



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO, ATIVIDADE FÍSICA E
PLASTICIDADE FENOTÍPICA -PPGNAPPF

WELLINGTON DE ALMEIDA OLIVEIRA

**ANÁLISE MOLECULAR DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS IMUNES EM
PACIENTES CRÔNICOS PÓS INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA SOB EFEITO DE
TREINAMENTO FÍSICO**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO, ATIVIDADE FÍSICA E
PLASTICIDADE FENOTÍPICA -PPGNAPPF

WELLINGTON DE ALMEIDA OLIVEIRA

**ANÁLISE MOLECULAR DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS IMUNES EM
PACIENTES CRÔNICOS PÓS INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA SOB EFEITO DE
TREINAMENTO FÍSICO**

Projeto de dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do centro acadêmico de Vitória de Santo Antão da universidade federal de Pernambuco

Orientador: Prof^a Dr^a Mariana Pinheiro
Fernandes

Co-Orientador: Prof^a Dr^a Ana Lisa do Vale
Gomes

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2021

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

- O48a Oliveira, Wellington de Almeida.
Análise molecular de mitocôndrias de células imunes em pacientes crônicos pós infecção por chikungunya sob efeito de treinamento físico/ Wellington de Almeida Oliveira. - Vitória de Santo Antão, 2021.
102 folhas; il.: color.
- Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes.
Coorientadora: Ana Lisa do Vale Gomes.
Dissertação (Mestrado em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2021.
Inclui referências, apêndice e anexos.
1. Infecções por Arbovirus. 2. Estresse Oxidativo. 3. Febre de Chikungunya. 4. Exercício Físico. I. Fernandes, Mariana Pinheiro (Orientadora). II. Gomes, Ana Lisa do Vale (Coorientadora). III. Título.
- 613.7 CDD (23.ed.) BIBCAV/UFPE - 070/2021

WELLINGTON DE ALMEIDA OLIVEIRA

**ANÁLISE MOLECULAR DE MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS IMUNES EM
PACIENTES CRÔNICOS PÓS INFECÇÃO POR CHIKUNGUNYA SOB EFEITO DE
TREINAMENTO FÍSICO**

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

Aprovado em: 26/02/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mariane Cajubá Britto Lira Nogueira (Titular Interno)

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Titular Interno)

Prof. Dr. José Antônio dos Santos (Titular Externo)

AGRADECIMENTOS

Pensar nesse trajeto que foi o mestrado é relembrar o quão forte e também o quão frágil eu posso ser. Então, primeiramente agradeço a mim mesmo por não ter desistido em momento algum, mesmo quando muitas coisas não faziam sentido, mesmo quando experimentos davam errado, mesmo quando problemas que não eram ligados diretamente ao mestrado aconteciam; agradeço ao Wellington desses últimos dois anos por ter acreditado nele e lutado para chegar até aqui.

Agradeço a Deus, ao universo e toda energia boa e suave que me acompanhou durante esse trajeto e me fortaleceu para a conclusão desse trabalho.

Agradeço a minha mãe por me ensinar que por mais que tudo pareça difícil devemos enxergar as coisas bonitas que acontecem e caso não consiga enxergar na hora é só ligar a caixinha de som e cantar até os bons pensamentos chegarem. A senhora é luz no meu mundo e no mundo das pessoas que a conhecem e qualquer mérito que alcance em minha vida vai ser um pedaço seu.

Agradeço a meu pai por todo ensinamento de honestidade. Por todos os anos que o senhor trabalhou em praça, esperando conseguir ao menos uma viagem para comprar comida para nós. Eu agradeço por me ensinar o valor de cada pão que eu comi durante minha vida e o valor de cada conquista honesta que consegui.

Aos meus irmãos, agradeço por toda paciência comigo sobretudo no período que minha saúde mental ficou um pouco fragilizada; vocês não têm ideia de como o amor que sentia por vocês e via vocês sentindo por mim me ajudou a superar essa fase difícil. Falando de irmãos, a minha prima Sabrina, agradeço pela irmandade de alma que temos um pelo outro, pelo apoio, pelas cervejas, pelas risadas e por todas as vezes que dizia a frase “Tu vai se dar bem na vida e do jeito certo, sem roubar feito o resto da família”, espero que nossa ligação dure pela vida toda.

A minha orientadora Mariana Pinheiro Fernandez, agradeço primeiramente por ter tido a sorte de cruzar com uma pessoa tão especial quanto você na minha vida. A senhora é um exemplo de orientadora, de mulher, de mãe. A senhora, de alguma forma, porque como consegue eu não sei, mas sei que consegue; é amiga e orientadora ao mesmo tempo. Essa sua maneira de ajudar e me orientar foi uma das maiores motivações em conseguir concluir esse trabalho. Descrever sobre a senhora aqui é entrar naquele clichê de “palavras não são suficientes

para descrever...” e é isso. Não tenho palavras o suficiente para lhe expressar toda minha gratidão, mas saiba que sou grato por tudo.

A minha coorientadora a professora Ana Lisa, agradeço por todo ensinamento nesses dois anos e por ter me possibilitado trabalhar com o projeto Chikungunya e exercício físico, aprendi muito com a senhora e com o grupo.

Agradeço a todos os professores e alunos que fizeram parte do projeto Chikungunya e exercício físico por toda colaboração e troca de conhecimento. Agradeço também a todos os pacientes que doaram seu material biológico (sangue) para que essa pesquisa pudesse ser realizada. O meu obrigado por acreditarem em nós e nos efeitos benéficos do exercício físico.

Ao LABMEX agradeço a todos os representantes do laboratório. A professora Cláudia Jacques Lagranha pelo ensinamento no laboratório. A todos, obrigado pelos momentos de riso e descontração e também pelos ensinamentos sobre o que realmente é ciência e pesquisa. Todos os momentos que passamos foram essenciais para meu aprendizado. Agradeço em especial a Gisele e Ramon, meus companheiros do mestrado, por todo momento vivido, rir e pesquisar com vocês foram momentos que serão eternizados em minha memória.

Aos meus amigos, agradeço por todo apoio. Lembro dos dias que pensava em desistir de tudo e vocês me animavam e faziam tudo ficar mais leve. Em especial agradeço a Taís Helena, Klayton, Luan, Márcia que me deram apoios emocionais quando mais precisei. Espero que cada um de vocês realizem seus sonhos e objetivos assim como esse mestrado foi um dos meus sonhos e objetivos de minha vida e que eu possa compartilhar de suas alegrias e tristezas como vocês fizeram comigo.

Agradeço também a todos os profissionais de saúde que me acolheram no Centro de apoio psicossocial da cidade de Vitória de Santo Antão. A cada bom dia, cada “vai dar tudo certo”, cada ligação para marcar consulta e confirmar minha presença na psiquiatria, vocês foram sem dúvida alguma, um grande apoio para estabilizar e manter minha saúde mental.

A CAPES agradeço por todo apoio financeiro para que eu conseguisse realizar essa pesquisa me mantendo financeiramente na cidade e me possibilitando realizar as pesquisas em tempo integral. Espero que muitas outras pessoas possam ter essa possibilidade que eu tive em nosso País e contribuam para a ciência e para a sociedade graças a ajuda de vocês.

Por fim, agradeço a todos os nomes que eu não citei nessas curtas palavras, mas que me ajudaram a plantar meu alicerce de força e perseverança nesse mestrado. A cada um que me ajudou e torceu por mim eu desejo as melhores energias que o universo possa ofertar possibilidades lindas em suas vidas.

RESUMO

A febre Chikungunya é uma doença que causou grandes danos a população brasileira nos anos de 2015 e 2016 e até hoje uma parcela dessa população sofre com dores articulares crônicas decorrentes dessa doença. A dor articular em casos de Chikungunya não tem tratamento; porém ela é similar aquelas causadas na artrite reumatoide e para esta última o exercício físico vem sendo empregado na melhoria dos danos articulares. O exercício físico é capaz de modular o metabolismo oxidativo e atuar na melhoria de quadros inflamatórios diminuindo inflamações de cunho articular. Dessa forma, esse trabalho avaliou os efeitos da infecção pelo CHIKV, sobre a expressão de genes relacionados à bioenergética, dinâmica mitocondrial e enzimas antioxidantes de células linfomononucleares (PBMC) de pacientes submetidos a um treinamento físico e realizar uma revisão sistemática. Foram selecionadas as plataformas: Medline, SCOPUS, COCHRANE e Web of Science. Foram usados os descritores/Mesh: Arbovirus, arboviroses, infecções por arbovirus, mitocôndria, estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio. Os dados foram descritos em tabelas e escrito pelas diretrizes do PRISMA. Em relação as PBMC, o sangue foi coletado de pacientes do sexo feminino (n=42) e centrifugado para obtenção do soro e das PBMC pré e pós treinamento (tanto do grupo controle quanto do grupo infectado). O soro obtido foi utilizado para identificação de anticorpos IgG para CHIKV, enquanto que as células armazenadas foram submetidas a análises moleculares por PCR para avaliação dos genes de bioenergética (complexo I-NDUFB8, Complexo III-UQCRC2), biogênese (TFAM), dinâmica mitocondrial (Fusão-OPA1, Fissão-DRP1) e enzimas antioxidantes (Superóxido dismutase-SOD, catalase-CAT). Uma parcela dos pacientes foi submetida ao protocolo de exercício físico moderado durante 4 semanas com frequência semanal de três vezes por semana, com duração de 40 minutos por sessão, e intensidade de 50-70% da frequência cardíaca máxima (FCMax). Os dados foram analisados por ANOVA One way seguido pelo pos-teste de TUKEY, mantendo o $p < 0,05$. Os resultados da revisão mostraram que infecção por arbovírus leva a um aumento de na produção de ROS e aumento na atividade mitocondrial próximas as regiões de zonas convolutas, além disso, nessas regiões ocorre um aumento no processo de dinâmica mitocondrial, tanto por fissão quanto fusão. As análises moleculares mostraram que a infecção crônica por CHIKV causou um aumento na expressão da SOD (42 vezes, $p < 0,0001$), DRP 1 (37 vezes, $p = 0,0017$), complexo 1 (17 vezes, $p = 0,0022$) e complexo 3 (20 vezes $p = 0,0049$) como também do TFAM (14 vezes, $p < 0,0001$) em comparação ao grupo controle. Após o treinamento, ocorreu diminuição da expressão do complexo 3 (2 vezes, $p = 0,0235$) e do TFAM (14 vezes, $p < 0,0001$) e aumento na expressão do complexo 1 (3 vezes, $p < 0,0001$) e DRP1 (2 vezes, $p = 0,0017$). Além disso, o treinamento aumentou a expressão de OPA1 (16 vezes, $p < 0,0001$) e das enzimas antioxidantes SOD (2 vezes, $p < 0,0001$) e CAT (50 vezes, $p < 0,0001$) em comparação com o grupo CHIKV. Assim, nosso trabalho mostrou que em modelos de infecção *in vitro* por arbovírus o aumento exagerado de espécies reativas pode levar ao estresse oxidativo e sinalização para morte celular. Mostramos também ocorrem alterações na expressão de genes associados ao balanço oxidativo e homeostase mitocondrial e o treinamento físico proposto promove uma maior expressão de genes do sistema antioxidante e de dinâmica mitocondrial, podendo resultar também em melhoria do quadro inflamatório. **Palavras-chaves:** Arbovírus. CHIKV. Estresse oxidativo. Exercício físico. Mitocôndria.

