultados, ocorre um quadro de estresse oxidativo em células imunes de pacientes na fase crônica da febre chikungunya, sobretudo devido menor ação do sistema antioxidante não enzimático. Esse mecanismo de aumento do estresse oxidativo pode ser relacionado com a patogênese da doença, assim como estar relacionado ao processo inflamatório crônico articular, uma vez que os pacientes relatam a poliartralgia. Sabe-se que a função metabólica em células isoladas do sangue humano para tratamento e diagnóstico de doenças é uma nova e importante área de pesquisa (BUSQUETS et al., 2018).

Até o momento, não há um consenso na literatura sobre o efeito do exercício físico no balanço oxidativo em indivíduos acometidos por arboviroses. No entanto, de uma forma geral, a prática de exercício físico emerge como um adjuvante terapêutico para doenças de cunho inflamatório, e muitas vezes promove aumento da defesa antioxidante enzimática (MARGARITELIS et al., 2018; KRUK et al., 2019). No entanto, já foi observado em eritrócitos de pacientes com HIV, diminuição na razão GSH/GSSG de MDA após a realização de treinamento físico (DERESZ et al., 2018).

As pacientes que realizaram nosso programa de exercício físico apresentaram diminuição dos níveis de carbonilas, GSH, GSSG e na atividade da GST, sem alterações nos outros componentes do sistema antioxidante enzimático de PBMCs. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar o efeito de 12 sessões de exercício físico em PBMCs de pacientes com infecção crônica pelo CHIKV. Podemos supor que os números das sessões realizadas não foram suficientes para induzir modulações positivas nas atividades enzimáticas avaliadas nesse estudo. No entanto, vale ressaltar que apesar de não ter sido verificado uma melhora no balanço redox de PBMCs, o protocolo de exercício físico utilizado não induziu danos oxidativos, uma vez que não houve aumento de biomarcadores de estresse oxidativo e nem diminuição do estado redox celular pós-exercício.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados apresentam que PBMCs de pacientes acometidos por febre chikungunya de fase crônica apresentam desequilíbrio entre a produção de EROs e o sistema de defesa antioxidante, gerando um quadro de estresse oxidativo. O modelo de programa de exercício físico utilizado nesse estudo não apresentou alteração no estado redox. Esses achados apontam para que novas abordagens sejam realizadas para melhor compreensão dos mecanismos causados por alfavírus, uma vez que as arboviroses de ordem artritogênicos são um crescente problema de saúde pública.

REFERÊNCIAS

- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**. New York, v. 105, p. 121-126, 1984. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163>. Acesso em: 10 Jul. de 2018
- ACAR, Ali et al. Investigation of oxidative stress and antioxidant defense in patients with hepatitis B virus infection and the effect of interferon-alpha plus lamivudine combination therapy on oxidative stress. **Mikrobiyoloji bulteni**, Ankara, v. 43, n. 3, p. 411-423, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19795616>.. Acesso em: 15 Maio 2018.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**, 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- ALDOSARI, Sarah et al. Subcellular reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular pathophysiology. **Antioxidants**, Basel, v. 7, n. 1, p. 14, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29337890/>. Acesso em: 05 Maio 2019.
- AN, Wenxi et al. Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**, Wuhan Heidelberg, Germany, v. 32, n. 6, p. 441-453, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29188427/>. Acesso em: 10 Jun. 2019
- APEL, Klaus; HIRT, Heribert. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, Palo Alto, Calif.v. 55, p. 373-399, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15377225/>. Acesso em: 10 Jan. 2020.
- ASSUNÇÃO-MIRANDA., et al. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **BioMed research international.**, New York, NY v. 2013, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771267/>. Acesso em: 15 Set. 2019.
- BANERJEE, Nilotpal; SAHA, Bibhuti; MUKHOPADHYAY, Sumi. Intracellular ROS generated in chikungunya patients with persisting polyarthralgia can be reduced by *Tinospora cordifolia* leaf extract. **VirusDisease**, India, v. 29, n. 3, p. 375-379, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30159374/>. Acesso em: 10 Jan. 2019.
- BARTELS, Dorothea; DINAKAR, Challabathula. Light response, oxidative stress management and nucleic acid stability in closely related Linderniaceae species differing in desiccation tolerance. **Planta**, Berlin, New York ,v. 236, n. 2, p. 541-555, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22437647/>. Acesso: 15 Jan. 2020.
- BERNARD, Eric et al. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. **PloS one**, San Francisco, v. 5, n. 7, p.

e11479, 2010. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0011479>. Acesso em: 10 Set. 2019.

BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, New York, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23268465/>. Acesso em: 10 Jul. 2018.

BLETTERY, Marie et al. Brief report: management of chronic post-chikungunya rheumatic disease: the martinican experience. **Arthritis & Rheumatology**, Malden, MA, v. 68, n. 11, p. 2817-2824, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27273928/>. Acesso em: 10 Abri. 2018.

BORGHERINI, Gianandrea et al. Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical infectious diseases**, Chicago, IL, v. 44, n. 11, p. 1401-1407, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17479933/>. Acesso em: 17 Set. 2018.

BORGHERINI, Gianandrea et al. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, IL v. 47, n. 4, p. 469-475, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18611153/>. Acesso em: 14 Jan. 2020.

BOUQUILLARD, Éric; COMBE, Bernard. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. **Joint Bone Spine**, Paris, v. 76, n. 6, p. 654-657, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945329/>. Acesso em: 23 Set. 2018.

BOYUM, A. I. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.**, New York, v. 97, p. 77, 1968. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4179068/>. Acesso em: 14 Jan. 2019

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Orlando FL, v 72, n 2, p 248-54, 1976. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/942051/>. Acesso em: 17 Set. 2018

BRAGA, José Ueleres et al. Accuracy of Zika virus disease case definition during simultaneous Dengue and Chikungunya epidemics. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, n. 6, p. e0179725, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0179725.t003>. Acesso em: 16 Jun. 2019.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**, Brasília, v. 48, n.3, p.11, 2017.

BRITO, Carlos Alexandre Antunes de. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**

Tropical, Rio de Janeiro v. 50, n. 5, p. 585-589, 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822017000500585. Acesso em: 22 Jun. 2018.

BROECKEL, Rebecca et al. Therapeutic administration of a recombinant human monoclonal antibody reduces the severity of chikungunya virus disease in rhesus macaques. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 11, n. 6, p. e0005637, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28628616/>. Acesso em: 22 Jun 2019.

BROSSEAU, Lucie et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for the treatment of rheumatoid arthritis in the hand. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, U.K., n. 2, 2003.

BROWN, Rebecca; WAN, Judy; KIELIAN, Margaret. The alphavirus exit pathway: what we know and what we wish we knew. **Viruses**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 2, p. 89, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12918009/>. Acesso em: 07 Jan. 2019.

BUEGE, John A.; AUST, Steven D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**. New York, v.52, p. 302-310, 1978. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687978520326>. Acesso em: 05 Set. 2018

BURT, Felicity J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, Basel, Switzerland, v. 379, n. 9816, p. 662-671, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22100854/>. Acesso em: 10 Ago. 2018.

BUSQUETS-CORTÉS, Carla et al. Peripheral Blood Mononuclear Cells Antioxidant Adaptations to Regular Physical Activity in Elderly People. **Nutrients**, Basel, Switzerland, v. 10, n. 10, p. 1555, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30347790/>. Acesso em: 04 Jan. 2019

CADENAS, Enrique; DAVIES, Kelvin JA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, London, v. 29, n. 3-4, p. 222-230, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11035250/>. Acesso em: 18 Jul. 2019.

CAGALINEC, Michal et al. Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. **J Cell Sci**, London, v. 126, n. 10, p. 2187-2197, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23525002/>. Acesso em: 15 Jan. 2020.

CHATTERJEE, Anupam; GUPTA, Sanjay. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer. **Cancer letters**, Amsterdam, v. 433, p. 33-42, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29959055/>. Acesso em: 02 Set. 2018.

CAMINI, Fernanda Caetano et al. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. **Archives of virology**, Wien, v. 162, n. 4, p. 907-917, 201. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28039563/>. Acesso em: 14 Jan. 2019.

CARDONA-OSPINA, JAIME A. *et al.* Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Colombia, 2014. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 109, n. 12, p. 793-802, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26626342/>. Acesso em: 10 Jun. 2019.

CASPERSEN, Carl J. *et al.* Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health rep**, Rockville v. 100, n. 2, p. 126-31, 1985. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1424733/>. Acesso em: 30 Abr. 2019.

CASSADOU, S. *et al.* Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice , v. 19, n. 13, p. 20752, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24721536/>. Acesso em: 18 Jun. 2018.

CAVALHEIRO, Mariana G. *et al.* Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 3, p. 1485-1499, 2016. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652016000401485. Acesso em: 08 Jul. 2018

CIRIOLO, Maria Rosa *et al.* Loss of GSH, oxidative stress, and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 5, p. 2700-2708, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9006907/>. Acesso em: 09 Jun. 2019

CHARREL, Rémi N. *et al.* Chikungunya outbreaks-the globalization of vectorborne diseases. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 356, n. 8, p. 769, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17314335/>. Acesso em: 17 Jun. 2019.

CHAVES, Tania do Socorro Souza *et al.* Travelers as sentinels for chikungunya fever, Brazil. **Emerging infectious diseases**, United States, v. 18, n. 3, p. 529, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22377013/>. Acesso em: 09 Mar. 2019.

CHEN, Rubing *et al.* ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, London, v. 99, n. 6, p. 761-762, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29745869/>. Acesso em: 17 Jan. 2020.

CHRETIEN, Jean-Paul *et al.* Drought-associated chikungunya emergence along coastal East Africa. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 76, n. 3, p. 405-407, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360859/>. Acesso em: 18 Jan. 2018.

COHEN, BRUCE H.; GOLD, DEBORAH R. Mitochondrial cytopathy in adults: what we know so far. **Cleveland Clinic journal of medicine**, United States, Cleveland, v.

68, n. 7, p. 625-642, 2001. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11453081/>. Acesso em: 15 Jun. 2018.

COOKE, Marcus S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, 2003.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12832285/>. Acesso em: 27 Jun. 2018

DEL CASTILLO-CABRERA, Soky. Manifestaciones mucocutáneas de la fiebre chikungunya. **Dermatol Peru**, Peru, v. 24, p. 159-69, 2014. Disponível em:

<http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v36n3/v36n3a05.pdf>. Acesso em: 08 Jul. 2019

DERESZ, Luís Fernando et al. Exercise training reduces oxidative stress in people living with HIV/AIDS: a pilot study. **HIV clinical trials**, St. Louis, v. 19, n. 4, p. 152-

157, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30369300/>. Acesso em: 22 Jun. 2018

DEZURE, Adam D. et al. Whole-inactivated and virus-like particle vaccine strategies for chikungunya virus. **The Journal of infectious diseases**, United States, v. 214, n. suppl_5, p. S497-S499, 2016. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27920180/>. Acesso em: 27 Jan 2019

DEVAUX, Christian A. Emerging and re-emerging viruses: A global challenge illustrated by Chikungunya virus outbreaks. **World journal of virology**, Hong Kong, v. 1, n. 1, p. 11, 2012. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3782263/>. Acesso em: 23 Mar. 2018

DHANWANI, Rekha et al. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus research**, Netherlands, v. 163, n. 2, p. 563-572, 2012. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22210004/>. Acesso em: 22 Abr. 2018

DHANWANI, Rekha et al. Differential proteome analysis of Chikungunya virus-infected new-born mice tissues reveal implication of stress, inflammatory and apoptotic pathways in disease pathogenesis. **Proteomics**, Germany, v. 11, n. 10, p. 1936-1951, 2011. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21472854/>.

Acesso em: 04 Abr. 2018

DI MEO, Sergio et al. Harmful and beneficial role of ROS. **Oxidative medicine and cellular longevity**, New York, v. 2016, 2016. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5080479/>. Acesso em: 17 Abr. 2018

DIAS, C. et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus in 2 Urban Areas of Brazil 1 Year after Emergence. **Emerging Infectious Diseases**, Brasil, v. 24, n. 4, p. 617 -

624, 2018. Disponível em: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/24/4/17-1370_article.

Acesso em: 22 Jan 2019

DINAKAR, Challabathula; DJILIANOV, Dimitar; BARTELS, Dorothea. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense.

Plant Science, Ireland, v. 182, p. 29-41, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22118613/>. Acesso em: 22 Out. 2019.

ERASMUS, Jesse H. et al. Utilization of an Eilat virus-based chimera for serological detection of chikungunya infection. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. e0004119, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004119>. Acesso em: 05 Out. 2018

FILIPPIN, Lidiane Isabel et al. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clinical & Experimental Immunology**, Oxford, v. 152, n. 3, p. 415-422, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2453196/>. Acesso em: 07 Nov. 2019

FORMAN, Henry Jay; ZHANG, Hongqiao; RINNA, Alessandra. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular aspects of medicine**, Oxford, v. 30, n. 1-2, p. 1-12, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18796312/>. Acesso em: 16 Nov. 2019.

FRANCO, E. J. et al. The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines. **Antiviral chemistry & chemotherapy**, Oxford, v. 26, n 1-12, p 1-12, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30354193/>. Acesso em: 07 Nov. 2018.

FRIEDMAN, Jonathan R.; NUNNARI, Jodi. Mitochondrial form and function. **Nature**, United States, v. 505, n. 7483, p. 335, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature12985>. Acesso em: 07 Jul. 2019.

GARCÍA-RUIZ, Carmen et al. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species Role of mitochondrial glutathione. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 17, p. 11369-11377, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9111045/>. Acesso em: 09 Nov. 2018.

GÉRARDIN, Patrick et al. Predictors of Chikungunya rheumatism: a prognostic survey ancillary to the TELECHIK cohort study. **Arthritis research & therapy**, London, v. 15, n. 1, p. R9, 2013. Disponível em: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar4137>. Acesso em: 08 Out. 2019

GIBBONS, Don L. et al. Conformational change and protein–protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. **Nature**, London, v. 427, n. 6972, p. 320, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14737160/> . Acesso em: 15 Set. 2018

GLEESON, Michael et al. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. **Nature reviews immunology**, London, v. 11, n. 9, p. 607-615, 2011.