ABSTRACT

Chikungunya fever is a disease that caused great damage to the Brazilian population in 2015 and 2016 and to this day a portion of this population suffers from chronic joint pain resulting from this disease. Joint pain in Chikungunya cases is untreated; however, it is similar to those caused in rheumatoid arthritis and for the latter, physical exercise has been used to improve joint damage. Physical exercise is able to modulate the oxidative metabolism and act in the improvement of inflammatory conditions, reducing joint inflammation. Thus this study evaluated the effects of CHIKV infection, on the expression of genes related to bioenergetics, mitochondrial dynamics and antioxidant enzymes of mononuclear lymphatic cells (PBMC) of patients undergoing physical training and conducting a systematic review. The platforms were selected: Medline, SCOPUS, COCHRANE and Web of Science. The descriptors / Mesh were used: Arbovirus, arboviruses, arbovirus infections, mitochondria, oxidative stress and reactive oxygen species. The data were described in tables and written by the PRISMA guidelines. Regarding PBMCs, blood was collected from female patients (n = 42) and centrifuged to obtain serum and PBMCs before and after training (both in the control and in the infected group). The obtained serum was used to identify IgG antibodies to CHIKV, while the stored cells were subjected to molecular analyzes by PCR to evaluate the bioenergetic genes (I-NDUFB8 complex, Complex III-UQCRC2), biogenesis (TFAM), mitochondrial dynamics (Fusion-OPA1, Fission-DRP1) and antioxidant enzymes (Superoxide dismutase-SOD, catalase-CAT). A portion of the patients underwent a moderate exercise protocol for 4 weeks with a weekly frequency of three times a week, lasting 40 minutes per session, and intensity of 50-70% of the maximum heart rate (FCMax). Data were analyzed by One-way ANOVA followed by the TUKEY post-test, keeping $p < 0.05$. The results of the review showed that arbovirus infection leads to an increase in the production of ROS and an increase in mitochondrial activity close to the regions of convoluted zones, in addition, in these regions there is an increase in the process of mitochondrial dynamics, both by fission and fusion. Molecular analyzes showed that chronic CHIKV infection caused an increase in SOD expression (42 times, $p < 0.0001$), DRP 1 (37 times, $p = 0.0017$), complex 1 (17 times, $p = 0.0022$) and complex 3 (20 times $p = 0.0049$) as well as TFAM (14 times, $p < 0.0001$) compared to the control group. After training, decreased expression of complex 3 (2 times, $p = 0.0235$) and TFAM (14 times, $p < 0.0001$) and increased expression of complex 1 (3 times, $p < 0.0001$) and DRP1 (2 times, $p = 0.0017$). In addition, training increased the expression of OPA1 (16 times, $p < 0.0001$) and the antioxidant enzymes SOD (2 times, $p < 0.0001$) and CAT (50 times, $p < 0.0001$) compared to the CHIKV group. Thus, our work showed that in in vitro arbovirus infection models, the exaggerated increase in reactive species can lead to oxidative stress and signaling for cell death. We also show changes in the expression of genes associated with oxidative balance and mitochondrial homeostasis and the proposed physical training promotes greater expression of genes in the antioxidant system and mitochondrial dynamics, which may also result in improvement of the inflammatory condition.

Key word: Arbovirus. CHIKV. Oxidative Stress. Physical exercise. Mitochondria.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Células epiteliais de pulmão humano
ADP	Adenosina difosfato
AMPK	AMP quinase
AR	Artrite reumatoide
ATM	sinalização da ataxia telangiectasia mutada
ATP	Adenosina trifosfato
ATP5F1A	Complexo V
BV2	Células microgliais murinas
Ca ²⁺	Íon cálcio
CaMK	proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina
CAT	Catalase
CHIKV	Chikungunya vírus
CHPV	Chandipura vírus
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo CAMP 1
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
Dpi	Dias após a infecção
DRP 1	Dinamina 1
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ETS	Sistema de transporte de elétrons
FADH ₂	Flavina-adenina dinucleotideo (estado reduzido)
FAV	Favipariravir
FC	Frequência cardíaca
FIS 1	Proteína de fissão 1
GPx	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione S transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
Hpi	Horas após a infecção
HSAEC	Células epiteliais do pulmão de pequenas vias aéreas humanas
HT-22	Célula neuronal hipocampal de rato
HUH 7.5	Células de hepatocarcinoma humano
HUVECS	Células de veias umbilicais humanas

IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
JEV	Vírus da encefalite japonesa
LACV	Vírus de la Cross
LAMP	Amplificação isotérmica mediada pro loop
LIRA	Levantamento de índice rápido para <i>Aedes aegypti</i>
MAPK	proteína quinase ativada por mitógeno
MAYV	Mayaro vírus
MDA	Malondealdeído
MFN 1	Mitofusina 1
MFN 2	Mitofusina 2
MMP	Permeabilidade de membrana mitocondrial
Mo-DC	Células dendríticas derivadas de monócitos humanos
MOI	Multiplicidade de infecção
MSF	Estimulador de importação mitocondrial
MtCO1	Gene do citocromo c oxidase
MtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio (estado reduzido)
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (estado oxidado)
NDUFB	Gene do complexo I
Neuro 2	Células de neuroblastoma de camundongo
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NRF-1	Fator respiratório 1
NRF-2	Fator respiratório 2
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH-	Radical hidroxila
OPA1	Proteína de atrofia óptica 1
ORF	Leitura aberta estrutural
PBMC	Células linfomononucleares
PGC1- α	Co-ativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissomo
Pi	Fosfato inorgânico
PSE	Percepção subjetiva de esforço
PTPM	Poros de transição de permeabilidade de membrana
RBA-1	Astrócito de cérebro de rato
RBV	Ribavirina
REDOX	Redução-oxidação
RFVF	Vírus da febre do vale do Rift
RNA	Ácido Ribonucleico

RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
SH-SY5Y	Células de Neuroblastoma humano
SINAN	Sistema de informação de agravo de notificação
SINV	Vírus SINV
SIRT 1	Sirtuína 1
SOD	Superóxido dismutase
TFAM	Fator de transcrição mitocondrial
U87-M6	Células de astrocitoma humano
UBS	Unidade básica de saúde
UQ	Ubiquinona
UQCRC2	Gene da proteína central 2 de ubiquinol-citocromo c redutase
UQH	Semiquinona
Vitamina E	α -tocoferol
Vitamina C	Ácido ascórbico
VEEV	Vírus da encefalite equina venezuelana
$\Delta\Psi_m$	Potencial elétrico de membrana mitocondrial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de primers que foram avaliados no projeto	40
Tabela 2 - Resultados do teste imunoenzimático por ELISA	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proteínas expressas no genoma de <i>Alphavirus</i> .	20
Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de replicação viral de um <i>Alphavirus</i> .	21
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de infecção de um <i>Alphavirus</i> .	22
Figura 4 - Ilustração do vírus CHIKV: Morfologia e RNA.	23
Figura 5 - Incidência de prováveis casos de Febre Chikungunya por município.	24
Figura 6 - Relação do tipo de diagnóstico pelo tempo de infecção e fases da Febre Chikungunya.	26
Figura 7 - Imagem ilustrativa da morfologia mitocondrial.	29
Figura 8 - Ilustração da atividade e dos sistemas antioxidantes enzimáticos.	30
Figura 9 - Ilustração dos processos de fissão e fusão mitocondrial.	33
Figura 10 - Enzimas antioxidantes	43
Figura 11 - Dinâmica mitocondrial	44
Figura 12 - Complexos mitondriais e TFAM	45