GOO, Leslie et al. A virus-like particle vaccine elicits broad neutralizing antibody responses in humans to all Chikungunya virus genotypes. **The Journal of infectious**

diseases, English, v. 214, n. 10, p. 1487-1491, 2016. Disponível em: https://www.abcam.com/products?sortOptions=Relevance&selected.classification=Primary+antibodies&keywords=Chikungunya%20Virus&qclid=Cj0KCQiA0-6ABhDMARIsAFVdQv86Kd3kdLkfxLYLX-R_DPeE4fvWK7rmq7CJx14Ot1WZc9dZtImtW1EaAoiyEALw_wcB&gclsrc=aw.ds. Acesso em: 14 Jan. 2019.

GUZZETTA, Giorgio et al. Effectiveness and economic assessment of routine larviciding for prevention of chikungunya and dengue in temperate urban settings in Europe. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 11, n. 9, p. e0005918, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28892499/>. Acesso em: 12 Jul. 2019.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. A. Assay for differentiation of GST. **Method Enzymol**, New York, v. 77, p. 735-740, 1981. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7329316/>. Acesso em: 12 Jan. 2019

HALLIWELL, Barry. Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**, San Francisco, v. 16, n. 1, p. 33-50, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8839918/>. Acesso em: 14 Jan. 2019.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, United States, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22537212/>. Acesso em: 18 Jun. 2019.

HALLIWELL, Barry. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American journal of medicine**, New York, v. 91, n. 3, p. S14-S22, 1991. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002-9343\(91\)90279-7](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002-9343(91)90279-7). Acesso em: 23 Jan. 2018.

HANDY, Diane E.; LOSCALZO, Joseph. Redox regulation of mitochondrial function. **Antioxidants & redox signaling**, London, v. 16, n. 11, p. 1323-1367, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24455476/>. Acesso em: 17 Fev. 2019.

HISSIN, Paul J.; HILF, Russell. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical biochemistry**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 214-226, 1976. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/962076/>. Acesso em: 16 Abr. 2019.

HUANG, Sheng-Hai., et al. Inhibitory effect of melatonin on lung oxidative stress induced by respiratory syncytial virus infection in mice. **Journal of pineal research**, New York, v. 48, n. 2, p. 109- 116, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20070490/>. Acesso em: 17 Jul. 2019.

HOARAU, Jean-Jacques et al. Persistent chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20404278/>. Acesso em: 14 Abr. 2018.

HOSAKOTE, Y. M., et al. Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, New York, v. 183, n. 11, p. 1550-1560, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21471094/>. Acesso em: 05 Mar. 2018.

HOWLEY, P. **Fields virology**. 6 a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

JAVELLE, Emilie et al. Specific management of post-chikungunya rheumatic disorders: a retrospective study of 159 cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e0003603, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25760632/>. Acesso em: 07 Fev. 2018

JOHNSON BW, RUSSELL BJ, GOODMAN CH. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. **Journal of Infectious Diseases**, United States, 2016b, 214: S471–S474. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27920176/>. Acesso em: 17 Jun. 2018

JONES, Dean P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, Larchmont, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16987039/>. Acesso em: 14 Jun. 2019

JOSE, Joyce; SNYDER, Jonathan E.; KUHN, Richard J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future microbiology**, London, v. 4, n. 7, p. 837-856, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19722838/>. Acesso em: 19 Jan 2019

JOSSERAN, Loïc et al. Chikungunya disease outbreak, Reunion Island. **Emerging infectious diseases**, United States, v. 12, n. 12, p. 1994-1995, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17354339/>. Acesso em: 18 Fev. 2019

JOUBERT, Pierre-Emmanuel et al. Chikungunya virus–induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **Journal of Experimental Medicine**, United States, v. 209, n. 5, p. 1029-1047, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22508836/>. Acesso em: 08 Jul. 2019

KALININA, E. V.; CHERNOV, N. N.; NOVICHKOVA, M. D. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. **Biochemistry**, Moscow, United States, v. 79, n. 13, p. 1562-1583, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25749165/>. Acesso em: 09 Abr. 2018

KALUDERCIC, Nina; GIORGIO, Valentina. The dual function of reactive oxygen/nitrogen species in bioenergetics and cell death: the role of ATP synthase. **Oxidative medicine and cellular longevity**, United States, v. 2016, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/3869610/>. Acesso em: 17 Fev. 2019.

KOURY, Josely Correa; DONANGELO, Carmen Marino. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev nutr**, Brasil v. 16, n. 4, p. 433-41, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rn/v16n4/a07v16n4.pdf>. Acesso em: 17 Nov. 2018

KRUK, Joanna et al. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. **Free radical research**, London, v. 53, n. 5, p. 497-521, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31039624/>. Acesso em: 07 Mar. 2018

LAMBETH, J. David. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 4, n. 3, p. 181, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri1312>. Acesso em: 18 Jun. 2019

LEBEL, Carl P.; ISCHIROPOULOS, Harry; BONDY, Stephen C. Evaluation of the probe 2', 7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, United States, v. 5, n. 2, p. 227-231, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1322737/>. Acesso em: 11 Nov. 2018

LEONG, Pou Kuan et al. Differential action between schisandrin A and schisandrin B in eliciting an anti-inflammatory action: The depletion of reduced glutathione and the induction of an antioxidant response. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 5, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27195753/>. Acesso em: 11 Jan. 2018

LOUIS, Kristine S.; SIEGEL, Andre C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. In: **Mammalian cell viability**. Humana Press, 2011. p. 7-12. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article/figure?id=10.1371/journal.pone.0155879.g013>. Acesso em: 11 Abr. 2019

LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, Ricardo et al. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 109, n. 6, p. 787-796, 2014. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762014000600787. Acesso em: 11 Jan 2018

LUDOVICO, Paula; BURHANS, William C. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. **FEMS yeast research**, London, v. 14, n. 1, p. 33-39, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4332618/>. Acesso em: 11 Abr. 2019

LUM, Fok-Moon; NG, Lisa FP. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral research**, Netherlands, v. 120, p. 165-174, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26092642/>. Acesso em: 07 Jul. 2018

MAGHERINI, Francesca et al. Oxidative stress in exercise training: the involvement of inflammation and peripheral signals. **Free radical research**, London, v. 53, n. 11-

12, p. 1155-1165, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31762356/>. Acesso em: 11 Abr. 2018

MADARIAGA, Miguel; TICONA, Eduardo; RESURRECCION, Cristhian. Chikungunya: bending over the Americas and the rest of the world. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 20, n. 1, p. 91-98, 2016. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702016000100091. Acesso em: 14 Mar. 2018

MARQUES, Claudia Diniz Lopes et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1 - Diagnóstico e situações especiais. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo, v. 57, supl. 2, p. s421-s437, 2017. Disponível em: https://www.scielo.br/pdf/rbr/v57s2/pt_0482-5004-rbr-57-s2-s421.pdf. Acesso em: 03 Mar. 2018.

MARGARITELIS, Nikos V. et al. Adaptations to endurance training depend on exercise-induced oxidative stress: exploiting redox interindividual variability. **Acta Physiologica**, London, v. 222, n. 2, p. e12898, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28544643/>. Acesso em: 13 Jan 2019

MARTI-CARVAJAL, Arturo et al. Interventions for treating patients with chikungunya virus infection-related rheumatic and musculoskeletal disorders: A systematic review. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 6, p. e0179028, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28609439/>. Acesso em: 07 Jan. 2018.

MARTÍN-FARFÁN, Adolfo; CALBO-TORRECILLAS, Francisco; PÉREZ-DE PEDRO, Iván. Fiebre importada por el virus de Chikungunya. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Peru, v. 26, n. 6, p. 343-344, 2008. Disponível em: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-fiebre-importada-por-el-virus-S0213005X08727241>. Acesso em: 13 Mar. 2018

MEISTER, Alton; ANDERSON, Mary E. Glutathione. **Annual review of biochemistry**, United States, v. 52, n. 1, p. 711-760, 1983. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>. Acesso em: 19 Fev. 2018

MISHRA, Prashant; CHAN, David C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. **Nature reviews Molecular cell biology**, London, v. 15, n. 10, p. 634, 2014. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm3877>. Acesso em: 17 Jul. 2018

MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4623845/>. Acesso em: 18 Mar. 2019

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, England, v. 191, p. 144 - 8, 1961.

Disponível em: <https://www.nature.com/articles/191144a0>. Acesso em: 19 Fev. 2019

MITTAL, Manish et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants & redox signaling**, United States, v. 20, n. 7, p. 1126-1167, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3929010/>. Acesso em: 08 Jan 2019

MITTLER, Ron. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, England, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12234732/>. Acesso em: 07 Set. 2019

MORRIS, Devin et al. Glutathione and infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, Netherlands, v. 1830, n. 5, p. 3329-3349, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304416512002929>. Acesso em: 08 Set. 2018

MUÑOZ, Manuel; NAVARRO, Juan Carlos. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, Colombia, v. 32, n. 2, p. 288-302, 2012. Disponível em: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/647>. Acesso em: 09 Jun. 2018

NAKAHIRA, Kiichi et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. **Nature immunology**, United States, v. 12, n. 3, p. 222, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21151103/>. Acesso em: 13 Jan 2019

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NG, Lisa FP et al. IL-1 β , IL-6, and RANTES as biomarkers of Chikungunya severity. **PloS one**, San Francisco, v. 4, n. 1, p. e4261, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19156204/>. Acesso em: 07 Jan. 2019.

NICHOLLS, David G. Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, Netherlands, v. 1787, n. 11, p. 1416-1424, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19298790/>. Acesso em: 19 Fev. 2018

NICHOLLS, David G.; FERGUSON, Stuart J. **Bioenergetics**. Elsevier, 2002. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/bioenergetics/nicholls/978-0-12-518121-1>. Acesso em: 08 Fev. 2021

NUNNARI, Jodi; SUOMALAINEN, Anu. Mitochondria: in sickness and in health. **Cell**, United States, v. 148, n. 6, p. 1145-1159, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22424226/>. Acesso em: 17 Jan 2019

OKEOMA, Chioma M. (Ed.). **Chikungunya virus**: advances in biology, pathogenesis, and treatment. Springer, 2016. Disponível em: <
<https://www.springer.com/gp/book/9783319429564>. Acesso em: 11 Fev. 2019.

OSELLAME, Laura D.; BLACKER, Thomas S.; DUCHEN, Michael R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. **Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism**, Netherlands, v. 26, n. 6, p. 711-723, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23168274/>. Acesso em: 13 Fev. 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Geographic Spread of Chikungunya in the Americas 2013–2017**. Washington: PAHO, 2017. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&viewarticle&id343&Itemid40931. Acesso em: 08 Fev. 2019.

PAL, S., et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. **Journal of gastroenterology and hepatology**, Australia, v. 25, n. 3, p. 627-634, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20074151/>. Acesso em: 11 Mar. 2018

PETERHANS, Ernst. Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. **Biochemical and biophysical research communications**, United States, v. 91, n. 1, p. 383-392, 1979. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/229848/>. Acesso em: 08 Mar. 2019.

PFEFFER, M. et al. Specific detection of Chikungunya virus using a RT-PCR/nested PCR combination. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, Germany, v. 49, n. 1, p. 49-54, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11911593/>. Acesso em: 19 Jun. 2019

PIALOUX, Gilles et al. Chikungunya, an epidemic arbovirolosis. **The Lancet infectious diseases**, United States, v. 7, n. 5, p. 319-327, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17448935/>. Acesso em: 19 Jun. 2019

PIECZENIK, Steve R.; NEUSTADT, John. Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. **Experimental and molecular pathology**, Netherlands, v. 83, n. 1, p. 84-92, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17239370/>. Acesso em: 09 Abr. 2019

PIERRO, Dennis J.; POWERS, Erik L.; OLSON, Ken E. Genetic determinants of Sindbis virus mosquito infection are associated with a highly conserved alphavirus and flavivirus envelope sequence. **Journal of virology**, United States, v. 82, n. 6, p. 2966-2974, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18160430/>. Acesso em: 09 Mar. 2019

POWERS, A. M. et al. Evolutionary relationships and systematics of the alphaviruses. **Journal of Virology**, United States, v. 75, n. 21, p. 10118–10131, 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC114586/>. Acesso em: 08 Jan 2019

PROSKURYAKOV, Sergey Ya; KONOPLYANNIKOV, Anatoli G.; GABAI, Vladimir L. Necrosis: a specific form of programmed cell death?. **Experimental cell research**, United States, v. 283, n. 1, p. 1-16, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12565815/>. Acesso em: 24 Jun. 2018

RADAK, Zsolt et al. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. **Antioxidants & redox signaling**, United States, v. 18, n. 10, p. 1208-1246, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3579386/>. Acesso em: 09 Jan 2019

RAHMAN, Irfan; BISWAS, Saibal K.; KODE, Aruna. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European journal of pharmacology**, Netherlands, v. 533, n. 1-3, p. 222-239, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16500642/>. Acesso em: 07 Fev. 2018

RENAULT, Philippe et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005–2006. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, United States, v. 77, n. 4, p. 727-731, 2007. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001197>. Acesso em: 09 Abr. 2018

RESHI, Mohammad Latif; SU, Yi-Che; HONG, Jiann-Ruey. RNA viruses: ROS-mediated cell death. **International journal of cell biology**, United States, v. 2014, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24899897/>. Acesso em: 11 Mar. 2019

ROBINSON, Marion C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, England, v. 49, n. 1, p. 28-32, 1955. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14373834/>. Acesso em: 13 Mar. 2019

ROTHAN, Hussin A. et al. A combination of doxycycline and ribavirin alleviated chikungunya infection. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 5, p. e0126360, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25970853/>. Acesso em: 11 Nov. 2018.

ROY, CHAD J et al. Chikungunya vaccine candidate is highly attenuated and protects nonhuman primates against telemetrically monitored disease following a single dose. **Journal of infectious diseases**, San Francisco, v. 209, n. 12, p. 1891-9, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24403555/>. Acesso em: 18 Fev. 2019.