SUMÁRIO

1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Febre Chikungunya.....	19
2.1.1 <i>Características gerais dos Alphavirus</i>	19
2.1.2 <i>Ciclo de replicação viral dos Alphavirus</i>	20
2.1.3 <i>Alphavirus artrogênicos</i>	21
2.2 Chikungunya vírus: Características gerais e epidemiologia	23
2.2.1 <i>Manifestações clínicas e imunopatogênese.....</i>	24
2.2.2 <i>Diagnóstico e Tratamentos farmacológicos da doença</i>	25
2.2.3 <i>Exercício físico como ferramenta terapêutica não farmacológica</i>	27
2.3 Mitocôndria: Características Gerais	28
2.3.1 <i>Produção de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes.....</i>	31
2.3.2 <i>Biogênese e Dinâmica Mitocondrial</i>	32
3 HIPÓTESE.....	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo geral.....	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5 METODOLOGIA.....	37
5.1 Revisão sistemática	37
5.2 População e tipo de estudo	37
5.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	37
5.4 Coleta e processamento do sangue	38
5.5 Programa de treinamento físico	38
5.6 Extração de RNA e RT-PCR	39
5.7. Análise Estatística.....	40
6 RESULTADOS	41

6.1 Ensaio imunoenzimático	41
6.2 Análise molecular	42
6.2.1 <i>Expressão gênica das enzimas antioxidantes</i>	42
6.2.2 <i>Expressão gênica das proteínas de dinâmica mitocondrial</i>	43
6.2.3 <i>Expressão gênica do TFAM e complexos mitocondriais.....</i>	44
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO NO SÃO PAULO MEDICAL JOURNAL.....	60
ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NO SÃO PAULO MEDICAL JOURNAL	101
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	102

1 DELIMITAÇÃO DO PROBLEMA

Arboviroses são doenças virais transmitidas por insetos reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde como um problema global de saúde pública (WHO, 2009). No Brasil, sabe-se que a partir dos anos 2000 surtos de arboviroses como dengue, Zika e Febre Chikungunya tornaram-se motivo de preocupação para a saúde (BRASIL, 2015). No ano de 2015, o país passou uma epidemia de Febre Chikungunya onde cerca 17.971 habitantes em cerca de 704 municípios foram notificados como infectados (BRASIL, 2016).

O número de casos notificados associado ao comprometimento da qualidade de vida da população devido às sequelas geradas durante a fase crônica pós infecção são fatores que causam preocupação para a população (CHOW *et al.*, 2011). A Febre Chikungunya é sintomática em aproximadamente 80% dos pacientes infectados, podendo desenvolver três fases clínicas: aguda, subcrônica e crônica, havendo uma persistente artralgia em todas elas. Amaral *et al.* (2019), mostraram que as dores articulares em pacientes com Febre Chikungunya são semelhantes a dores causadas por doenças reumáticas graves e que está segundo Breivik *et al.* (2006) presente em 19% dos pacientes com problemas reumáticos (AMARAL *et al.*, 2018; BREIVIK *et al.*, 2006). Porém, em relação à dor em pacientes acometidos por Febre Chikungunya, SA *et al.* (2008) mostraram que em Salvador-BA, 40% das pessoas acometidas pela fase crônica afirmaram ter dor articular. Um dos fatores que pode estar associado a esses quadros da doença seria o estresse oxidativo. Estudos mostram que o estresse oxidativo induzido durante infecção por Alfavírus pode contribuir para o aumento da resposta inflamatória e replicação viral durante a infecção (RESHI *et al.*, 2014; CAMINI *et al.*, 2017). Além disso, já se sabe que algumas proteínas de *Alphavirus* podem afetar o funcionamento da mitocôndria, induzindo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (TERASAKI; WON; MAKINO, 2013).

Diante disso, alternativas que minimizem os efeitos adversos causados pelo vírus Chikungunya (CHIKV) são cada vez mais necessárias. O exercício físico como atividade de saúde tem efeito terapêutico comprovado diante de patologias com comprometimento articular crônico que em muito se assemelha à encontrada em pacientes com Febre Chikungunya. Em um estudo realizado por Silva (2011) foi visto que o treinamento físico tem sido associado a melhoria de quadros inflamatórios, havendo diminuição da liberação de citocinas inflamatórias e melhora na ação dos sistemas antioxidantes (SILVA, 2011). O exercício como fator ambiental também está atrelado a modulações antioxidantes, diminuição do estresse oxidativo, regulação

de proteínas anti-apoptóticas, aumento do fluxo protetor de autofagia e maior reciclagem de componentes celulares (GONÇALVES *et al.*, 2013). O exercício físico também tem sido associado a melhorias na capacidade de complexos mitocondriais, como aumento da atividade mitocondrial dos complexos I, IV e V, além de aumento na atividade de enzimas antioxidantes como glutathione-S-transferase (GST) (SUN *et al.*, 2010), glutathione peroxidase (GPx) (VENDITTI; DI MEO, 1996) e redução da oxidação de proteínas, em modelos experimentais (LIU *et al.*, 2000).

Diante da limitação de recursos terapêuticos para o tratamento dos sintomas durante a infecção por CHIKV, novas estratégias terapêuticas são importantes para garantir uma melhor qualidade de vida à população. Além disso, sabendo que o exercício físico melhora o metabolismo oxidativo, diminui lesões inflamatórias e está associado com melhoria do humor e da aptidão física, este pode ser considerado um potencial agente terapêutico não farmacológico contra a Febre da Chikungunya. Assim, esse trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da infecção pelo CHIKV durante a fase crônica, a expressão de genes relacionados à bioenergética, dinâmica mitocondrial e enzimas antioxidantes de células linfocitos mononucleares (PBMC) de pacientes submetidos a um treinamento físico e realizar uma revisão sistemática sobre a bioenergética mitocondrial e o balanço oxidativo em modelos *in vitro* de infecção por arbovírus.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Febre Chikungunya

2.1.1 Características gerais dos Alphavirus

Os arbovírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* e a família *Togaviridae* são globalmente reconhecidos como causadores de diversas doenças que atingem mamíferos, incluindo o ser humano (WEAVER; REISEN, 2010). Sendo encontrados em praticamente todos os continentes, exceto na Antártica. São divididos em vírus do velho e novo mundo, conforme os locais onde foram primeiramente identificados (FORRESTER, 2012). Entre os vírus do velho mundo, encontram-se os causadores de encefalite humana como os vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV) e da encefalite equina do leste (EEEV), enquanto que aqueles do novo mundo abrangem os vírus geralmente associados a uma sintomatologia febril aguda e artrogênica, que em alguns casos podem levar a morte (PIERRO *et al.*, 2008; SYNDER *et al.*, 2013).

Mesmo diante da diversidade de vírus, os representantes do gênero *Alphavirus* compartilham entre si características morfológicas e moleculares. Assim, são caracterizados como um conjunto de vírions esféricos que apresentam RNA de polaridade positiva que é responsável pela expressão de quatro proteínas não-estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4) e cinco estruturais (C, E3, E2, 6K, E1), conforme a Figura 1 (HOWLEY *et al.*, 2013; WEGWE *et al.*, 2016; AN *et al.*, 2017). As proteínas não estruturais são responsáveis pela patogenicidade dos vírus, enquanto que as proteínas estruturais vão compor a formação do capsídeo, membrana e demais estruturas que compõem a partícula viral (FUMAGALLO, 2018).

Figura 1 - Proteínas expressas no genoma de *Alphavirus*



Fonte: Adaptado de Fumagalli (2018).

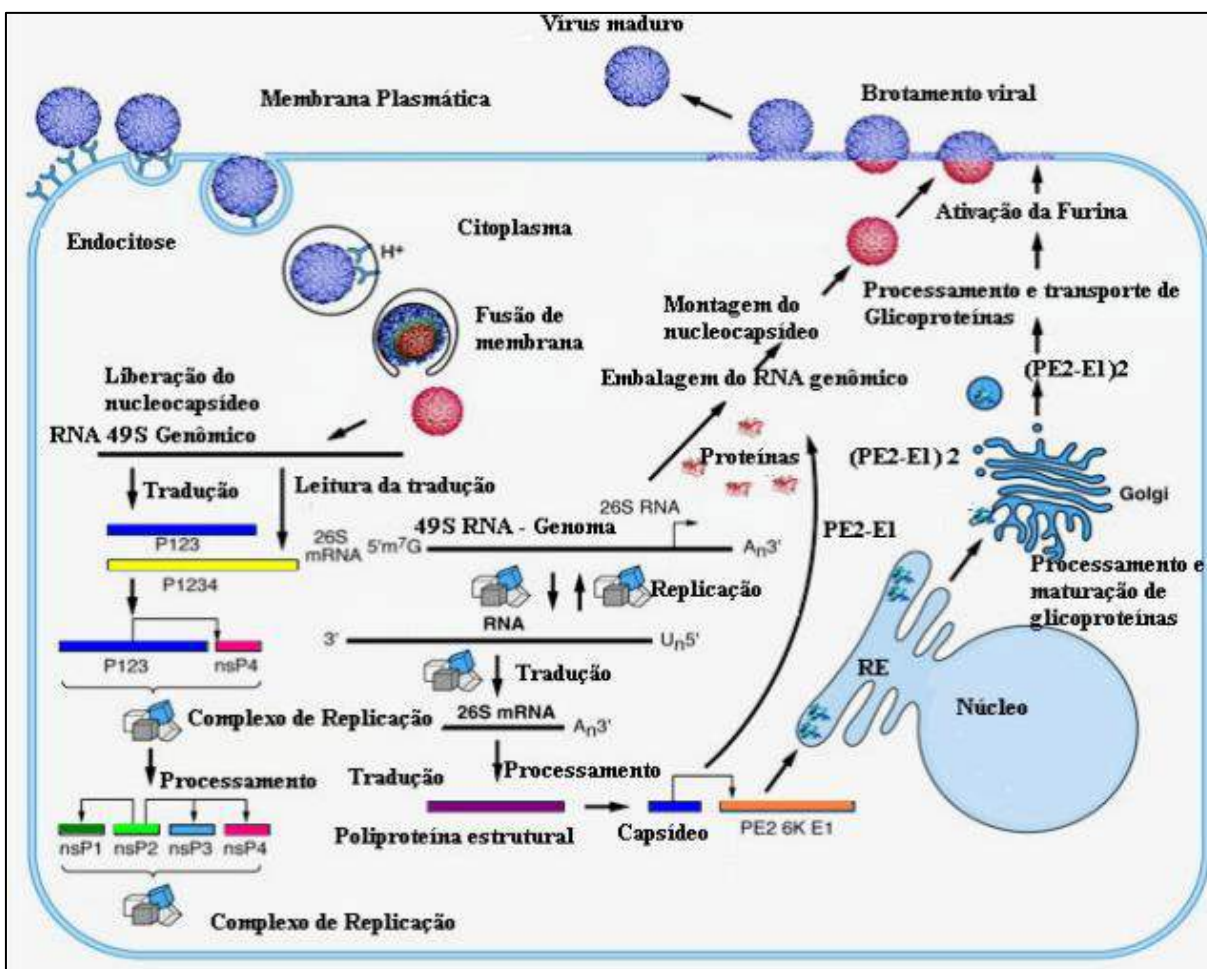
2.1.2 Ciclo de replicação viral dos Alphavirus