SÁNCHEZ-SECO, María Paz et al. Diagnóstico microbiológico del virus chikungunya importado en España (2006–2007): detección de casos en viajeros. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, Espanha, v. 27, n. 8, p. 457-461, 2009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X09001153>. Acesso em: 05 Mar. 2019

SCHIEBER, Michael; CHANDEL, Navdeep S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current biology**, England, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24845678/>. Acesso em: 26 Mar. 2019

SCHILTE, Clémentine et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS neglected tropical diseases**, United States, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23556021/>. Acesso em: 22 Mar. 2019

SCHILTE, Clémentine et al. Type I IFN controls chikungunya virus via its action on nonhematopoietic cells. **Journal of Experimental Medicine**, United States, v. 207, n. 2, p. 429-442, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/41399085_Type_I_IFN_Controls_Chikungunya_Virus_Via_its_Action_on_Nonhematopoietic_Cells. Acesso em: 08 Mar. 2018

SCHON, Eric A.; PRZEDBORSKI, Serge. Mitochondria: the next (neurode) generation. **Neuron**, v. 70, n. 6, p. 1033-1053, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21689593/>. Acesso em: 18 Mar. 2018

SCHWAMEIS, michael et al. chikungunya vaccines in development. **human vaccines & immunotherapeutics**, United States, v. 12, n. 3, 716-31, 2015. Disponível em: https://www.who.int/immunization/research/meetings_workshops/22_Chikungunya.pdf. Acesso em: 09 Mar. 2019.

SHAUGHNESSY, Daniel T. et al. Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. **Environmental health perspectives**, United States, v. 122, n. 12, p. 1271-1278, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25127496/>. Acesso em: 09 Jun. 2018

SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, United States, v. 127, n. 3, p. 737-749, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28248203/>. Acesso em: 07 Mar. 2019

SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, United States, v. 127, n. 3, p. 737-749, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28248203/>. Acesso em: 08 Mar. 2019

SIMON, F. et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Med Mal Infect**, França, v. 45, n. 7, p. 243-63, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26119684/>. Acesso em: 14 Abr. 2018

SIMON, Fabrice et al. Chikungunya virus infection. **Current infectious disease reports**, United States, v. 13, n. 3, p. 218, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21465340/>. Acesso em: 11 Mar. 2018

SNYDER, Jonathan E. et al. Functional characterization of the alphavirus TF protein. **Journal of virology**, United States, v. 87, n. 15, p. 8511-8523, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720714/>. Acesso em: 11 Mar. 2019

SOUNDRAVALLY, R. et al. Oxidative stress in severe dengue viral infection: association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. **Platelets**, United States, v. 19, n. 6, p. 447-454, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18925513/>. Acesso em: 19 Jan 2018

STAPLES, J. Erin; BREIMAN, Robert F.; POWERS, Ann M. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clinical infectious diseases**, United States, v. 49, n. 6, p. 942-948, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19663604/>. Acesso em: 11 Mar. 2019

STILLER, Sebastian B. et al. Mitochondrial OXA translocase plays a major role in biogenesis of inner-membrane proteins. **Cell metabolism**, United States, v. 23, n. 5, p. 901-908, 2016. Disponível em: <https://www.mendeley.com/catalogue/f6874bc4-f95a-33a8-bf71-a0e729767033/>. Acesso em: 08 Mar. 2019

STRAUSS, James H.; STRAUSS, Ellen G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, United States, v. 58, n. 3, p. 491-562, 1994. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7968923/>. Acesso em: 09 Fev. 2019

TAKAHASHI, Masaki et al. The association between physical activity and sex-specific oxidative stress in older adults. **Journal of sports science & medicine**, United States, v. 12, n. 3, p. 571, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772604/>. Acesso em: 09 Mar. 2019

THEILACKER, C., et al. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC infectious diseases**, England, v. 13, n. September 2011, p. 369, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23927600/>. Acesso em: 19 Jun 2019

TOIVANEN, Auli. Alphaviruses: an emerging cause of arthritis?. **Current opinion in rheumatology**, United States, v. 20, n. 4, p. 486-490, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18525365/>. Acesso em: 07 Fev. 2019

TURRENS, Julio F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, England, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2343396/>. Acesso em: 09 Jan 2019

VAAMONDE GARCÍA, Carlos et al. Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. **Arthritis & Rheumatism**, United States, v. 64, n. 9, p. 2927-2936, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22549761/>. Acesso em: 14 Jan. 2019

VALKO, M; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. D. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, United States, v. 12, n. 10, p. 1161-1208, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15892631/>. Acesso em: 09 Jul. 2018

WADLEY, Alexander J. et al. Monitoring changes in thioredoxin and over-oxidised peroxiredoxin in response to exercise in humans. *Free radical research*, United States, v. 49, n. 3, p. 290-298, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25547896/>. Acesso em: 08 Jul. 2019

WEAVER, Scott C. et al. Alphaviruses: population genetics and determinants of emergence. *Antiviral research*, San Francisco, United States, v. 94, n. 3, p. 242-257, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22522323/>. Acesso em: 11 Jan. 2019

WEBER, Christopher et al. Identification of functional determinants in the Chikungunya virus E2 protein. *PLoS neglected tropical diseases*, United States, v. 11, n. 1, p. e0005318, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005318>. Acesso em: 18 Jun. 2019

WEGER-LUCARELLI, James et al. Dissecting the role of E2 protein domains in alphavirus pathogenicity. *Journal of virology*, United States, v. 90, n. 5, p. 2418-2433, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26676771/>. Acesso em: 08 Jun. 2018

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Chikungunya*. Basel: WHO, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>. Acesso em: 23 Ago. 2019.

ZAMAI, C. A.; BANKOFF, A. D. P. Nível de atividade física e indicadores de qualidade de vida de colaboradores da Unicamp: Análise através do Programa Mexa-se. In: SIMPÓSIO NORDESTINO DE ATIVIDADE FÍSICA & SAÚDE, 11., 2010, Aracaju-Sergipe. *Anais* [...] Aracaju: UFS, 2010. Disponível em: <https://periodicos.ufms.br/index.php/sameamb/article/view/6013/>. Acesso em: 08 Mar. 2019

ZANATTA, Ângela et al. Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. *Cellular and molecular neurobiology*, New York, v. 33, n. 1, p. 137-146, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23053545/>. Acesso em: 09 Jun. 2018

ZHAO, Jing et al. Peripheral type I interferon receptor correlated with oxidative stress in chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, United States, v. 33, n. 8, p. 405-414, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23663046/>. Acesso em: 14 Abr. 2019

APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO ORIGINAL A SER SUBMETIDO NO ARQUIVES OF VIROLOGY, QUALIS B1 NA NUTRIÇÃO

Effects of physical exercise on the oxidative balance of lymphomononuclear cells in patients with chronic infection by Chikungunya virus.

Ramon Nascimento da Silva¹, Wellington de Almeida Oliveira¹, Allifer Rosendo Pereira¹, Tallita Ricarilly Lopes de Arruda Lima², Talita Rafaela da Cunha Nascimento⁵, Alexsandro Costa D'Oleron Barreto dos Santos⁶, Mariane Cajuba de Britto Lira Nogueira¹, Claudia Jacques Lagranha^{3,4}, Ana Lisa do Vale Gomes¹, Mariana Pinheiro Fernandes^{1*}.

¹ Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity Graduate Program, Universidade Federal de Pernambuco- UFPE/CAV, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

² Nutrition Graduate Program, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Neuropsychiatry and Behavior Science Graduate Program, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴ Biochemistry and Physiology Graduate Program, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵ Nursing graduate, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/CAV, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

⁶ Core of physical education, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/CAV, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil.

*Correspondent author:

Mariana Pinheiro Fernandes

Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista,,55608-680, Vitória de Santo Antão, PE – Brazil.

Fone/Fax: (00 55 81) 35233351, E-mail: marianapfernandes@yahoo.com.br

The authors declare that has none conflict of interest.

Abstract

Chikungunya fever is disease has a clinical manifestation of high fever, myalgia, skin rashes and moderate to severe arthralgia, characteristic of alphaviruses. Virus infections are related to increased oxidative stress oxidative stress is an imbalance of redox signaling, where the levels of reactive species (ERs) formed are predominant in relation to the antioxidant defense system. The aim of the study was to evaluate the effect of physical exercise on oxidative balance in patients with chronic CHIKV infection. Twenty-one women with a positive serological diagnosis for CHIKV were selected, blood samples for the isolation of PBMCs for

biochemical analyzes: Lipid peroxidation using the MDA methodology, protein oxidation using the Carbonyl methodology, and activity of the Superoxide Dismutase (SOD) enzymes, Catalase (CAT) and Glutathione-S-transferase (GST) and non-enzymatic antioxidant activity, by the levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG). Our results show patients with chronic CHIKV infection, presented a picture of oxidative stress evidenced by a significant increase in lipid peroxidation, protein oxidation and a decrease, above all, in the non-enzymatic antioxidant system, visualized by the reduction of reduced glutathione levels and an increase in oxidized glutathione. , in addition to a reduction in the cellular redox state when compared to the control group (CG). Our data show a picture of oxidative stress in PBMCs of patients with chronic CHIKV infection, which was not minimized after the physical exercise protocol used in this study

Introduction

Chikungunya fever is an arbovirus caused by the Chikungunya virus (CHIKV), or which is an infected virus belonging to the Togaviridae family and transmitted by mosquitoes of the Aedes species [1]. The disease was first classified in 1952 in Tanzania. In its etymology, the chikungunya word is derived from the Makonde language, that means "to bend over or to stoop", referring to a posture adopted by patients due to illness symptoms [2-3].

Individuals affected by the disease show symptoms in the clinical phases: acute, subacute and chronic. The acute manifestation is characterized by high fever (39 °C) accompanied by moderate to severe arthralgia, with persistence of arthralgia in all phases [4]. Systemic virus spread results in high viral load in muscle tissue, epithelial and endothelial cells, promoting an immune response mediated by dendritic cells, monocytes and lymphocytes associated with the production of inflammatory cytokines [5-6].

It is already described in the literature that viral infections, due to a host immune response, are related for example to changes in the mitochondrial membrane potential and increased oxidative stress [7-8]. Oxidative stress is an imbalance of redox signaling, where the levels of oxidant agents are predominant in relation to the antioxidant defense systems [9-10].

The cellular antioxidant defense systems against reactive species (RS) are performed by cascades of enzymatic and non-enzymatic order, which aims to neutralize the action of RS. The enzymatic antioxidant defense system is carried out mainly by superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPX); while the antioxidant defense of the non-enzymatic order is performed by the glutathione system, in addition to vitamins E and C in the diet [9-10].

In recent studies using CHIKV-infected neuroblastoma cell lines, reduced levels of enzymes, SOD, CAT, GST and increased oxidative stress biomarkers have been observed [11-12]. In addition, another study with patients with chikungunya who had persistent polyarthralgia showed an increase in lipid peroxidation and protein carbonylation in plasma [13].

The RS is established mediators in the destruction of joints, as they degrade the synovial fluid, resulting in less bone thickness, leading to inflammation and joint pain [14]. Since Chikungunya is a viral infection related to the increase in RS that can generate oxidative stress, thus leading to the

degradation of synovial fluid, this may be one of the mechanisms related to persistent polyarthralgia in patients in the chronic phase of the infection.

The regular practice of physical exercise is an important tool in maintaining health, preventing and mitigating the effects of diseases such as: hypertension, obesity, osteoarthritis, metabolic syndrome. Presenting improvements in the locomotor system, in psychological health, and in the quality of life [15].

Thus, there is need for new therapies that can help people affected with the disease to improve their life quality, since the disease pathophysiology is little known. In this context, physical exercise appears as a strategy that can be used to decrease joint pain and oxidative stress.

Materials and Methods

Ethics statement

This study was approved by the Center of Health Science, University of Pernambuco Ethics committee of the University of Pernambuco (protocol number 72123817.4.0000.5208).

Place of study, participants and sampling

This study was conducted in Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil. Inclusion criteria were: women aged 40 to 60 years old, with symptoms related to chikungunya fever confirmed by clinical and laboratory criteria and who had post-infection joint symptoms. The choice of this neighborhood was made through analysis of data from the Rapid Index Survey for *Aedes aegypti* (LIRAA) from the year 2015-2016 of the municipality, in neighborhood Redenção.

All serum samples were screened for CHIKV-specific IgG class antibodies by ELISA. Euroimmun © Chikungunya Elisa IgG Antivirus Kit (Lübeck, Germany) was used for all samples.

Blood samples were collected from each patient by venipuncture. The obtained blood was transferred to two 15 mL falcon tubes containing 6 mL of blood and 4mL of Histopaque to obtain the lymphomonuclear blood cell layer (PBMCs). PBMCs were cultured in culture flasks containing RPMI-1640 medium, 10% SFB and 1% antibiotic/antimycotic solution. All cultures were grown for 72 hours at 37 °C under 5% CO₂ under humid conditions. After culture, cells were The PBMCs were homogenized in extraction buffer (Tris Base 50mM, pH 7.4; with addition of 1 mM sodium orthovanadate, 2mM PMSF and 1mM Nonidet), and broken by an ultrasonic processor (Bandelin SonoPuls, Berlin) for 1 min. 55% power, uninterrupted on ice. After sonication, the cells were centrifuged at 15,000g, for 15 min at 4 °C and subjected to biochemical assays.

Physical exercise program

The volunteers were subdivided into the Control Group: they did not participate in the exercise program; Chikungunya Group: did not participate in the exercise program, Chikungunya + EF Group: participated in the exercise program. The interventions took place in the community association of the neighborhood of Redenção, Vitória de Santo Antão - PE and were carried out with a weekly frequency of three times a week, lasting 40 minutes per session, and intensity of 50 70% of FCMax. The duration

of the program was 4 weeks, with 12 sessions of total training, the proposed program had predominance of the aerobic metabolic pathway.

Protein measurement

Protein concentration was measured by the Bradford method [16]. A BSA solution (2mg/mL) was used as standard.

Evaluation of Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Lipid peroxidation was evaluated by TBARS levels as previously described by Buege and Aust (1978) [17]. PBMCs (300 µg of protein) were sequentially mixed with 30% (w/v) Trichloroacetic acid (TCA) and 10mM TRIS buffer, pH 7.4. This mixture was centrifuged at 1180 g for 10 min and the supernatant was boiled for 15 min with 0.73% (w/v) thiobarbituric acid. The absorbance was measured at 535nm absorption using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA) at room temperature (RT). The results were expressed as µM/mg of protein.