A infecção por *Alphavirus* em vertebrados acontece durante o repasto sanguíneo de vetores infectados através da inoculação de partículas virais contidas na saliva. Após a inoculação viral no meio extracelular, o sítio inicial de replicação viral são as células dendríticas e de Langherans até chegarem à circulação sanguínea onde se disseminam para outros órgãos e tecidos. A replicação eficiente, disseminação e imunidade determinam a intensidade da viremia e gravidade da doença (SCHILTE *et al.*, 2013).

Os *Alphavirus* são capazes de infectar uma variedade de células, desde células de artrópodes como as da linhagem C6/36, até macrófagos humanos. Como explicação para a interação desses vírus com as células tem sido proposto que pode haver o uso de um ou mais receptores altamente conservado entre os *Alphavirus* (WANG *et al.*, 2012; VANEY *et al.*, 2013). A interação do vírus com o receptor é mediada pela ação da proteína E2 a qual reconhece o receptor e media uma endocitose. Em seguida, ao chegar no citosol o vírus desmonta o capsídeo e libera o RNA genômico no interior da célula (Figura 2) (NASSAR *et al.*, 2012; VANEY *et al.*, 2013). Para início da replicação o RNA é transcrito e é produzida uma proteína precursora das proteínas não estruturais (nS).

Após a produção das nS tem início a produção das proteínas estruturais. O RNA subgenômico, produz uma poliproteína (p130) que dá origem às proteínas estruturais C, E3, E2, 6K e E1 (FIRTH *et al.*, 2008). Em seguida, a proteína C é liberada da cadeia da p130, e então, as demais proteínas estruturais são inseridas no retículo endoplasmático e são clivadas por diferentes enzimas. Posteriormente, essas proteínas são glicosiladas no complexo de Golgi e sofrem uma série de interações entre si e quando maduras são liberadas no meio extracelular dando continuidade ao ciclo (Figura 2) (KUHN, 2007; VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000).

Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de replicação viral de um *Alphavirus*



Fonte: KUHN, 2007.

2.1.3 *Alphavirus* artrogênicos

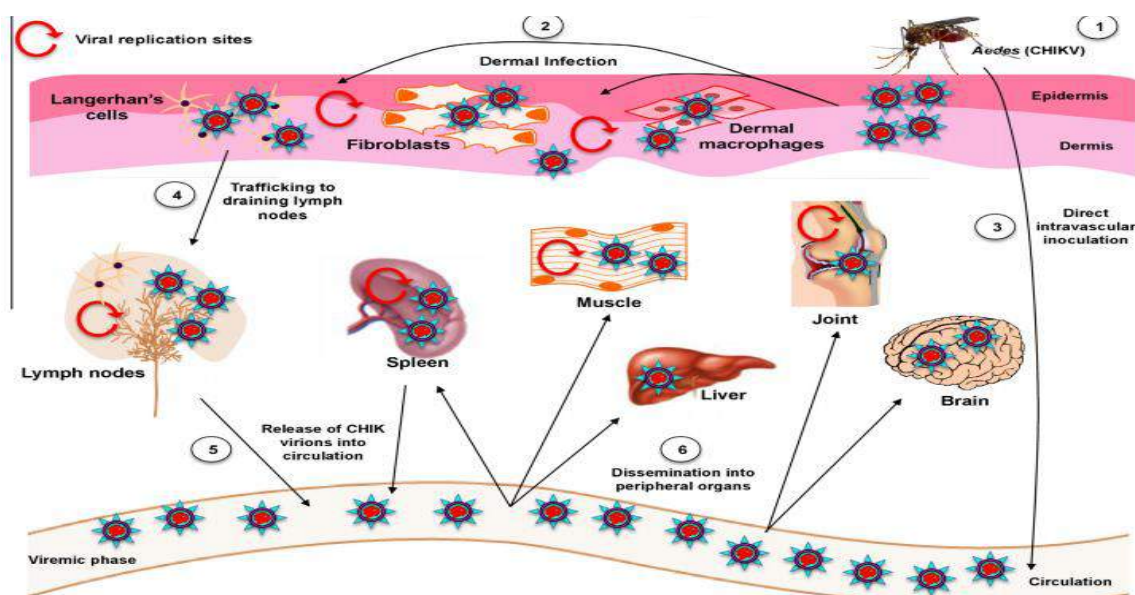
As infecções por *Alphavirus* podem ser assintomáticas ou sintomáticas, nesse último elas podem se apresentar sobre formas leves e graves. Os vírus do novo mundo são responsáveis por quadros de poliartrite que muitas vezes podem trazer prejuízos para a qualidade de vida dos pacientes (FUMAGALLI, 2018).

Alphavirus patogênicos como o chikungunya vírus (CHIKV) e o vírus mayaro (MAYV) são comumente associados a problemas articulares. Esses vírus apresentam uma fase de viremia que pode durar de 3 a 7 dias no período agudo. Na fase aguda são comuns outros sintomas além da artralgia, como febre, cefaleia, fadiga e mialgia (WEAVER; REISEN, 2010; JAFFAR-BANDJEE *et al.*, 2010). As petéquias podem surgir durante ou após o período de artralgia e tende a durar em torno 7 a 10 dias de infecção. Estima-se que elas estejam presentes em cerca de 40% dos casos de infecção por esses arbovírus. Em relação à artralgia, ela é bastante comum em infecções por esses vírus e geralmente as dores diminuem após a fase de viremia, porém já

se tem relatos de dores articulares que duram meses ou anos (JAFFAR-BANDJEE *et al.*, 2010; KURKELA *et al.*, 2008). O inchaço ocorre em pequenas articulações como pulso e dedos podendo se expandir para dores nos joelhos e outras articulações maiores; além disso, pode haver dores articulares simultâneas (JAFFAR-BANDJEE *et al.*, 2010; KURKELA *et al.*, 2008).

Após a picada do vetor a disseminação viral ocorre por vasos linfáticos e sanguíneos. A leucopenia é bastante evidente em algumas infecções, sugerindo que em alguns *Alphavírus* os linfócitos podem ser sítios primários de infecção, além deles o fígado e o baço também são bastante usados para a replicação viral (Figura 3). Os arbovírus ao atingirem as articulações induzem um processo inflamatório marcado por um infiltrado linfocitário contendo ainda neutrófilos, macrófagos e células *Natural Killer* (NK) (LABADIE, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de infecção de um *Alphavirus*.

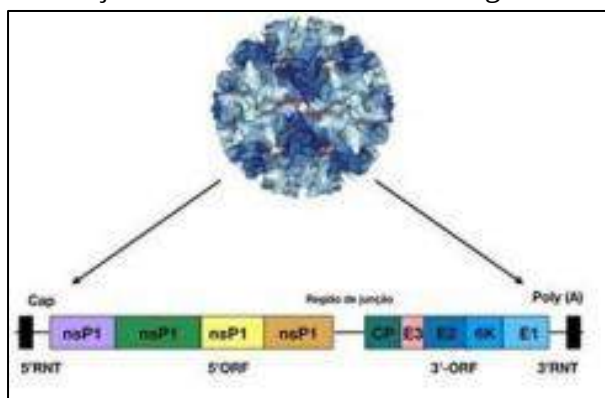


Fonte: Lum *et al.* (2015).

2.2 Chikungunya vírus: Características gerais e epidemiologia

O CHIKV foi isolado pela primeira vez na Tanzânia, em 1952, tendo aproximadamente 70 nm de diâmetro, envelopado e com capsídeo formado por uma única proteína, sendo organizado em 13 arranjos icosaédricos com simetria. O nucleocapsídeo é protegido pelo envelope que é adquirido da membrana plasmática do hospedeiro após a liberação para o meio extracelular. Essa estrutura contém ainda as proteínas E1 e E2 que estão presentes em heterodímeros e que são organizados na superfície do vírion em arranjos de 240 cópias de cada proteína interagindo com as 240 cópias do capsídeo. O seu material genético é RNA de fita simples com polaridade positiva, apresentando na terminação 5'NTR as proteínas não estruturais (nsP1, nsP2, nsP3, nsP4), e na terminação 3'NTR as proteínas estruturais que são C, E3, E2, 6K e E1 (Figura 4) (HOWLEY *et al.*, 2013; WEGWE *et al.*, 2016; AN *et al.*, 2017).