Evaluation of protein oxidation by carbonyl levels

The protein oxidation was assessed using the procedures highlighted by Zanatta (2013) [18]. A 30% (w/v) TCA solution was added to the PBMCs (300 µg of protein) and then centrifuged for 15 min at 1180 g. The pellet was resuspended in 10mM 2-4 dinitrophenylhydrazine and immediately incubated in dark room for 1 h, centrifuged three times in ethyl/acetate buffer and the final pellet resuspended in 6M guanidine hydrochloride, with the absorbance read at 370nm (37°C) using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA). The results were expressed as µM/mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD) assay

SOD is an enzyme that catalyzes the dismutation of superoxide anion into another species, the hydrogen peroxide (H₂O₂). The determination of total SOD enzyme activity was performed according to the method of Misra and Fridovich (1972) [19]. PBMCs (300 µg) were incubated in sodium carbonate buffer (0.05%, pH 10.2, 0.1 mmol/L EDTA) in water bath at 37 °C. The reaction was started by addition of 30 mmol/L epinephrine dissolved in 0.05% acetic acid. Absorbance at 480 nm was determined after 4 min. One unit of SOD was defined as the amount of protein required to inhibit the auto-oxidation of 1 µmol de epinephrine per minute. The SOD activity was expressed as U/mg of protein.

Catalase (CAT) assay

CAT activity was performed as previously described by Aebi (1984) [20]. A 0.3 M hydrogen peroxide solution and PBMCs (150 µg of protein) were added to 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 at 37 °C and the absorption decay was monitored using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA) at 240 nm. One unit of CAT was defined as the amount of

protein required to convert 1 μmol of H_2O_2 per minute to H_2O . The CAT activity was expressed as U/mg of protein.

Glutathione-S-transferase (GST) assay

GST activity was measured as described previously by Habig and Jakoby (1974) [21]. Samples PBMCs (150 μg of protein) were incubated in a 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5 containing 1 mM EDTA at 30 °C and the assay started with the addition of 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and 158 mM glutathione reduced (GSH). The formation of 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione was monitored through the absorbance using a Biochrom Libra S12 Visible Spectrophotometer (Biochrom, USA) at 340 nm. The GST activity was expressed as U/mg of protein. One unit of enzymatic activity was defined as the amount of protein required to catalyze the formation of 1 mmol 2,4-dinitrophenyl-S-glutathione per minute.

Glutathione levels and Redox state

To assess GSH levels, the samples PBMCs (300 μg of protein) were firstly diluted in a 0.1 M phosphate buffer containing 5 mM EDTA, pH 8.0. Then, an aliquot from diluted sample was incubated with o-Phthaldialdehyde (OPT) at RT for exactly 15 min. Fluorescence intensities were measured at 420 nm and excitation at 350 nm in a spectrofluorimeter (FLUOstar Omega - BMG Labtech, USA) and compared with a standard curve of GSH known concentrations (0.25-10 nM) also incubated with OPT. To determine glutathione oxidized (GSSG) levels, the samples PBMCs (300 μg of protein) were incubated with 0.04 M N-ethylmaleimide for 30 min in RT followed by addition of 0.1 M NaOH buffer. When this mixture was ready, the same steps of the GSH assay were followed to determine the GSSG levels. The redox state was determined by GSH/GSSG ratio, as previously described by Hissin and Hilf (1976) [22].

Statistical analysis

All values are expressed as means \pm SEM. One-way ANOVA/Test t variance analysis was used to compare the data, followed by the TUKEY multiple-comparison post-test. The level of significance was maintained at 5% ($p < 0.05$). The statistical analysis was performed using GraphPad Prism, version 6.0® (GraphPad Software, Inc).

Results

Oxidative stress biomarkers in PBMCs of patients with chronic infection by CHIKV

Malondialdehyde (MDA) is a biomarker of oxidative stress and when elevated can affect membrane lipids and cause cell damage. The results showed that chronic CHIKV infection caused 212% increase in MDA levels in the Chikungunya group (GCHIKV) when compared to the control group (CG) ($\text{GC} = 2.071 \pm 0.13 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein vs $\text{GCHIKV} = 6.469 \pm 0.82 \mu\text{M}/\text{mg}$ protein, $p < 0.001$). There was no difference in MDA levels after physical exercise in the Chikungunya + Physical Exercise group (GCHIK+EF) when compared to GCHIKV ($\text{GCHIKV} = 6.469 \pm 0.82 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein vs $\text{GCHIK+EF} = 8.400 \pm 0.82 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, $p = 0.212$) (**Fig. 1A**). Regarding the evaluation of protein oxidation, the CHIKV group showed a 166% increase compared to the control group ($\text{GCHIKV} = 6.06 \pm 0.54 \mu\text{M} / \text{mg}$ of prot., vs $\text{GC} = 3.63 \pm 0.52 \mu\text{M} / \text{mg}$ of prot., $p = < 0.007$) in

the CHIKV + EF group a 41% decrease in carbonyl levels was observed in PBMCs when compared with the CHIKV group (GCHIKV = $6.06 \pm 0.54 \mu\text{M} / \text{mg prot.}$, vs GCHIK + EF = $3.56 \pm 0.64 \mu\text{M} / \text{mg prot.}$, $p < 0.03$) (Fig. 1B).

Enzymatic antioxidant activity in PBMCs of patients with chronic infection by CHIKV

The concentration increased of pro-oxidizing agents can be balanced by antioxidant defenses action. In this perspective, the antioxidant enzymes activity as SOD, CAT and GST were evaluated.

In the SOD activity, the results showed no difference between GC and GCHIKV groups (GC = 2.627 ± 0.45 U/mg of protein vs GCHIKV = 2.899 ± 0.36 U/mg of protein, $p = 0.87$); physical exercise did not significantly alter the SOD activity between GCHIKV and GCHIKV + EF groups (GCHIKV = 2.899 ± 0.36 U/mg of protein vs GCHIK + EF = 1.871 ± 0.30 U/mg of protein, $p = 0.18$) (Fig 2A)

CAT activity increased 242% in GCHIKV when compared to GC (GC = 0.247 ± 0.07 U/mg of protein vs GCHIKV = 0.846 ± 0.15 U/mg of protein, $p < 0.03$); after physical exercise there was no significant decrease between GCHIKV and GCHIKV + EF groups (GCHIKV = 0.846 ± 0.15 U/mg of protein vs GCHIK + EF = 0.662 ± 0.17 U/mg of protein, $p = 0.69$) (Fig 2B).

GST activity increased 80% in GCHIKV when compared to GC (GC = 0.051 ± 0.01 U/mg of protein vs GCHIKV = 0.092 ± 0.01 U/mg of protein, $p < 0.01$). After the physical exercise, GST activity decreased 55% in GCHIKV + EF when compared to GCHIKV (GCHIKV = 0.092 ± 0.01 U/mg of protein vs GCHIKV + EF = 0.05 ± 0.01 U/mg of protein, $p < 0.04$) (Fig 2C).

Non-enzymatic antioxidant activity in PBMCs of patients with chronic infection by CHIKV

Assessing the redox status of PBMCs, decrease of GSH levels (29%) was observed in GCHIKV when compared to GC group (GC = $911.1 \pm 38.91 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein vs GCHIKV = $647.5 \pm 33.48 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein $p < 0.0001$) and after physical exercise was observed decrease (34%) in GCHIKV + EF when compared to GCHIKV (GCHIKV = $647.5 \pm 33.48 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein vs GCHIKV + EF = $425.6 \pm 15.16 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, $p < 0.0009$) (Fig 3A).

GSSG levels increased 8% in PBMCs of GCHIKV when compared to GC group (GC = $35.10 \pm 0.52 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein vs GCHIKV = $38.10 \pm 0.57 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, $p < 0.007$). After the physical exercise, GSSG levels reduced 37% in GCHIKV + EF when compared with GCHIKV group (GCHIKV = $38.10 \pm 0.57 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein vs GCHIKV + EF = $23.88 \pm 1.02 \mu\text{M}/\text{mg}$ of protein, $p < 0.0001$) (Fig 3B).

There was 35% reduction on the redox state in GCHIKV when compared to GC group (GC = 26.071 ± 1.28 vs GCHIKV = 17.04 ± 0.96 , $p > 0.0001$). Physical exercise showed no significant difference between GCHIKV and GCHIKV + EF groups (GCHIKV = 17.04 ± 0.96 vs GCHIKV + EF = 18.57 ± 1.26 , $p = 0.63$) (Fig 3C).

Discussion

Chronic exposure to viral infections is a constant source of generation of reactive species, which can lead to oxidative stress [23,24]. In our study, we investigated changes in cellular redox status in PBMCs and the effect of an exercise program on chronic chikungunya fever patients. The pathophysiology of arthritogenic arboviruses is scarce, as well as the resources used to treat

individuals affected by arboviruses. Therefore, the importance of understanding the mechanisms related to the pathogenesis of chikungunya fever is necessary.

According to the results of this study, there was a difference in the oxidant / antioxidant balance in PBMCs of patients with chronic chikungunya fever. Being evidenced by the increase in biomarkers of lipid peroxidation and protein oxidation, represented by the increase in the levels of MDA and carbonyls. This finding is consistent with Banerjee and Mukhopadhyay [25], who observed elevated levels of MDA and carbonyls in the plasma of individuals with chronic chikungunya fever. A study using SH SY5Y cell lines of neuroblastoma infected with CHIKV showed high levels of MDA, 48 hours after infection by the virus [26].

Mayaro Virus (MAYV) is another species of the alphavirus genus, which has the same clinical manifestations of chikungunya fever, and an increase in oxidative stress biomarkers is also observed 24 hours after infection in human hepatocyte cells [7]. In other diseases caused by virus infections, such as Dengue, changes in the levels of biomarkers in plasma proteins are also found [27].

In addition to the assessment of oxidative stress biomarkers, we analyzed the antioxidant defense systems of PBMCs. In the results obtained, the antioxidant defenses of chronic GCHIKV patients exhibited an increase in the enzymatic activity of CAT, GST and no change in SOD activity was observed in PBMCs. This increase in CAT activity can be seen as an attempt to protect against oxidative damage caused by increased biomarkers, that is, CAT activity is increased in order to decrease the amount of H₂O₂ formed, which can lead to the formation of other reactive oxygen species, such as the hydroxyl radical (OH⁻) which is highly reactive.

Dhanwani et al (2012) observed a decrease in the transcriptional levels of CAT with the advance of infection after 48 hours by CHIKV [26]. It was found that 24 hours after CHIKV infection, human hepatocyte cells showed a reduction in CAT activity showing the result of the acute effect of the infection on the activity of this antioxidant enzyme [7].

GST is an important enzyme in the metabolic detoxification process. The increase in GST in PBMCs in the CHIKV group suggests a mechanism of attempted cell protection, in response to increased production of reactive species and inflammatory activity. Studies, such as Chen et al (2011), show that GST combats the deleterious effects of reactive species resulting from oxidative stress caused by viral infections [28]. It has been shown that in the plasma of patients with hepatitis B and in human epithelial cells of the airways infected by the respiratory syncytial virus, there has been an increase in GST activity [29,30]. The literature also shows that an increase in GST activity is related to an anti-inflammatory activity [31].

Glutathione in the cell is found in reduced (GSH) and oxidized (GSSG) form. GSH plays an important role in maintaining cellular redox status by participating in thiois disulfide exchange, which regulates various cellular functions, including gene expression and the activity of individual enzymes and enzyme systems. Maintaining the ideal GSH / GSSG ratio is essential for cell viability [32]. In our results, the PBMCs of patients infected with CHIKV showed a decrease in GSH levels, an increase in GSSG and a reduction in cellular redox status. The decrease in this proportion can serve as an indicator of damage to the cell's redox state and changes in dependent redox gene regulation. The consequences of the inadequate proportion of GSH / GSSG include significant changes in the

dependent redox cell signaling mechanism, controlled in a non-enzymatic and enzymatic manner, with the participation of GST and glutaredoxin isoforms [32].

In viral infections, glutathione has shown great importance since it is responsible for the regulation of the immune response [33]. Infections with influenza virus, rhinovirus and hepatitis show decreased levels of intracellular GSH [34,35].

According to our results, oxidative stress occurs in immune cells of patients in the chronic phase of chikungunya fever, mainly due to less action by the non-enzymatic antioxidant system. This mechanism of increased oxidative stress can be related to the pathogenesis of the disease, as well as being related to the chronic joint inflammatory process, since patients report polyarthralgia. It is known that the metabolic function in cells isolated from human blood for treatment and diagnosis of diseases is a new and important research area [36].

To date, there is no consensus in the literature on the effect of physical exercise on oxidative balance in individuals affected by arboviruses. However, in general, the practice of physical exercise emerges as a therapeutic adjuvant for inflammatory diseases, and often promotes increased enzyme antioxidant defense [37,38]. However, a decrease in the GSH / GSSG ratio of MDA has already been observed in erythrocytes of HIV patients after physical training [39].

The patients who underwent our physical exercise program showed a decrease in the levels of carbonyls, GSH, GSSG and in the activity of GST, without changes in the other components of the enzymatic antioxidant system of PBMCs. To our knowledge, this is the first study to investigate the effect of 12 sessions of physical exercise on PBMCs of patients with chronic CHIKV infection. We can assume that the number of sessions performed was not sufficient to induce positive modulations in the enzyme activities evaluated in this study. However, it is noteworthy that although there was no improvement in the PBMC redox balance, the exercise protocol used did not induce oxidative damage, since there was no increase in oxidative stress biomarkers or a decrease in post-cell redox status. -exercise.

Conclusion

Our results suggest that in PBMCs of patients affected by chronic phase chikungunya fever, there is an imbalance between the production of ROS and the antioxidant defense system, generating a picture of oxidative stress. The physical exercise program model used in this study did not change the redox state. These findings indicate that new approaches are needed to understand the mechanisms caused by alphaviruses, since arthritogenic arboviruses are a growing public health problem.

Acknowledgments

The authors thank the financial support provided by the (FACEPE 10/2017 - PPSUS 2017 - 10/2017) - PROCESS No. APQ-0746-2.11 / 17

References

1. Pialoux et al (2007) Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **The Lancet infectious diseases**. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70107-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70107-X)
2. Carey et al (1969) The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(69\)90030-3](https://doi.org/10.1016/0035-9203(69)90030-3)
3. Robinson, Marion C (1955) An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. [https://doi.org/10.0035-9203\(55\)90080-8](https://doi.org/10.0035-9203(55)90080-8)
4. An, Wenxi et al (2017) Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**. <https://doi.org/10.1007/s12250-017-4072-x>
5. Borgherini et al (2007). Outbreak of chikungunya on Reunion Island: early clinical and laboratory features in 157 adult patients. **Clinical infectious diseases**. <https://doi.org/10.1086/517537>
6. Rahman; Biswas; Kode (2006) Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European journal of pharmacology**. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.087>
7. Camini, F.C., da Silva Caetano, C.C., Almeida, L.T. et al. Arch Virol (2017) 162: 907. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3187->
8. Halliwell, Barry (1996). Antioxidants in human health and disease. **Annual review of nutrition**. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.16.070196.000341>
9. Bartels, Dorothea; DINAKAR, Challabathula (2012). Light response, oxidative stress management and nucleic acid stability in closely related Linderniaceae species differing in desiccation tolerance. **Planta**. doi: [10.1007/s00425-012-1628-8](https://doi.org/10.1007/s00425-012-1628-8)
10. Halliwell, Barry (2012). Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
11. Dhanwani, Rekha et al (2011) Differential proteome analysis of Chikungunya virus-infected new-born mice tissues reveal implication of stress, inflammatory and apoptotic pathways in disease pathogenesis. **Proteomics**. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000500>
12. Dhanwani, Rekha et al (2012) Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus research**. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.009>
13. Banerjee, Nilotpal; Saha, Bibhuti; MUKhopadhyay, Sumi (2018) . Intracellular ROS generated in chikungunya patients with persisting polyarthralgia can be reduced by *Tinospora cordifolia* leaf extract. **VirusDisease**. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0465-1>
14. Filippin, Lidiane Isabel et al. (2008) Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. **Clinical & Experimental Immunology**. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03634.x>
15. Takahashi M, Miyashita M, Park JH, et al. The association between physical activity and sex-specific oxidative stress in older adults. *J Sports Sci Med*. 2013;12(3):571–578. Published 2013 Sep 1.
16. Bradford (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

17. Buege, John A.; Aust, Steven D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. In: **Methods in enzymology**. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
18. Zanatta, Ângela et al (2013). Neurochemical evidence that the metabolites accumulating in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency induce oxidative damage in cerebral cortex of young rats. **Cellular and molecular neurobiology**. <https://doi.org/10.1007/s10571-012-9879-2>
19. Misra, Hara P.; Fridovich, Irwin (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**. <http://www.jbc.org/content/247/10/3170.full.html#ref-list-1>
20. Aebi, Hugo (1984) Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
21. Habig, W. H.; Jakoby, W. A (1981). Assay for differentiation of GST. **Method Enzymol**, v. 77, p. 735-740, 1981. <http://hdl.handle.net/2346/20359>
22. Hissin, Paul J.; Hilf, Russell (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical biochemistry**. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90326-2
23. Peterhans, Ernst (1979). Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. **Biochemical and biophysical research communications**. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)90630-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)90630-2)
24. Reshi et al (2014). RNA viruses: ROS-mediated cell death. **International journal of cell biology**. <https://doi.org/10.1155/2014/467452>
25. Banerjee et al (2018). Intracellular ROS generated in chikungunya patients with persisting polyarthralgia can be reduced by *Tinospora cordifolia* leaf extract. **VirusDisease**. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0465-1>
26. Dhanwani et al (2012). Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus research**. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.12.009>
27. Soundravall et al (2008). Oxidative stress in severe dengue viral infection: association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. **Platelets**. <https://doi.org/10.1080/09537100802155284>
28. Chen et al (2011). Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative stress. **ACS nano**. <https://doi.org/10.1021/nn202451x>
29. Hosakote et al (2011). Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *American journal of respiratory and critical care medicine* <https://doi.org/10.1164/rccm.201010-1755OC>
30. Zhao et al (2013). Peripheral type I interferon receptor correlated with oxidative stress in chronic hepatitis B virus infection. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 33, n. 8, p. 405-414, 2013. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0153>
31. Leong et al (2016). Differential action between schisandrin A and schisandrin B in eliciting an anti-inflammatory action: The depletion of reduced glutathione and the induction of an antioxidant response. **PloS one**. doi: 10.1371/journal.pone.0155879
32. Kalinina et al (2014). Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. **Biochemistry (Moscow)**. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130082>
33. Forman et al (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular aspects of medicine**. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>
34. Ciriolo et al (1997). Loss of GSH, oxidative stress, and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection. *Journal of Biological Chemistry*, doi: 10.1074/jbc.272.5.2700
35. Acar A, Görenek L, Aydin A, et al. [Investigation of oxidative stress and antioxidant defense in patients with hepatitis B virus infection and the effect of interferon-alpha plus lamivudine combination therapy on oxidative stress]. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2009 Jul;43(3):411-423.
36. Busquets et al (2018). Peripheral Blood Mononuclear Cells Antioxidant Adaptations to Regular Physical Activity in Elderly People. *Nutrients*. <https://doi.org/10.3390/nu10101555>

37. Margaritelis et al (2018) . Adaptations to endurance training depend on exercise-induced oxidative stress: exploiting redox interindividual variability. *Acta Physiologica*. <https://doi.org/10.1111/apha.12898>
38. Kruk et al (2019). Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. **Free radical research**. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1612059>
39. Deresz et al (2018). Exercise training reduces oxidative stress in people living with HIV/AIDS: a pilot study. **HIV clinical trials**. <https://doi.org/10.1080/15284336.2018.1481247>

Figures List

Fig. 1 Effect of physical exercise on oxidative stress biomarkers in PBMCs of patients with chronic CHIKV infection. Malondialdehyde, MDA (A) and Carbonyl (B) levels. The graphs were expressed as mean \pm EPM considering a significance level of * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$

Fig. 2 Effect of physical exercise on enzyme antioxidant activity in PBMCs of patients with chronic CHIKV infection. Superoxide Dismutase, SOD (A), Catalase, CAT (B) and glutathione-S-transferase (GST) (C). The graphs were expressed as mean \pm SEM, considering the significance level of * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$

Fig. 3 Effect of physical exercise on the non-enzymatic antioxidant system in PBMCs of patients with chronic CHIKV infection. Levels of reduced glutathione (GSH) (A), oxidized glutathione (GSSG) (B) and GSH / GSSG ratio (C). The graphs were expressed as mean \pm SEM, considering the significance level of * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$

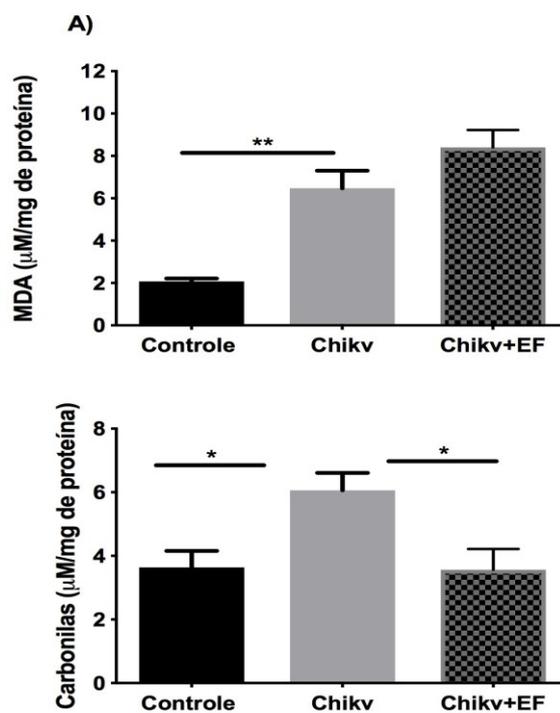


Figure 1

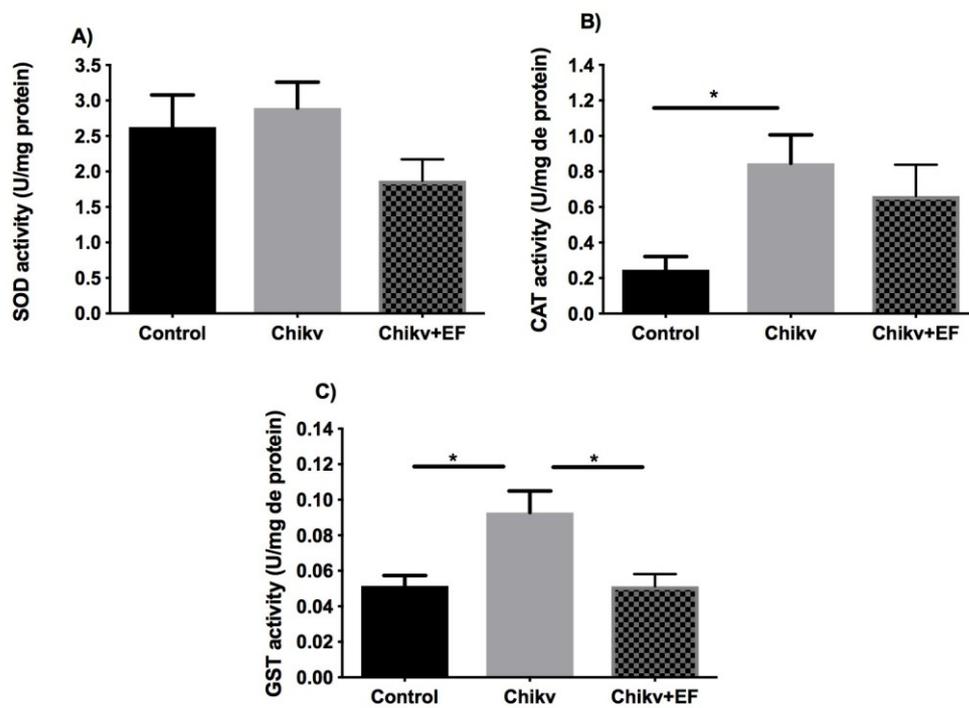
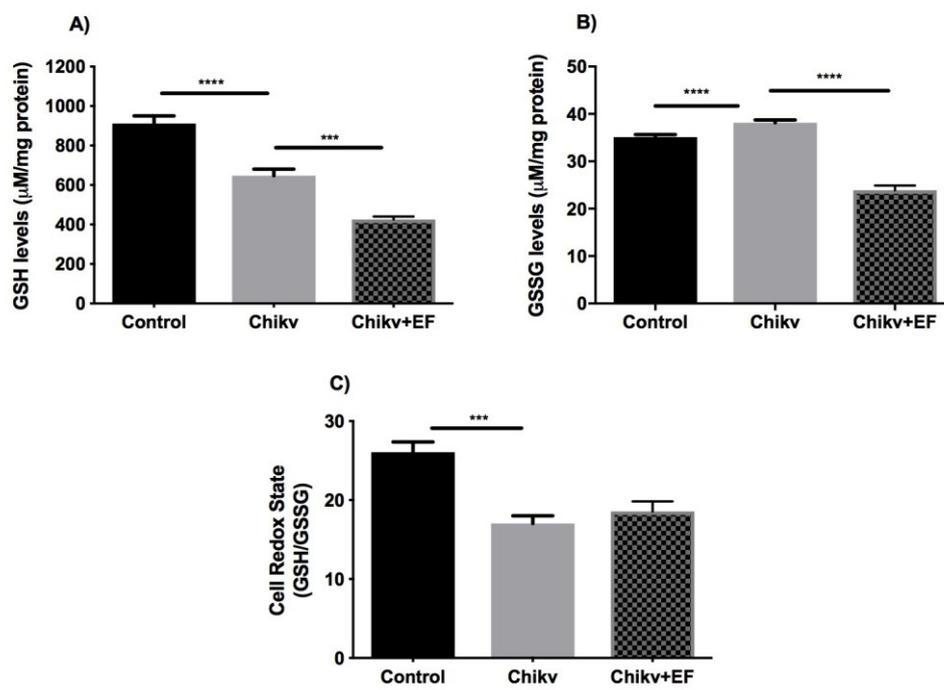
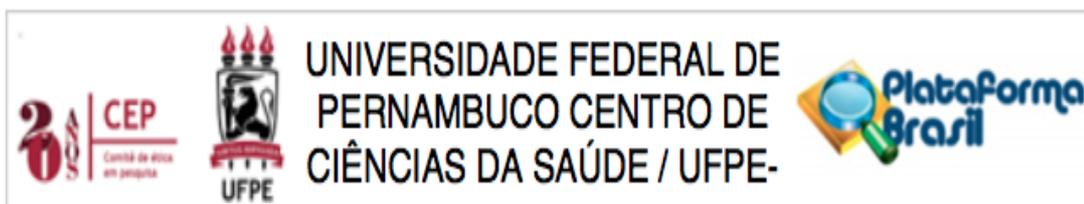


Figure 2



ANEXO A – PARECER COMITE DE ETICA**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: Perfil epidemiológicos e Implicações na qualidade de vida de pacientes com infecção crônica pelo vírus Chikungunya

Pesquisador: ANA LISA DO VALE GOMES

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 72123817.4.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FACEPE
Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.459.058

Apresentação do Projeto:

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Perfil epidemiológico e Implicações na Qualidade de Vida de Pacientes com Infecção Crônica pelo vírus Chikungunya**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora **ANA LISA DO VALE GOMES**, R. Prof. Bandeira 310/01, São Vicente de Paula, Vitória de Santo Antão. CEP: 556-4-150 – TEL: 81-992125752, analisaagomes@gmail.com. Também participam os alunos entrevistadores André Santiago (81-997233018), Débora Priscila (81-998662897), Ana Paula (87-991646889), Wanessa Santana (81-999397808), , **Marcella Adriana** (81 -099880733) e Talita Rafaela (81-986376720) sob a orientação da Professora Dra. Ana Lisa Gomes.