Figura 4 - Ilustração do vírus CHIKV: Morfologia e RNA



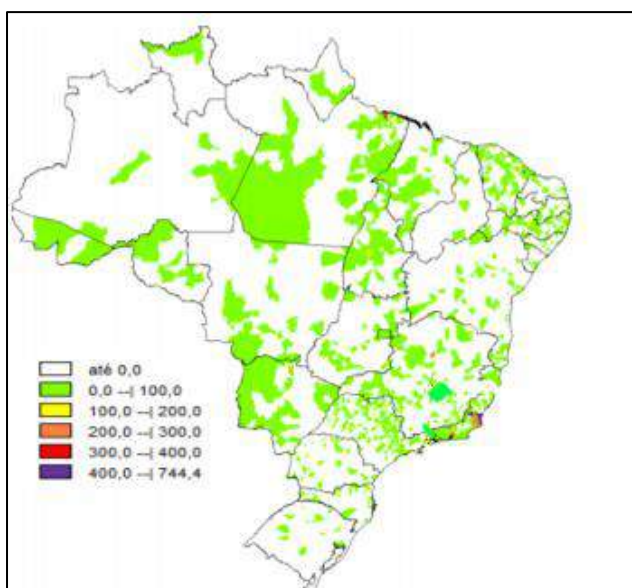
Fonte: Adaptado de AS ROSE *et al.* (2018).

O arbovírus se disseminou rapidamente pelo mundo, tornando-se ameaça em regiões tropicais e causando grandes problemas para a saúde pública (PACHAURI; MAYER, 2014). Segundo Burt *et al.* (2017), o vírus criou alarde em 2004 em uma epidemia que se espalhou da costa do Quênia para ilhas do Oceano Índico ressurgindo também na Índia, após ausência de 32 anos. Desde então, os casos de epidemia por CHIKV vem aumentando cada vez mais, e segundo Wilder-Smith *et al.* (2017) isto está relacionado com a tríade do mundo moderno que são urbanização, globalização e mobilidade internacional.

No Brasil, este vírus surgiu primeiramente no Amapá e na Bahia e em 2015 se espalhou para a região sudeste (BRITO *et al.*, 2016; NUNES *et al.* 2015). A maior concentração de casos de febre chikungunya ocorreu na região Nordeste, onde em 2017, cerca de 76,6% dos casos notificados se encontravam nessa região, porém dados do SINAN de 2019 mostram um aumento no número de casos nas regiões sudeste e nordeste (Figura 5) (BRASIL, 2017;

BRASIL, 2019). Essa porcentagem é preocupante uma vez que no mesmo ano houve 168 casos de óbito confirmados no Brasil, além de várias pessoas infectadas as quais apresentaram sequelas após o período de viremia (BRASIL, 2017).

Figura 5 - Incidência de prováveis casos de Febre Chikungunya por município



Fonte: Sinan online, banco atualizado em 18.03.2019

2.2.1 Manifestações clínicas e imunopatogênese

Em relação às manifestações clínicas, já se sabe que a Febre Chikungunya pode apresentar uma fase assintomática (aproximadamente 30% das pessoas infectadas) e três sintomáticas: aguda, subcrônica ou crônica. A infecção aguda tem um início abrupto, caracterizada por febre alta, artralgia, mialgia, dor de cabeça e edema. Os sintomas geralmente começam de 4 a 7 dias após a ocorrência da picada do mosquito (PIALOUX *et al.*, 2007; MOHAN, 2006). A fase subcrônica ocorre entre o 15º ao 90º dia, apresentando como sintomas a permanência da artrite e disseminação da inflamação para estruturas próximas a articulação, como tendões e ligamentos (AN *et al.* 2017; SIMON, 2015). Enquanto que na fase crônica da infecção há poliartralgia muito dolorosa podendo persistir por semanas, meses ou até anos, incapacitando assim o indivíduo de realizar determinados movimentos (MANIMUNDA *et al.*, 2010).

A artralgia caracteriza-se como uma inflamação da membrana sinovial que gera um

aumento da espessura da membrana e acaba dificultando a produção do líquido sinovial. Os problemas na produção do líquido acarretam no aumento de células imunes que destroem a cartilagem e ossos causando uma dor intensa (COSTA; BECK, 2011). Em pacientes infectados por CHIKV, ocorre o desencadeamento de artralgia persistente, sendo associada à sinovite crônica (HAWMAN *et al.* 2013). A dor crônica nas articulações é um problema cada vez mais comum em infecções por CHIKV, estando presente em 17% a 46% da população afetada (BREIVIK *et al.*, 2006). Porém, um estudo realizado em uma Unidade Básica de Saúde (UBS) da cidade de Salvador-BA, mostrou um percentual maior de pessoas afetadas com dor crônica, onde 40% da população acometida com Chikungunya apresentaram essa sintomatologia (SA *et al.*, 2008). Esse quadro patológico pode interferir diretamente na qualidade de vida da população afetada, além de gerar impactos econômicos significativos, devido à redução da produtividade (CHARREL *et al.*, 2007; BRASIL, 2017).

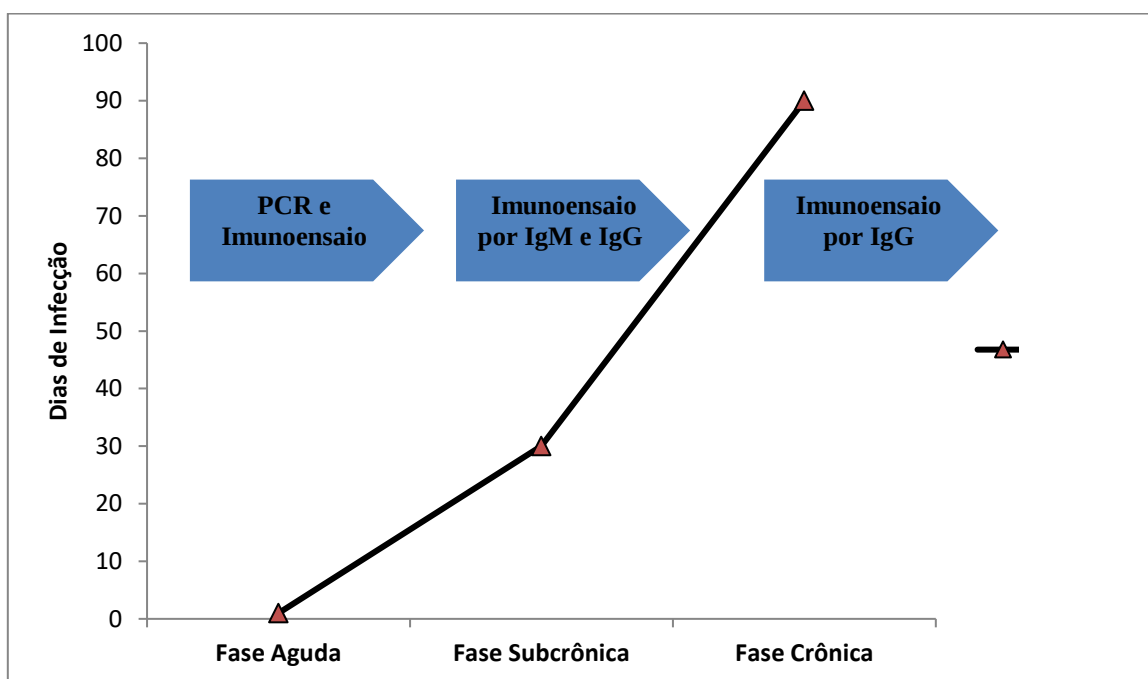
Os mecanismos fisiológicos associados à infecção e a imunopatogênese relacionada ao CHIKV são poucos conhecidos, mas já se sabe que o vírus entra diretamente nos capilares subcutâneos infectando macrófagos, fibroblastos e células endoteliais (SOURISSEAU *et al.*, 2007). Em seguida, o vírus é lançado para circulação linfática e sanguínea por onde migra para fígado, músculos, articulações e cérebro. Nestes tecidos, a infecção é associada a uma marcada infiltração de células mononucleares (GÁLLAN-HUERTA *et al.* 2015). Nas células linfomononucleares há relatos de tropismo do vírus por monócitos e macrófagos, embora estudos *in vitro* tenham mostrado que a infecção nessas células é relativamente baixa. Em relação aos linfócitos, estudos *in vitro* com linfócitos B e T primários mostraram que não há infecção nessas células (SOURISSEAU *et al.* , 2007 ; HER *et al.* , 2010) . Contudo, mesmo que a infecção em monócitos e macrófagos seja baixa, acredita-se que eles são cruciais na imunopatogênese da doença, principalmente por recrutarem células NK para agir na resposta inflamatória nos músculos e articulações (LABADIE *et al.* , 2010) .