Caso você não compreenda as informações contidas neste Termo de Consentimento, as dúvidas poderão ser esclarecidas pela pessoa que está lhe entrevistando. Ao final, quando todos os esclarecimentos lhe forem dados e caso concorde com a sua participação no estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine este documento, que possui duas vias. Uma via ficará com você e a outra ficará com o pesquisador responsável. Você participará como voluntário e poderá deixar o estudo no momento que desejar. Caso não concorde em participar, não haverá nenhuma penalização para você.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- O objetivo da pesquisa consiste em fazer um levantamento para identificar pessoas que tenham sido infectadas com o vírus da Chikungunya e detectar problemas na qualidade de vida desses indivíduos. O estudo também investigará a relação entre a prática de atividade física e a cronicidade dos sintomas da doença. Os pesquisadores envolvidos no projeto irão entrevistar você com a ajuda de três questionários específicos, convida-lo a coleta de sangue em sua residência de forma privativa e individual e com rigor nos cuidados de segurança e convidará você a participar de um programa de treinamento de atividade física por um período de 3 a 6 meses. A partir dos resultados será possível identificar se a doença prejudica a sua qualidade de vida e também se a atividade física faz você se sentir melhor, mesmo que ainda sinta as dores da doença.
- Caberá ao projeto dar orientações sobre infecções transmitidas por mosquitos, como modos de identificação de focos, prevenção e quando buscar o serviço de saúde, além dos benefícios da prática da atividade física.
- Os voluntários poderão ser convidados a responderem aos questionários até duas vezes durante este projeto. |
- Serão colhidos 20 ml de sangue por punção de veia do braço

ANEXO C - CAPÍTULO 1 IMPACTOS DA INFECÇÃO CRÔNICA DO VÍRUS CHIKUNGUNYA: UMA REVISÃO

Ramon Nascimento da SILVA ¹

Talitta Ricarly Lopes de Arruda LIMA ²

Allifer Rosendo PEREIRA ³

Mariana Pinheiro FERNANDES ^{1,3}

Ana Lisa do Vale GOMES ^{1,4}

¹ Programa de Pós graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica – UFPE, Vitória de Santo Antão – PE; ² Programa de Pós Graduação em Nutrição – UFPE, Recife – PE; ³ Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte – UFPE, Vitória de Santo Antão – PE; ⁴ Núcleo de Enfermagem – UFPE, Vitória de Santo Antão – PE.
analisagomes@gmail.com

RESUMO: A chikungunya é uma arbovirose cujas as manifestações clínicas são febre alta de início súbito, cefaléia, calafrios, erupções cutâneas, mialgia e dor articular intensa dividido em três fases: aguda, subcrônica e crônica, sendo a última caracterizada pela poliartralgia, que pode durar meses e até anos. Dentre os sintomas clínicos observados na fase aguda a poliartralgia ocorre de maneira mais regular com potencial de ser incapacitante, afastando os indivíduos das suas atividades de vida. Não há tratamento específico, sendo os anti-inflamatórios (esteroides ou não), somados a imunossupressores e terapias manuais despontam como recursos básicos no combate aos sintomas clínicos da fase aguda e o exercício físico emerge como meio de tratamento não farmacológico promovendo aptidão física e autossuficiência funcional indicado na fase subcrônica e crônica. Esta revisão tem como objetivo apresentar informações sobre o vírus e a doença, atualizar o conhecimento e identificar pontos que precisam ser melhor explicados e sugestões de melhoria acerca da doença, prognóstico e qualidade de vida desses pacientes.

Palavras-chave: Aspectos Clínicos. Epidemiologia. Tratamento da Chikungunya.

INTRODUÇÃO

O vírus Chikungunya (CHIKV) é o responsável por causar uma doença com características agudas consideradas clássicas para infecções virais, no entanto, com um importante acometimento em pacientes também na fase crônica. A fase crônica pode se observada em aproximadamente 1/3 da população infectada e que tenha

tido a forma sintomática da doença, com duração de meses e atualmente podem ser identificadas sequelas por mais de 6 anos.

Uma outra característica da fase crônica é o fato de que ela pode ser intermitente, onde os relatos dos pacientes constam que alguns dias a doença “aparece” e outros dias eles estão bem. Os acometimentos mais relatados remetem a complicações músculo-articulares que podem também representar prejuízos sociais, emocionais e econômicos. Isso porque esses indivíduos ficam debilitados e não conseguem executar suas atividades físicas habituais, compromissos sociais e rotina de trabalho, o que leva também a comprometimento financeiro, tanto para empregados como para empregadores. Já foram relatados também pacientes com quadros depressivos e isso levanta a hipótese se a infecção viral pode disparar essa patogenia ou o indivíduo já seria predisposto e com o quadro de incapacidade funcional e social da fase crônica a doença encontraria situação favorável a se estabelecer. Esse é um grande questionamento quando se estuda o motivo pelo qual o CHIKV tem essa fase crônica tão severa, o que difere da grande maioria das infecções virais. O questionamento seria: a fase crônica realmente leva a todas as doenças identificadas como secundárias a infecção ou o paciente já era predisposto e o vírus aceleraria esse aparecimento?

No Brasil houve um grande surto onde mais de 200 mil casos foram notificados, sendo as regiões sudeste e nordeste as mais afetadas. Os impactos causados pelo CHIKV e sua rápida taxa de propagação no Brasil foram o suficiente para estabelecer um estado de emergência de saúde pública emitido pelo Ministério da Saúde e pela Organização Mundial da Saúde, quase dois anos após a entrada do vírus no país (FIGUEREDO, 2017; AGUIAR, et al. 2018). Os custos associados aos danos do CHIKV são altos e envolvem investimentos das autoridades, tais como combate às espécies de vetores com larvicidas, inseticidas e ovitrampas, custos de recursos de profissionais e estruturas médicas com os pacientes nas diferentes fases da infecção (GUZZETTA, et al. 2016; CARDONA-OSPINA, et al. 2015). A luta contra os arbovírus emergentes exige políticas e intervenções que envolvam vários setores da sociedade, não apenas o setor da saúde.

São várias as lacunas observadas quando o assunto é a infecção viral pelo CHIKV e esse estudo tem como objetivo apresentar informações sobre o vírus e a doença, atualizar o conhecimento e identificar pontos que precisam ser melhor

explicados e sugestões de melhoria acerca da doença, prognóstico e qualidade de vida desses pacientes.

MATERIAS E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido através de uma revisão bibliográfica acerca do CHIKV e suas implicações para a saúde, a busca de periódicos foi realizada em bases de dados eletrônicos (Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS), e (PUBMED). Os seguintes descritores, em língua portuguesa e inglesa, foram considerados: vírus chikungunya, aspectos clínicos, epidemiologia, tratamento, diagnóstico. Utilizou-se os operadores lógicos “AND”, “OR” e “AND NOT” para combinação dos descritores e termos utilizados para rastreamento das publicações. Como critérios de inclusão, foram considerados artigos, no intervalo temporal de 2013 a 2018, que contemplassem os descritores utilizados. Como critérios de exclusão, foram descartados os artigos que não pertenciam ao intervalo de tempo de 2013 a 2018.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A febre Chikungunya é uma arbovirose considerada uma doença re-emergente de impacto na saúde pública que tem se disseminado rapidamente pelos diversos continentes e encontrou no Brasil condições ambientais, sociais e de infraestrutura pública que favoreceram o estabelecimento de um quadro epidêmico. A virose é causada pelo CHIKV e transmitida por insetos vetores, por isso chamada de arbovirose. Ainda que apresente baixa taxa de mortalidade, os sintomas e as condições crônicas da doença destacam que a mesma não deva ser ignorada (GANESAN et al. 2017).

A doença foi observada pela primeira vez durante um surto na Tanzânia em 1952-1953 e até 2004, surtos pontuais aconteceram até que a partir de 2005 foram observados focos epidêmicos em diferentes regiões do planeta, caracterizando a re-emergência do CHIKV. A febre Chikungunya inicialmente tratava-se de uma doença infecciosa que acometia primatas, entretanto, processos adaptativos permitiram que o vírus passasse a infectar humanos (OGDEN, et al. 2017). Na linguagem nativa da

Tanzânia chikungunya significa “aquele que se curva”, característica de pacientes acometidos pela doença (MORRISON, 2014). Os principais sintomas são dores musculoesqueléticas, erupções cutâneas e febre na fase aguda, em alguns casos, os indivíduos podem apresentar artralgia, artrite, fadiga e depressão a longo prazo, que podem gerar incapacidade funcional ou até mesmo levar a morte (BURT, et al. 2017; BRITO, 2017).

A transmissão do vírus regularmente ocorre através de um ciclo humano infectado-mosquito-humano, e raramente ocorre de forma materno-fetal direta, todavia, representa alto risco de contaminação fetal principalmente nos 4 dias que precedem o parto (DOTTERS-KATZ et al. 2015; TSETSARKIN et al. 2016). Após a picada pelo mosquito transmissor ocorre a inoculação do CHIKV nos capilares subjacentes à pele, infectando algumas células locais, como os macrófagos, fibroblastos e células endoteliais, que se deslocam para órgãos que os protegem contra a ação do sistema imunológico (FIGUEREDO, 2016). Mutações em genes que codificam proteínas específicas tornaram o ciclo viral enzoóticos em ciclo apizoótico, resultando no surgimento do *Aedes albopictus* como um segundo vetor além do *Aedes aegypti*, aumentando rapidamente a distribuição geográfica do vetor (TANAY, 2017)

O CHIKV tem a taxa de ataque variando entre 50 a 90% da população, onde os sujeitos infectados podem apresentar três fases clínicas: fase aguda, fase subcrônica e fase crônica (SIMON et al. 2015). A fase aguda é o período correspondente as 3 primeiras semanas após a inoculação do vírus. Após o período de incubação (4 a 7 dias), cerca de 60% dos indivíduos são acometidos pelos sintomas da fase aguda com duração de aproximadamente 14 dias, os mais comuns são febre alta e de difícil controle farmacológico, artralgia inflamatória e artrite seguida de fortes dores e inchaço afetando principalmente as articulações interfalângicas, pulsos e tornozelos, com baixa responsividade a analgésicos (AN et al. 2017; SIMON 2015).

Os sintomas da fase subcrônica se manifestam entre o 15° ao 90° dia, dentre as características mais comuns podemos observar a permanência da artrite e a propagação da inflamação para estruturas adjacentes a articulação como tendões e ligamentos, assim como dano vascular periférico (AN et al. 2017; SIMON, 2015).

A fase crônica pode ser observada em 1/4 a 1/3 da população com a infecção sintomática, sendo caracterizada pela persistência dos sintomas clínicos após o

período de 90 dias e pode durar meses ou até anos, onde os sintomas mais observados são dores articulares, fibromialgia, espondiloartrite e depressão. É comum que pacientes com histórico de doenças articulares sejam os mais afetados, entretanto, indivíduos que nunca apresentaram quadro clínico de doenças articulares podem desenvolvê-las após infectados (SIMON et al. 2015; BLETTY, et al. 2016).

Danos neurológicos, apesar de pouco recorrentes, foram relatados e podem afetar indivíduos na fase crônica. Nesses casos, o vírus afeta os astrócitos (células do sistema nervoso central responsável pela nutrição dos neurônios) prejudicando o aporte de nutrientes para as células do SNC acarretando morte celular e disfunção desse sistema (INGLIS, et al. 2016). Dentre os casos clínicos associados a disfunções neurológicas estão presentes encefalite, neuropatia óptica, neurorretinite e síndrome de Guillian-Barré, com maior ocorrência em adultos. Mulheres em idade avançada, comorbidades e gravidade na fase aguda apresentam relação direta com os sintomas persistentes (CERNY, et al. 2017). O CHIKV leva a sequelas de longo prazo em uma proporção considerável de pacientes, interferindo significativamente na qualidade de vida. Assim, as sequelas crônicas do CHIKV devem ser levadas em consideração quando se lida com esta doença devido ao seu importante efeito na saúde pública e individual (VAN AALST et al. 2017).

A grande taxa de propagação, adaptação a novos habitats e hospedeiros, assim como os efeitos deletérios causados nos pacientes, tornam os arbovírus um problema de saúde pública no mundo e no Brasil (DONALISIO, 2017). A urbanização descontrolada surge como um outro fator importante na propagação do vírus, o crescimento populacional em áreas desprotegidas dos cuidados básicos de controle vetorial, torna-se um grande berço de surtos epidemiológicos (VEJA-RÚA, et al. 2014).

Duas espécies principais de mosquitos do gênero *Aedes*: *aegypti* e *albopictus*, são capazes de transmitir em ambientes urbanos, além da dengue, outras arboviroses como a febre Chikungunya e a sua transmissão ocorre em um ciclo humano-mosquito-humano (DIALLO et.al 2012; ZARA et.al., 2016). O primeiro relato da febre Chikungunya aconteceu em 1952 nos planaltos de Makonde, ao longo das fronteiras entre a Tanzânia e Moçambique. Surtos da chikungunya foram também notados nos países da África, Ásia, Europa e Américas (LO PRESTI et al., 2014).

O CHIKV tem sido responsável por epidemias de grande magnitude, onde surtos epidêmicos foram na maior parte esporádicos na África e no Sudeste Asiático até 2004. Em 2005, um surto de infecção ocorreu nas ilhas do Oceano Índico, quando na Ilha da Reunião, 38,2% dos 785.000 habitantes foram infectados entre março de 2005 e setembro de 2006 (SILVA, DERMODY; 2017). O CHIKV disseminou-se para mais de 22 países; em Ravena, região da França obtiveram registros dos primeiros casos no ano de 2010. A detecção na Região das Américas ocorreu em 2013, na ilha de Saint-Martin, no Caribe. Na Polinésia Francesa durante o período de outubro de 2014 a março de 2015, ≈25% da população local (272.000 residentes) foi infectada pelo Chikungunya (SUK, SEMENZA, 2014; NHAN, MUSSO, et al., 2015; DA CUNHA, TRINTA, et al., 2017).

No Brasil, o surgimento dos primeiros casos se deu em junho de 2014 e no mês de setembro foi detectado o primeiro caso no estado do Amapá, e ainda em setembro um surto de CHIKV ocorreu em Feira de Santana, na Bahia. Dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, registraram 38.499 casos prováveis da febre chikungunya com taxa de incidência de 18,8 casos/100 habitantes, distribuídos em 704 municípios, dos quais 17.971 foram confirmados nas semanas epidemiológicas 1a a 52a no ano de 2015. Em 2016, até a 50a semana epidemiológica, foram registrados 265.554 casos prováveis da febre chikungunya no país, com uma taxa de incidência de 129,9 casos/100 mil habitantes. Esses casos prováveis estão distribuídos em 2.785 municípios; destes, 146.914 (55,3 %) foram confirmados (NUNES et al., 2015; LIMA-CAMARA, 2016; MS, 2016). Todos esses eventos estabelecem o CHIKV como um patógeno global e dessa forma tornando-se um problema de saúde pública.

Em 2018, até 34a semana epidemiológica (31/12/2017 a 25/08/2018), foram registrados 72.117 casos prováveis de febre de chikungunya no país, com uma incidência de 34,7 casos/100 mil habitantes, destes, 50.356 (69,8%) foram confirmados e outros 17.910 casos suspeitos foram descartados. Laboratorialmente na 34ª semana epidemiológica, 22 óbitos foram confirmados por chikungunya e existem ainda 51 óbitos em investigação que podem ser confirmados ou descartados. No mesmo período de 2017, foram confirmados 186 óbitos e existiam 30 óbitos em investigação. Todos esses eventos estabelecem o CHIKV como um patógeno global e dessa forma tornando-se um problema de saúde pública. Houve

também confirmação de 14 óbitos por febre chikungunya, nos estados da Bahia (5 óbitos), Sergipe (2 óbitos) e Pernambuco (7 óbitos) (MS, 2017).

A presença durante todo o ano de vetores relevantes, especialmente em centros urbanos densamente povoados representa um grande risco do vírus se tornar endêmico em regiões tropicais (KRAEMER et al.2015). O panorama atual requer a obtenção de dados atualizados, confiáveis e precisos para alertar a ocorrência de surtos e epidemias relacionados, uma vez que a doença compõe a lista de doenças com notificação obrigatória (SILVA et al, 2018). As notificações no Sistema de Informação de Agravos de Notificação online (Sinan Online) devem ser realizadas de maneira correta e com frequência estabelecida para a tomada de decisão sobre as ações de vigilância em saúde, o que nem sempre ocorre (MS, 2016).

O controle de vírus transmitido por mosquitos é destinado a reduzir a população dos mosquitos, não se sabe sobre níveis limítrofes de populações de *Aedes aegypti* que são necessárias para a transmissão do Chikungunya. No Brasil, os agentes comunitários de endemias em parceria com a população, são responsáveis pelo controle do vetor: controle mecânico (destruição de reservatórios de água que possam servir de depósito para os ovos do vetor, instalação de telas em portas e janelas) e controle químico (produtos químicos para matar larvas e insetos adultos) (MANRIQUE et al., 2015; CARVALHO et al., 2015; OON, NG, 2014).

O CHIKV pertence a família *Togaviridae* que é dividida em dois gêneros: *Alfavírus* e *Rubivírus*. O CHIKV é do gênero *Alfavírus* e do grupo dos alfavírus do velho mundo chamado Floresta do Semliki, onde também estão os vírus *O'nyong-nyong* e o vírus do Ross River (AN, et al., 2017; HOWLEY et al., 2013).

O *Alfavírus* inclui mais de 30 espécies que podem ser classificadas antigenicamente em pelo menos 8 complexos e apresenta vírus responsáveis por uma grande variedade de doença que acometem humanos, primatas não humanos, equinos, aves, anfíbios, répteis, roedores e ovinos. Exemplos com o CHIKV e o vírus da encefalite equina são responsáveis por surtos epidêmicos em diferentes partes do planeta o que é explicado, uma vez que em sua maioria são vírus com transmissão por insetos, predominantemente mosquitos, caracterizados assim como arboviroses. Alguns alfavírus são identificados como específicos de insetos *Vírus Eilat*, *Vírus da Floresta Tai*, por exemplo, ou aquáticos como o *Vírus da doença do*

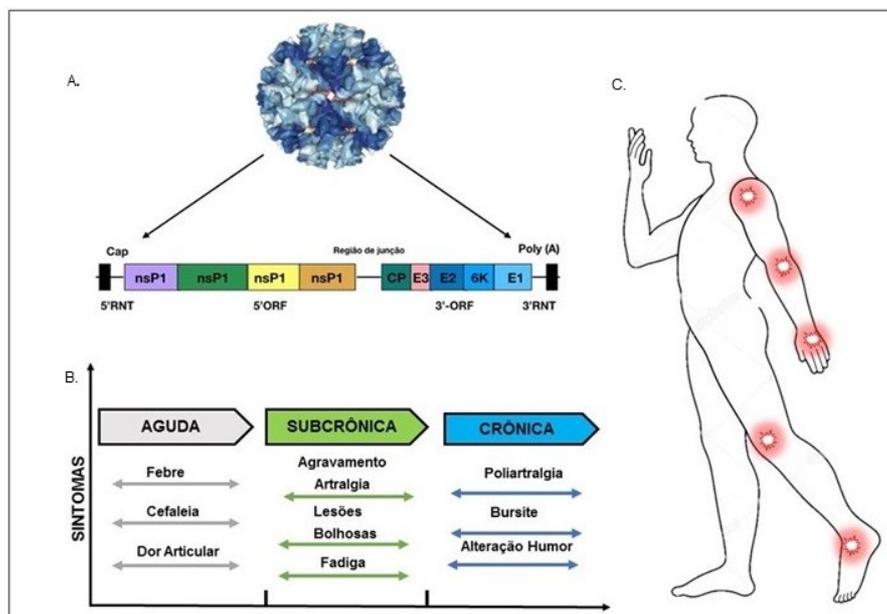
pâncreas do salmão, aparentemente com transmissão horizontal (HOWLEY et al., 2013; CHEN et al., 2018).

CHIKV é um vírus envelopado, com capsídeo formado por uma única proteína, organizado em arranjos icosaédricos com simetria T-4. O nucleocapsídeo é protegido pelo envelope lipídico derivado da membrana plasmática da célula hospedeira do vírus e contém as glicoproteínas E1 e E2. Sendo essas proteínas presentes em heterodímeros que são agrupados em trimeros na superfície do vírion com arranjos de 240 cópias de capa proteína interagindo com as 240 cópias do capsídeo. O RNA tem fita simples com polaridade positiva, aproximadamente 11,8 kb com C_{AP} na terminação 5' e cauda poliA na terminação 3' do genoma. Apresentando duas ORFs: na terminação 5' são codificadas as proteínas não estruturais e de replicação (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) e na terminação 3' as proteínas estruturais (C, E3, E2, 6K e E2) (HOWLEY et al., 2013) e são organizados na seguinte ordem: 5' cap-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-(região de junção)-C-E3-E2-6K-E1-poly(A)-3' (FIGURA 1 A.) (HOWLEY et al., 2013).

As regiões utilizadas para diagnóstico molecular são as dos genes nsP1 e nsP4 por serem as mais conservadas no genoma, enquanto que a terminação C do gene nsP3 corresponde as regiões genômicas mais conservadas (An, et al., 2017; OKEOMA, 2016).

A origem dos alfavírus ainda não está totalmente esclarecida, onde a análise do genoma parcial sugere a origem tanto nas Américas como no Velho Mundo. Porém quando considerado o genoma inteiro a origem passa a ser relacionada aos alfavírus aquáticos transmitidos por piolhos. Apesar de ser um vírus de RNA, apresenta uma baixa taxa de mutação ($1-7 \times 10^{-4}$ substituição/ nucleotídeo/ ano), sugerindo que o fitness viral é mantido pelos vetores vertebrados e invertebrados (Figura 1)

Figura 1. A. Crio-microscopia eletrônica e esquema representativo do genoma do CHIKV. B. Representação gráfica com pontos de maior acometimento nos pacientes com infecção crônica. C. Identificação das regiões do corpo com maior incidência de lesões na fase crônica da infecção pelo CHIKV.



Fonte: A. (AS Rose et al., 2018). B e C. Autoria própria.

A origem do vírus teria sido africana e introduzida na Ásia na década de 70, com a descoberta do CHIKV, em 1952, no surto da artrite febril. Estudos filogenéticos identificaram três genótipos do vírus: Oeste africano, Sul da África Oriental e Asiática, com diferença genômica em torno de 15% e os três genótipos com registros de infecção em humanos (OKEOMA, 2016). Depois de uma época com surtos esporádicos, foi observado a re-emergência do vírus onde a análise filogenética sinaliza que as cepas virais circulantes em ilhas do oceano Índico tiveram origem no Kenya e sofreram uma separação aos vírus que se espalharam para o Sri Lanka, Ilhas da Reunião, Cingapura e ilhas Maldivas (An, W., 2017; HOWLEY, 2013; DIAS, et al., 2018).

Baseado nas análises de mudanças genéticas é sugerido que a seleção positiva exercida pela resposta imune celular nos CHIKV tem fortalecido a transmissibilidade do vetor *Aedes albopictus* como importante elemento nos surtos do vírus, principalmente nas zonas rurais. A adaptação do CHIKV, genótipo Asiático a essa espécie de *Aedes* foi possível pela interação entre a treonina E1-98 e a substituição adaptativa E1-226 de alanina para valina. Essa pode ser considerada uma explicação a forte e predominante substituição das cepas endêmicas em muitos países e que pode ter aumentado a virulência das mesmas (HOWLEY, 2013).

A detecção da viremia do CHIKV é o método padrão ouro e mais específico de diagnóstico, mas devido à ausência de uma infraestrutura nacional adequada

para detectar esse vírus por métodos moleculares e aos custos envolvidos com estas técnicas, nem todos os indivíduos são diagnosticados durante a fase aguda da doença. A infecção pode ser virologicamente confirmada precocemente através do isolamento do vírus a partir de amostras de soro, plasma, sangue total ou tecido, utilizando cultura de células, inoculação de mosquito ou inoculação intracerebral de ratos. O diagnóstico através do isolamento viral é altamente específico (100%), mas não suficientemente sensível. Um método alternativo que rastreia o vírus no espécime, é a detecção de antígenos virais utilizando as técnicas de ELISA ou ensaio de imunocromatografia (ICA), cuja janela de detecção se estende alguns dias após a viremia (An et al., 2017).

Nos primeiros 5-7 dias da infecção, detecções de ácido nucleico do CHIKV são mais amplamente utilizadas no diagnóstico precoce devido à sua sensibilidade e rapidez. Técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase transcricional (RT-PCR) e/ou em tempo real (RT-PCR), ensaio de amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) usando primers específicos para genes estruturais e não estruturais são ferramentas úteis no diagnóstico rápido do CHIKV. A sensibilidade e especificidade de métodos genéticos desenvolvidos para o diagnóstico do CHIKV podem chegar a 100%. Embora a detecção do RNA viral seja a maneira mais apropriada para uma rápida identificação do vírus, seu uso ainda é limitado pelo estreito período de janela durante a primeira semana da doença. Um teste ideal para infecção aguda por CHIKV é uma combinação de métodos genéticos com outros métodos diagnósticos que funcionam após o período de viremia (Johnson et al., 2016b).

Normalmente uma semana após o início da doença, a viremia é eliminada pelo sistema imunológico do hospedeiro. Nesse período, o diagnóstico do CHIKV pode ser feito pela detecção de anticorpos para imunoglobulinas M-IgM e imunoglobulinas G-IgG anti-CHIKV. A IgM é detectável em 5-7 dias após o início da doença e permanece elevada por semanas a meses. A IgG pode ser detectada em aproximadamente 7 a 10 dias após o início da doença, geralmente após o desaparecimento da viremia, e permanece detectável por meses a anos (Johnson et al., 2016b; Silva e Dermody, 2017). Portanto, a detecção de IgM é amplamente utilizada no diagnóstico da infecção aguda pelo CHIKV em combinação com o método molecular; enquanto a detecção de IgG é usada para testar amostras durante a fase de convalescença. Como a IgM para o CHIKV pode persistir por até 4

meses (Prince et al., 2015), o resultado positivo de IgM anti-CHIKV indica tanto a possibilidade de infecção aguda por CHIKV quanto uma infecção passada recente. Para discriminar entre os dois estágios clínicos, o resultado de RNA e o título de IgG também devem ser considerados (An et al., 2017).

Nas fases subcrônica e crônica da artralgia, com histórico de ter tido um episódio de febre aguda com edema associado e dor articular durante o período epidêmico (critérios clínico-epidemiológicos) dispensa a necessidade de realizar testes sorológicos em pacientes que buscam assistência para o tratamento da dor. Em casos de pacientes que não respondem à terapia analgésica inicial, testes sorológicos para CHIKV (anticorpos IgM e IgG) e testes em busca de outras etiologias devem ser realizados, a critério do especialista. Além disso, testes não específicos, como hemograma completo, podem ser solicitados na fase aguda e testes bioquímicos como dosagem de transaminases, creatinina e eletrólitos podem ser necessários em pacientes de risco ou em pessoas gravemente doentes (Simon et al., 2015).

Durante a fase crônica, para pacientes que não respondem ao tratamento, auto-anticorpos (fator reumatoide; anticorpo proteico anti-citrulina; e anticorpos anti-nucleares) e marcadores moleculares (HLA-B27) devem ser solicitados, de acordo com suspeita da doença, uma vez que o diagnóstico diferencial inclui artrites inflamatórias (Simon et al., 2015).

Exames específicos moleculares e testes sorológicos são realizados rotineiramente nos períodos entre epidemias, a fim de detectar os primeiros casos e identificar o início de uma epidemia. No entanto, uma vez identificada uma epidemia pelo CHIKV, nem todos os pacientes são submetidos a uma confirmação laboratorial. Nesse contexto, a investigação laboratorial é reservada para pacientes com sinais alarmantes, grupos de riscos (gestantes, pacientes imunossuprimidos, por exemplo), casos graves, aqueles com manifestações atípicas, ou em casos de difícil diagnóstico diferencial. O diagnóstico pode ser confirmado com base em critérios clínico-epidemiológicos (Brito et al., 2016).

Outro fato que merece destaque quando fala-se em diagnóstico da febre Chikungunya é que por conta da filogenética e taxa de mutação do vírus pode ocorrer reatividade cruzada nos testes sorológicos com o vírus da dengue, Zika e Mayaro (Brito et al., 2016). Esse fato pode sugerir que uma boa parte de casos de dengue relatados em 2015-2016 no Brasil, poderia ter sido de infecções pelo CHIKV.