2.2.2 Diagnóstico e Tratamentos farmacológicos da doença

Nos primeiros 5 dias da infecção podem ser realizados os métodos moleculares para o diagnóstico pois devido a presença de viremia. Técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase transcricional (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. Além dos métodos moleculares o método de imunoensaio enzimático, por exemplo, ELISA é aconselhável em

períodos após viremia, onde é possível detectar anticorpos de memória IgG (AN *et al.*, 2017). A IgM é detectável em 5-7 dias após o início da doença e permanece elevada por semanas, enquanto que a IgG pode ser detectada após o desaparecimento da viremia, e permanece detectável por meses a anos (JOHNSON *et al.*, 2016; SILVA; DERMODY, 2017). Na figura 6 é possível ver a relação do teste utilizado por dias de infecção.

Figura 6 - Relação do tipo de diagnóstico pelo tempo de infecção e fases da Febre Chikungunya.



Fonte: Do autor

O tratamento farmacológico específico para Chikungunya ainda não foi desenvolvido, diante disso é preconizado o uso de analgésicos, antipiréticos e agentes anti-inflamatórios para minimizar 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 , mas esses compostos atingem uma ampla variedade de vírus, não sendo específico para o CHIKV (FRANCO, *et al.*, 2018; THIBERVILLE *et al.*, 2013).

Os medicamentos utilizados variam de acordo com a fase da doença. Durante a fase crônica são utilizados analgésicos para minimizar as dores musculoesqueléticas. Na fase subcrônica é indicado o uso de anti-inflamatórios para minimizar o quadro inflamatório e impedir que se dissemine em outras articulações. Por fim, na fase crônica são utilizados analgésicos e opióides para diminuir as dores articulares (FRANCO, *et al.*, 2018; MARQUEZ, *et al.* 2017; SILVA, 2017).

O uso de vacinas para prevenção contra CHIKV é uma possibilidade, porém apresenta limitações uma vez que as imunizações precisam realizar uma proteção contra todos os genótipos do CHIKV, caso contrário o vírus pode se tornar mais forte e resistente a tratamentos (SCHWAMEIS, 2015). Assim, a vacina 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). Em relação ao uso de vacinas, não se tem uma vacina pronta para Chikungunya, mas há alguns candidatos a vacinas já foram identificados como o LAV CHIKV 181/25, o qual se baseia na troca dos códons de leucina e serina por códons mutacionais para parar na estrutura de leitura aberta estrutural (ORF) do genoma CHIKV (CARRAL *et al.*, 2019).

2.2.3 Exercício físico como ferramenta terapêutica não farmacológica

O exercício físico é caracterizado como um conjunto de movimentos corporais produzidos pelo músculo esquelético, os quais são planejados, estruturados e repetitivos e tem como objetivo final ou intermediário a melhoria ou manutenção da aptidão física (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985). Quando os exercícios progressivos são trabalhados de maneira organizada e sistemática, impactando na execução de tarefas de demanda motora, esses exercícios compõem um treinamento físico (BARBANTI; TRICOLI; UGRINOWITSCH, 2004). Estudos mostram que treinamento com exercício físico resistido de via aeróbia tem melhorado a resistência à insulina, hipertensão arterial e problemas articulares em indivíduos com problemas artrogênicos (MORAIS *et al.*, 2011; RODEN, 2012).

Diante disso, o exercício físico tem sido bastante empregado como tratamento não farmacológico para diversas doenças, entre elas doenças que apresentam em sua gênese patológica danos articulares. Já se sabe que em indivíduos que possuem problemas articulares, o exercício físico pode melhorar a lubrificação articular, manter bom nível de força muscular, diminuir a dor, melhorar a amplitude de movimento e diminuir a resistência articular (ALVES; BASSITT, 2013). Um estudo realizado por Vasilceac (2011) com ratos mostrou que o exercício físico conseguiu gerar um remodelamento do colágeno em cartilagens que estavam danificadas por osteoartrite (VASILAC, 2011). Outro estudo realizado por Verhoeven *et al.* (2015) com indivíduos acometidos com artrite reumatoide mostrou que o exercício físico gerou melhora da função endotelial e lentidão do processo aterosclerótico, melhorou a mineração óssea, retardando a progressão da doença em pequenas articulações e aumentando a densidade mineral óssea no colo do fêmur (VERHOEVEN *et al.*, 2015).

Além de atuar na atenuação dos sintomas clínicos de artrite reumatoide, o exercício físico pode agir interferindo nas vias metabólicas do organismo, melhorando processos como oxidação de ácidos graxos, melhorando a homeostase, metabolismo dos órgãos, modulando e ativando vias sistêmicas relacionadas à bioenergética, função e estrutura mitocondrial (BELEZA *et al.*, 2018; FLETCHER *et al.*, 2016). Nesse sentido, as mitocôndrias são extremamente importantes no desempenho do exercício, pois irão auxiliar na produção de energia (LIMA *et al.*, 2013). Um estudo realizado por Wadley e colaboradores (2015) demonstraram que em PBMCs de homens sedentários submetidos a três diferentes sessões curtas de exercício (60%, 80% e 90% do VO₂max), há aumento da ativação do NF-κβ 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, mostrando que houve melhor eficácia do treinamento moderado (WADLEY *et al.*, 2015).

Entretanto, vale salientar que a duração e intensidade do exercício físico determinam os efeitos produzidos sobre os mecanismos antioxidantes e os níveis de estresse oxidativo (TOFAS *et al.*, 2020). Já se sabe que o exercício de alta intensidade tem relação com o aumento da produção de EROs e diminuição de defesas antioxidantes (LI *et al.*, 2015). Porém, evidências tem demonstrado que exercícios de intensidade leve a moderada induzem aumento na atividade de enzimas antioxidantes, diminuindo os níveis de EROs e melhorando o estado REDOX intracelular (STEINBACHER; ECKL, 2015). Além disso, quando se trata de exercícios moderados, sabe-se que eles têm efeito benéfico em melhorar danos mitocondriais, apresentando efeitos benéficos na função, morfologia e bioenergética mitocondrial (BELEZA *et al.*, 2018).

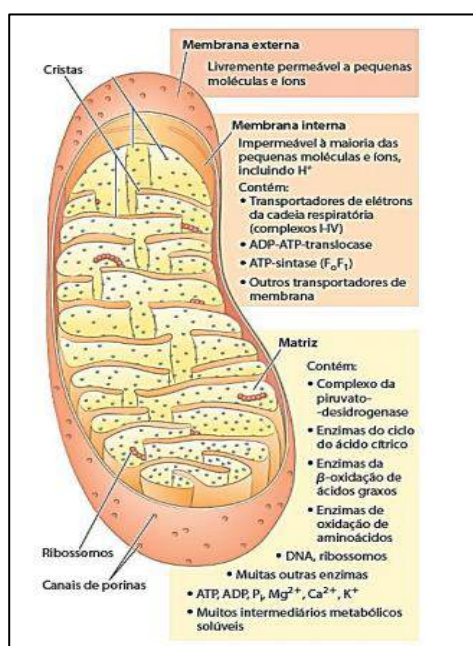
2.3 Mitocôndria: Características Gerais

Mitocôndrias são organelas relacionadas com a produção de energia utilizada para manutenção dos processos celulares (LEVERVE, 2007). A energia produzida nessas organelas é armazenada na forma de adenosina-trifosfato (ATP) e sua produção está relacionada a fatores bioquímicos, moleculares e morfológicos das mitocôndrias (NELSON; COX, 2014). Evolutivamente, essas organelas surgem a partir de um processo endossimbiótico onde um organismo eucariótico fagocita uma bactéria capaz produzir ATP, essa simbiose se mantém no processo evolutivo e até hoje seres eucarióticos apresentam mitocôndria (NELSON; COX, 2014).

Morfológicamente, as mitocôndrias são constituídas pela membrana externa e interna. A membrana externa é lisa, envolve a organela e também é permeável a íons e moléculas que

entram livremente através de canais proteicos transmembranas formadas por porinas. Por outro lado, a membrana interna é pouco permeável, sendo extremamente seletiva para íons e moléculas. A membrana interna é extremamente importante para manutenção da função mitocondrial uma vez que nelas encontram-se os complexos enzimáticos responsáveis pelo transporte de elétrons, translocases de ATP e ADP, a ATP sintase e outros transportadores de membrana (Figura 7) (NELSON; COX, 2014).

Figura 7 - Imagem ilustrativa da morfologia mitocondrial



Fonte: Nelson e Cox (2011).

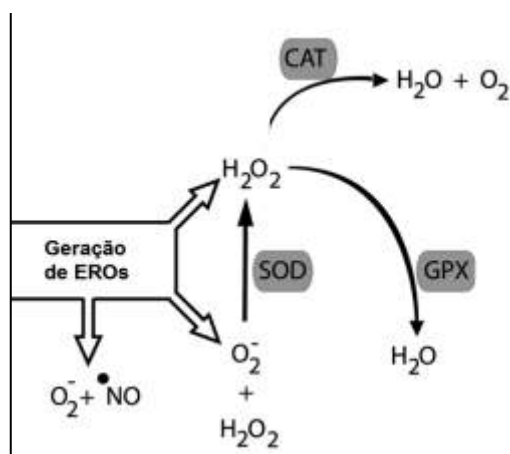
As mitocôndrias possuem seu próprio sistema genético o qual é constituído por um DNA circular que codifica 13 polipeptídeos que são traduzidos nos ribossomos mitocondriais para formação das unidades estruturais dos complexos presentes na matriz mitocondrial. A transferência de elétrons na membrana interna é realizada por essa série de complexos que são compostos por proteínas integrais de membranas apresentando grupos prostéticos capazes de aceitar ou doar um ou dois elétrons. A entrada de elétrons na cadeia respiratória ocorre sob a ação de aceptores universais de elétrons, como os nucleotídeos de nicotinamida (NAD^+ ou $NADP^+$) ou nucleotídeos de flavina (FMN ou FAD) (NELSON; COX, 2014).

O DNA mitocondrial (mtDNA) circular é responsável pela expressão das proteínas que vão constituir os complexos mitocondriais. As subunidades proteicas NDUFB8, NDUFB7, NDUFB9, por exemplo, são expressas no mtDNA e vão constituir o complexo I, também conhecido como NADH desidrogenase, este é capaz de catalisar a transferência de elétrons provenientes da coenzima reduzida NADH, para a ubiquinona (UQ) forma oxidada da

coenzima Q, gerando a UQH_2 , forma reduzida da coenzima Q. Além dessas subunidades proteicas, genes como o da subunidade D do complexo desidrogenase succinato (SDHD) irão expressar as proteínas do próximo complexo mitocondrial, o complexo II. O complexo II transfere os elétrons provenientes da coenzima reduzida $FADH_2$ para a UQ. Em seguida, a ubiquinona transfere os elétrons dos complexos I e II para o Complexo III que apresenta suas subunidades proteicas expressas por genes como o da proteína central 2 de ubiquinol-citocromo c redutase (UQCR2). Posteriormente, a ubiquinona é desprotonada para a forma semiquinona ($UQH\bullet$) e os elétrons são transferidos do Complexo III para o Citocromo c que doa os elétrons para o Complexo IV, conhecido como citocromo c oxidase (MTCO1). Em seguida, o complexo IV transfere elétrons para o oxigênio, e através do complexo V a maior parte desses prótons retornam a matriz mitocondrial gerando força próton motriz para síntese de ATP a partir da $ADP+Pi$. O complexo V é expresso pelo gene (ATP5F1A) (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

Normalmente, alguns elétrons sofrem fuga da cadeia transportadora de elétrons (CTE), esses elétrons são extremamente reativos e se não controlados podem causar danos à célula. Entre essas espécies reativas de oxigênio (EROs) destacam-se os radicais superóxido (O_2^-) que é formado após uma redução mono-eletrônica do O_2 , peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e hidroxila ($OH\bullet$) (Figura 8). O radical $OH\bullet$ é considerado o mais reativo e perigoso, devido a sua meia-vida extremamente curta, e sua neutralização pelos antioxidantes é dificultada e dificilmente ocorre devido a sua instabilidade eletrônica. Apesar de não ser um radical livre, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é capaz de gerar grandes danos devido ao seu tempo de meia-vida longo e capacidade de atravessar a bicamada lipídica das células e de reagir com metais, como o Fe^{2++} , e gerar o radical $OH\bullet$ (VALKO *et al.*, 2006; JOMOVA, VALKO, 2011; NELSON, COX, 2014).

Figura 8 - Ilustração da atividade do sistema antioxidante enzimático.



Fonte: Adaptado de Hermes-Lima (2004).

Significado das siglas: SOD: Superóxido dismutase, GPX: Glutathione peroxidase, CAT: Catalase, H_2O : Molécula da água, H_2O_2 : Peróxido de Hidrogênio, O_2^- : Ânion superóxido

Sobre suas funções, a mitocôndria exerce um papel importante na manutenção da homeostase corporal participando da β -oxidação de ácidos graxos, fosforilação oxidativa, ciclo do ácido cítrico e da ureia, regulação de sinalização de morte celular e controle intracelular de Ca^{2+} , (NELSON, COX, 2014).

Em relação ao Ca^{2+} , para manter os níveis desse íon controlado a célula conta com a ação do retículo endoplasmático e da mitocôndria. Na mitocôndria, desregulações que levem ao acúmulo de Ca^{2+} na matriz mitocondrial pode levar à redução do potencial elétrico de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, e em consequência a esses estímulos, pode ocorrer à abertura na membrana mitocondrial interna de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) levando a liberação de citocromo c e fatores pro-apoptóticos no espaço intermembranas (NELSON; COX, 2014).

2.3.1 *Produção de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes*

Em condições normais, o organismo consegue controlar a produção excessiva de EROs através dos mecanismos de defesa, reparo e pelos sistemas antioxidantes (VALKO *et al.*, 2006). Ele atua através de cascatas enzimáticas com ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST); ou através de mecanismos não enzimáticos usando nutrientes como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) e glutathionas (DINAKAR; DJILIANOV; BARTERLS, 2012).

Desequilíbrios na produção de EROs também podem ocorrer frente a microrganismos patogênicos. Em infecções virais, as EROs são produzidas por células imunológicas para destruir o vírus por meio de reações oxidativas (RESHI *et al.*, 2014). Um estudo realizado por Caetano (2016) mostrou que macrófagos frente à infecção por *Mayaro* apresentaram maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (CAETANO, 2016). Em um estudo com células hepáticas infectadas pelo vírus da febre do vale do Rifti (RVFV) realizado por Narayanan *et al.* (2011), foi evidenciado que em células infectadas há um aumento na produção de EROs associado a uma regulação-negativa da SOD. Diante disto, percebe-se que as EROs desempenham papéis importantes no combate às infecções e são vistas como um mecanismo de proteção da célula, no entanto, caso não haja uma efetiva resposta antioxidante, o excesso de EROs pode culminar com o estresse oxidativo resultando em disfunções celulares e metabólicas para o hospedeiro (CAETANO, 2016).

2.3.2 Biogênese e Dinâmica Mitocondrial

A biogênese mitocondrial é caracterizada como o crescimento e divisão de mitocôndrias pré-existentes. O controle celular sobre a quantidade de mitocôndrias está relacionado com a necessidade da célula de aumentar a produção de molécula energética. Quando surge a necessidade de produzir novas mitocôndrias ocorre o desencadeamento de vias de sinalização que resultarão em um aumento da expressão de genes para a formação de dessas organelas nas células. Além disso, esse processo é controlado pelos níveis de Ca^{2+} , óxido nítrico (NO), tensão de oxigênio e metabolismo energético, além de outras condições que irão influenciar no estado redox da célula (NISOLI, 2004).

O processo da biogênese é complexo, uma vez que necessita da interação entre o genoma nuclear e mitocondrial. Assim, para que a biogênese ocorra é necessário que haja sinalizações eficientes para que os eventos no DNA nuclear ocorram ao mesmo tempo em que a replicação, transcrição e tradução na mitocôndria (HOOD, 2009).

Diversas proteínas têm sido relacionadas como ativadores do processo de biogênese, entre elas, a proteína coativador 1α do receptor gama (PGC- 1α) tem sido apontada como principal reguladora na formação de novas mitocôndrias nos músculos esqueléticos e no coração. Essa proteína é co-regulada pelo fator de transcrição da proteína de ligação ao elemento responsivo cAMP 1 (CREB). Na presença de estímulos como o aumento de cálcio intracelular ocorre ativação de sinalizadores da biogênese como a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK), as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e AMP quinase (AMPK) (FERRARESSO, 2015; REIS, 2014).

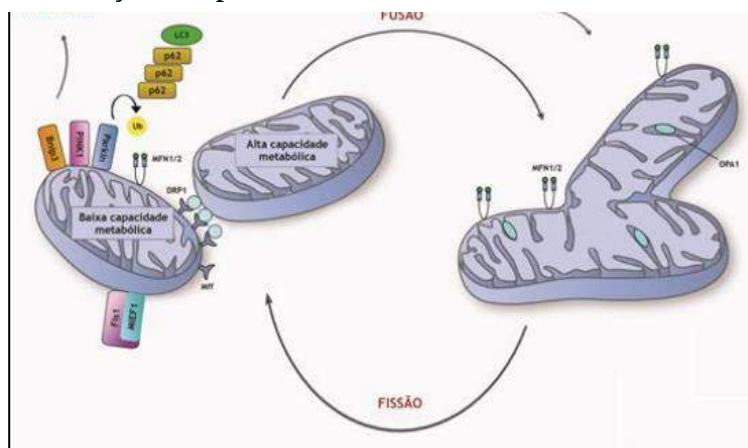
Após a ativação dos sinalizadores de biogênese, fatores de transcrição se ligam à região promotora do PGC- 1α no núcleo. A PGC- 1α também é capaz de autorregular sua própria transcrição, assim, ela se liga a sua região promotora e ativa a transcrição de seus genes-alvo e de genes relacionados a várias proteínas oxidativas e dos fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2). O NRF-1 ativa genes nucleares codificadores de proteínas destinadas à mitocôndria tais como o fator de transcrição mitocondrial A (TFAM). Depois de ativado o TFAM migra para o DNA mitocondrial e induz sua duplicação (FERRARESSO, 2015).

As proteínas produzidas no citosol da célula migram em direção ao interior da mitocôndria. Essas proteínas, em sua maioria, encontram-se na forma de precursores proteicos que apresentam uma sequência sinalizadora. Essa sequência precursora se liga a uma chaperona ou fator estimulador de importação mitocondrial (MSF) que o desenovela e o direciona para a

membrana externa. No interior da mitocôndria as proteínas que são transcritas após a ação da TFAM são montadas para formar complexos de multi subunidades que compõem a cadeia de transporte de elétrons. Além da biogênese, outros processos que regulam o número de mitocôndrias são os processos de fusão e fissão mitocondrial (HOOD *et al.*, 2006; ROMANELLO, 2013).

O processo de fissão mitocondrial consiste em um mecanismo que segrega os componentes disfuncionais ou danificados de mitocôndrias através da autofagia mitocondrial (OTERA; MIHARA, 2011). Enquanto que o processo de fusão está relacionado com junção de diversas mitocôndrias para a formação de uma rede interconectada que permite a redistribuição de metabólitos e proteínas (Figura 9) (ROMANELLO, 2013).