Além disso, coinfeções por CHIKV e dengue ou Zika podem ocorrer (Villamil-Gomez et al., 2016), uma vez que esses vírus co-circulam na mesma área através da transmissão pelos mesmos vetores do mosquito *Aedes* sp. (Miner e Diamond, 2017). Outro fato que merece destaque no que se refere a dificuldades no diagnóstico de CHIKV é a questão da subnotificação dos casos em consequência de vários fatores, como ausência de um prontuário único de registro, falta de capacitação tanto de agentes comunitários de saúde quanto de profissionais que atendem na atenção básica, sem falar no longo tempo de liberação dos resultados dos exames.

A febre Chikungunya apresenta taxa de mortalidade menor que 1%, no entanto, é urgente o olhar mais preciso sobre esse dado, uma vez que é identificado o déficit na capacidade de diagnosticar a infecção de forma precisa e também pode haver subnotificação no número de óbitos.

As terapias mais utilizadas são os usos de analgésicos, antipiréticos e agentes antiinflamatórios, que destinam a aliviar os sintomas associados à doença (THIBERVILLE et al., 2013; SILVA, 2017; FRANCO, et al. 2018). O tratamento com alguns agentes antivirais comuns são utilizados contra o vírus como ribavirina (RBV), o favipiravir (FAV) e o interferon-alfa IFN- α), porém, estes contemplam atividade de amplo espectro contra uma variedade de vírus, necessitando de mais testes em modelos animais e humanos para se chegar ao avanço clínico dessas drogas (SILVA, 2017; FRANCO, et al. 2018).

Não existem vacinas ou antivirais que previnam ou tratem a infecção por CHIKV, onde a terapia com vacinas encontra-se num estágio de sucesso limitado, na tentativa de combater o mecanismo de ação deste vírus (ROTHAN et al., 2015; SILVA, 2017; FRANCO, et al. 2018). Vários estudos mostram ensaios com vacinas no foco de reduzir a expressão de genes da proteína do CHIKV ou até mesmo neutralizar os genótipos envolvidos na replicação do vírus (ROY, et al., 2014; GOO, et al., 2016). As imunizações precisam realizar uma proteção contra todos os genótipos do CHIKV, pois se realizada a imunidade para apenas um tipo de cepa viral, a doença pode se tornar cada vez mais grave e resistente a tratamentos, requerendo sempre um adjuvante para auxiliar no combate ao vírus (SCHWAMEIS, 2016).

No quadro atual, o tratamento consiste principalmente na base de alguns fármacos, utilizados de acordo com as fases da febre Chikungunya, tais tratamentos

realizados com a utilização de fármacos possuem uma baixa qualidade de evidências científicas (MARQUEZ, et al. 2017).

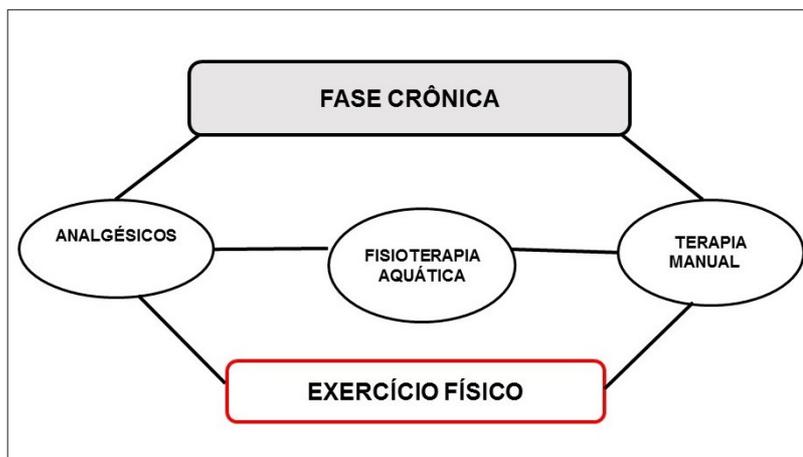
Na fase aguda: o objetivo para esta fase é o alívio da dor musculoesquelética, que leva os pacientes a ficarem incapacitados. Fármacos como paracetamol e dipirona são recomendados, com a evolução do quadro sintomático as dores podem se tornar mais intensas e analgésicos opióides podem ser usados (tramadol e codeína). Nos relatos de dor com características neuropáticas são utilizados alguns medicamentos de caráter coadjuvante como: antidepressivos (nortriptilina, amitriptilina) e anticonvulsivantes (gabapentina, carbamazepina).

Na fase subcrônica: em situações de evolução do quadro sintomático, o uso de antiinflamatórios não esteróides (AINEs) bem como medicações coadjuvantes em casos refratários a analgésicos. Os pacientes nessa fase são acometidos por dores de moderadas a intensas, logo se recomenda o uso de prednisona ou prednisolona.

Na fase crônica: a persistência do quadro sintomático nos pacientes leva os mesmos a fazerem uso de analgésicos ou opióides fracos (codeína e tramadol), seguindo as recomendações das fases anteriores. Os AINEs podem ser usados com acompanhamento da resposta terapêutica, visto que há contraindicações de seu uso. Há relatos para essa fase do uso de corticosteroides e antimaláricos, no entanto, não há evidências uniformes em relação a esse uso.

O tratamento terapêutico farmacológico é o mais utilizado diante do quadro sintomático dos pacientes. Todavia, de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia (MARQUEZ, et al. 2017), um tratamento terapêutico não farmacológico pode ser utilizado afim de minimizar os sintomas: A) Na fase aguda: orientações posturais, terapia manual e exercícios de intensidade leve. B) Nas fases subcrônicas e crônicas: manter recomendações anteriores com acréscimo de exercícios passivos, ativos, resistidos, proprioceptivos e aeróbicos alongamentos e fisioterapia aquática (Figura 2).

Figura 2. Proposta de tratamento em indivíduos com a fase crônica da febre chikungunya. O exercício físico como terapia não farmacológica.



Fonte: Autoria própria

Terapias não farmacológicas são indicadas principalmente nos estágios subcrônicos e crônicos da febre Chikungunya, principalmente para manutenção das funções articulares, sem que haja extrapolação de movimentos que desencadeiam o processo doloroso (SIMON, 2015; DEL CASTILLO-CABRERA, 2014). Os exercícios físicos são realizados principalmente em pacientes com perda de aptidão física e de autonomia de movimentos (em casos de idosos, deficientes físicos e/ou atletas), melhorando o condicionamento físico e reduzindo quadros de fadiga (SIMON, et al. 2015).

CONCLUSÃO

Quando as manifestações da chikungunya se tornam crônicas, mais tempo duram, mais complicações surgem. Dentre os sintomas clínicos observados na fase aguda a poliartralgia ocorre de maneira mais regular com potencial de ser incapacitante, afastando os indivíduos das suas atividades de vida. O exercício físico emerge como meio de tratamento não farmacológico promovendo aptidão física e funcional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, Breno S. et al. Potential risks of Zika and chikungunya outbreaks in Brazil: A modeling study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 70, p. 20-29, 2018.
- AN, Wenxi et al. Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**, p. 1-13, 2017.

- BRITO, Carlos Alexandre Antunes de et al. Pharmacologic management of pain in patients with Chikungunya: a guideline. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 668-679, 2016.
- BRITO, Carlos Alexandre Antunes de. Alert: Severe cases and deaths associated with Chikungunya in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 585-589, 2017.
- BURT, Felicity J. et al. Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 4, p. e107-e117, 2017.
- CARDONA-OSPINA, Jaime A. et al. Estimating the burden of disease and the economic cost attributable to chikungunya, Colombia, 2014. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 12, p. 793-802, 2015.
- CARVALHO, Danilo O. et al. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003864, 2015.
- CERNY, T. et al. The range of neurological complications in chikungunya fever. **Neurocritical care**, v. 27, n. 3, p. 447-457, 2017.
- CHEN, Rubing et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. **Journal of General Virology**, 2018.
- DA CUNHA, Rivaldo V.; TRINTA, Karen S. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment-A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 523-531, 2017.
- DEL CASTILLO-CABRERA, Soky. Manifestaciones mucocutáneas de la fiebre chikungunya. **Dermatol Peru**, v. 24, p. 159-69, 2014.
- DIALLO, Diawo et al. Landscape ecology of sylvatic chikungunya virus and mosquito vectors in southeastern Senegal. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1649, 2012.
- DIAS, Juarez P. et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus after Its Emergence in Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 4, p. 617, 2018.
- DONALISIO, Maria Rita; FREITAS, André Ricardo Ribas; ZUBEN, Andrea Paula Bruno Von. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de saude publica**, v. 51, p. 30, 2017.
- DOTTERS-KATZ, Sarah K. et al. Chikungunya fever: obstetric considerations on an emerging virus. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 70, n. 7, p. 453-457, 2015.
- FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. How are so many foreign arboviruses introduced in Brazil?. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 665-667, 2016.
- FIGUEIREDO, Luiz Tadeu Moraes. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 583-584, 2017.
- FRANCO, Evelyn J. et al. The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 26, p. 2040206618807580, 2018.
- GOO, Leslie et al. A virus-like particle vaccine elicits broad neutralizing antibody responses in humans to all Chikungunya virus genotypes. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. 10, p. 1487-1491, 2016.

- GUZZETTA, Giorgio et al. Effectiveness and economic assessment of routine larviciding for prevention of chikungunya and dengue in temperate urban settings in Europe. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005918, 2017.
- HORWOOD, P. F.; BUCHY, P. Chikungunya. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 34, n. 2, p. 479-489, 2015.
- HOWLEY, P. Fields virology. 6 a ed., LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, Philadelphia, 2013.
- INGLIS, Fiona M. et al. Neuropathogenesis of Chikungunya infection: astrogliosis and innate immune activation. **Journal of neurovirology**, v. 22, n. 2, p. 140-148, 2016.
- JOHNSON, Barbara W.; RUSSELL, Brandy J.; GOODMAN, Christin H. Laboratory diagnosis of chikungunya virus infections and commercial sources for diagnostic assays. **The Journal of infectious diseases**, v. 214, n. suppl_5, p. S471-S474, 2016.
- KRAEMER, Moritz UG et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **elife**, v. 4, p. e08347, 2015.
- LIMA-CAMARA, Tamara Nunes. Emerging arboviruses and public health challenges in Brazil. **Revista de saude publica**, v. 50, p. 36, 2016.
- MANRIQUE-SAIDE, Pablo et al. Use of insecticide-treated house screens to reduce infestations of dengue virus vectors, Mexico. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 308, 2015.
- MARQUES, CLAUDIA DINIZ LOPES ET AL . Recomendações da Sociedade Brasileira de Reumatologia para diagnóstico e tratamento da febre chikungunya. Parte 1 - Diagnóstico e situações especiais. **Revista Brasileira de Reumatologia.**, São Paulo , v. 57, supl. 2, p. s421-s437, 2017.
- MINER, Jonathan J.; DIAMOND, Michael S. Zika virus pathogenesis and tissue tropism. **Cell host & microbe**, v. 21, n. 2, p. 134-142, 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2016
- MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS. Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 27-, v. 47, n. 31.,2016
- MINISTÉRIO DA SAÚDE-MS. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51-2016, v. 48, n. 2/2017.
- MORRISON, Thomas E. Reemergence of chikungunya virus. **Journal of virology**, v. 88, n. 20, p. 11644-11647, 2014..
- NHAN, T. X.; MUSSO, D. The burden of chikungunya in the Pacific. **Clinical Microbiology and Infection** , v. 21, n. 6, p. e47-8, 2015.
- NUNES, Marcio Roberto Teixeira et al. Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC medicine**, v. 13, n. 1, p. 102, 2015.
- OGDEN, N. H.; ABDELMALIK, P.; PULLIAM, J. R. C. Emerging Infections: Emerging infectious diseases: prediction and detection. **Canada Communicable Disease Report**, v. 43, n. 10, p. 206, 2017.
- OKEOMA, Chioma M. (Ed.). **Chikungunya virus: advances in biology, pathogenesis, and treatment**. Springer, 2016.

- OON, L. L.; NG, Lee Ching. Chikungunya in Singapore—the battle continues. **Ann Acad Med Singapore**, v. 43, n. 6, p. 325-7, 2014.
- PRESTI, ALESSANDRA LO ET AL. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: a review. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, n. 12, p. 925-932, 2014.
- PRINCE, Harry E. et al. Chikungunya virus RNA and antibody testing at a National Reference Laboratory since the emergence of chikungunya virus in the Americas. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 3, p. 291-297, 2015.
- ROSE, Alexander S. et al. NGL Viewer: Web-based molecular graphics for large complexes. **Bioinformatics**, v. 1, p. 4, 2018.
- ROY, Chad J. et al. Chikungunya vaccine candidate is highly attenuated and protects nonhuman primates against telemetrically monitored disease following a single dose. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 12, p. 1891-1899, 2014.
- SCHWAMEIS, Michael et al. Chikungunya vaccines in development. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 12, n. 3, p. 716-731, 2016.
- Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco (2015). Chikungunya – Informe epidemiológico SE 52. Dados consolidados em janeiro de 2016.
- SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 3, p. 737-749, 2017.
- SILVA, Nayara Messias da et al. Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 27, p. e2017127, 2018.
- SIMON, F. et al. French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Med Mal Infect**, v. 45, n. 7, p. 243-63, 2015.
- SUK, Jonathan E.; SEMENZA, Jan C. From global to local: vector-borne disease in an interconnected world. 2014.
- TANAY, Amir. Chikungunya virus and autoimmunity. **Current opinion in rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 389-393, 2017.
- THIBERVILLE, SIMON-DJAMEL ET AL. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral research**, v. 99, n. 3, p. 345-370, 2013.
- TSETSARKIN, Konstantin A.; CHEN, Rubing; WEAVER, Scott C. Interspecies transmission and chikungunya virus emergence. **Current opinion in virology**, v. 16, p. 143-150, 2016.
- VEGA-RÚA, Anubis et al. High vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor of the spread of Chikungunya. **Journal of virology**, p. JVI. 00370-14, 2014.
- VILLAMIL-GÓMEZ, Wilmer E. et al. Dengue, chikungunya and Zika co-infection in a patient from Colombia. **Journal of infection and public health**, v. 9, n. 5, p. 684-686, 2016
- ZARA, Ana Laura de Sene Amâncio et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, p. 391-404, 2016.