Figura 9 - Ilustração dos processos de fissão e fusão mitocondrial



Fonte: Ferrarezzo (2015).

Ambos os processos de dinâmica mitocondrial são extremamente importantes para manutenção da morfologia, comprimento, tamanho e número das mitocôndrias, podendo afetar a função mitocondrial (LIU *et al.*, 2012). Além disso, esses processos são críticos para a manutenção de populações saudáveis de mitocôndrias, uma vez que a fusão mitocondrial permite a troca de metabólitos entre mitocôndrias reduzindo a quantidade de mitocôndrias defeituosas nas células, enquanto a fissão permite a eliminação de danos irreversíveis na organela, mantendo a integridade mitocondrial. A dinâmica mitocondrial é um processo passível de mudanças e é extremamente relacionado com a ação de GTPases que atuam gerando efeitos antagônicos a depender do processo, se fissão ou fusão (Figura 9) (LIU *et al.*, 2012; NELSON, COX, 2014).

A fusão está relacionada com o aumento na expressão das Mitofusina 1 (MFN1),

Mitofusina 2 (MFN2) e Proteína atrofia óptica 1 (OPA1) (LIU *et al.*, 2012). A expressão de MFN1 e MFN2 está relacionada com a fusão da membrana externa, essas proteínas através da interação de seus domínios podem formar complexos que realizam a junção de mitocôndrias vizinhas. O aumento na expressão de OPA1 está relacionado com a fusão da membrana interna, assim, quando expressa, essa proteína migra para o espaço intermembrana onde fica próxima a membrana interna e realiza sua junção (WANG *et al.*, 2009).

Enquanto que o processo fissão é controlado pela ação das proteínas Proteína 1 semelhante à dinamina (DRP1) e Fissão 1 (FIS1). A proteína DRP1, quando expressa, encontra-se no citoplasma e migra para a superfície mitocondrial para realizar a fissão. Durante o processo de fissão a DRP1 se liga à FIS1 e utilizando a hidrólise de GTP começa a comprimir os túbulos mitocondriais e assim divide a mitocôndria (WANG *et al.*, 2009; NELSON; COX, 2014).

Em infecções por arbovírus, estudos vem mostrando que frente ao patógeno invasor, as mitocôndrias sofrem modificações em sua dinâmica para combater o processo infeccioso. Em um estudo realizado por Barbier *et al.* (2017) com o vírus da dengue, foi identificado diminuição das proteínas de fissão, onde a queda nos níveis DRP1 nas mitocôndrias das linhagens Huh7 e células dendríticas derivadas de monócitos (DCs) foi correlacionada à uma redução da fosforilação de DRP1 em S616. Entretanto, um outro estudo realizado por Yu *et al.* (2015) mostrou que os níveis de proteína de fissão se mantem constantes, mas ocorre aumento nos níveis das proteínas de fusão MFN1 em infecções por dengue vírus (DENV) em células de A549. Assim, as modificações mitocondriais estão associadas não só ao arbovírus, como também aos tipos celulares expostos a infecção.

3 HIPÓTESE

Danos moleculares na atividade antioxidante enzimática, biogênese e dinâmica mitocondrial de células imunes de pacientes com infecção pelo vírus Chikungunya na fase crônica são minimizados quando os indivíduos são submetidos a um treinamento físico.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da infecção pelo vírus Chikungunya durante a fase crônica, sobre a expressão de genes relacionados à bioenergética, dinâmica mitocondrial e enzimas antioxidantes de células linfomononucleares de pacientes submetidos a um treinamento físico; e realizar uma revisão sistemática sobre a bioenergética mitocondrial e o balanço oxidativo em modelos *in vitro* de infecção por arbovírus.

4.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão sistemática;
- Realizar a análise sorológica dos pacientes para identificação de anticorpos de memória (IgG) por ELISA;
- Avaliar a expressão de genes associados com a dinâmica mitocondrial (OPA1, DRP1);
- Avaliar a expressão de genes relacionados a subcomplexos mitocondriais (NDUFB8, UQCRC2);
- Avaliar a expressão genica de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e Catalase (CAT);
- Avaliar a expressão de gene relacionado a biogênese mitocondrial (TFAM).

5 METODOLOGIA

5.1 Revisão sistemática

Foi realizada uma revisão sistemática com base nas plataformas de dados Medline / PubMed (Online System of Search and Analysis of Medical Literature), SCOPUS, COCHRANE, Lilacs (Health Sciences of Latin America and the Caribbean) and Web of Science. Sendo utilizados os seguintes descritores e Mesh: Arbovírus, Arboviruses, Arbovirus infections, Mitochondria, Oxidative stress and Reactive oxygen species. Os trabalhos selecionados tiveram título e resumos lidos, em seguida, aqueles selecionados para leitura completa foram submetidos a análise de risco de viés e os resultados apresentados em forma de tabelas para posterior discussão.

5.2 População e tipo de estudo

O estudo é caracterizado como longitudinal, de natureza quantitativa, experimental de campo. Foram identificados indivíduos residentes no município de Vitória de Santo Antão-PE, com resultado imunológico positivo para infecção pelo CHIKV nos anos de 2016 a 2019 e que apresentem sintomatologia musculoesquelética e articular crônica, pós-infecção. O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de ética em humanos da UFPE de Vitória de Santo Antão sob número de parecer 3.511.388.

A amostra (N=42 pacientes) foi composta de indivíduos do sexo feminino, com idade no intervalo de 40-60 anos 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. A escolha da amostra se deu pela quantidade de indivíduos localizados que apresentam a infecção onde as mulheres foram mais facilmente notificadas, um possível fator atrelado a isso é o fato de mulheres procurarem assistência médica com mais frequência que homens.

5.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão para esse estudo foram ser residentes 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 à alta presença de vetores e criadores. Com a orientação das Agentes Comunitária de Saúde foi realizada busca ativa dos pacientes. Foram excluídos os indivíduos do sexo masculino, indivíduos que com diagnóstico prévio de doença com comprometimento articular crônico e fora da faixa etária do estudo.

5.4 Coleta e processamento do sangue

Os indivíduos identificados foram avaliados sobre diagnóstico sorológico. O sangue dos pacientes foi coletado e as células linfomononucleares foram isoladas por separação de gradiente de densidade, realizado pelo manual (Histopaque-Sigma). Essas células foram utilizadas para as análises morfológicas e moleculares.

As amostras de sangue venoso foram obtidas através de punção de veia em dois tubos com vácuo (BD Vacutainer) contendo heparina. Para separação do sangue e do soro, as amostras foram centrifugadas à 1000xg por 6 min. Após centrifugação e separação, as amostras de soro foram congeladas a -80°C até realização dos ensaios. O sangue obtido foi transferido para tubo falcon de 15 mL contendo 3 mL de Histopaque para a obtenção de células linfomononucleares. O isolamento e contagem das células seguiu o protocolo descrito no Manual do Histopaque 1077 (Sigma). A concentração de proteína total nas células foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Aos indivíduos foi apresentado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido sobre a coleta de 20 mL de sangue periférico.

O soro obtido, foi submetido a pesquisa de anticorpos da 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

5.5 Programa de treinamento físico

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.

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. As pacientes foram divididas nos seguintes grupos: Controle não treinado; Chikungunya não treinado e Grupo Chikungunya treinado. O programa de exercício físico foi elaborado pelos professores Adriano Bento, Rarmon Nascimento e José Antônio, além do apoio de acadêmicos de Educação Física, 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. Todas as mulheres que participaram do programa de treinamento tiveram que executar todas as sessões prescritas no protocolo de treino.

5.6 Extração de RNA e RT-PCR

Para a extração de RNA, foi utilizado 60 µL de células que foram lizadas em 200 µL de solução contendo Trizol e Clorofórmio, em seguida, as amostras foram centrifugadas e a fase aquosa transferida para outro tubo contendo isopropanol. Posteriormente, o RNA formado foi lavado em etanol (75%) e centrifugado a 7000g por 5min. O sedimento de RNA foi secado à temperatura ambiente, ressuspensão em água livre de RNase e armazenado a -80°C. A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria (260/280 nm).

Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado 2 µg do RNA total com a mistura de 146 ng de randomprimers, 200 U da enzima transcriptase reversa, tampão da enzima (Tris-HCl a 50 mM (pH 8.0), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), DTT (5 mM), dNTP (500 µM) para

um volume final de 20 µL. Esta mistura foi incubada por 2 min a 25°C para permitir a hibridização dos oligonucleotídeos randômicos ao RNA.

Posteriormente, a expressão dos genes listados na tabela 1 foi quantificada por PCR em tempo real. As reações foram realizadas em mistura (12 µL), a mistura continha cDNA da amostra (2 µL) sequências de primersense e antisense (0,6 µL/300nM), água DEPC (3,25 µl) e mix Eva Master Mix- SYBR 1-step QRT-PCR Invitrogen (6 µL), seguindo as condições de ciclagem indicada pelo fabricante do mastermix.

Tabela 1 - Lista de primers que foram avaliados no projeto.

ALVO	FOWARD	REVERSA
BIOGÊNESE MITOCONDRIAL		
TFAM	GGGCAAGGCTTGATTCATGTG	AGGCTTATGAGTGCTGTGGT
DINÂMICA MITOCONDRIAL		
DRP1	CACTGTTGGCTTTCGTGAGA	GTTCTCGAAACCTGGTGGAA
OPA1	AGGGGACAGTGAACGCATAC	GGCTTGGACCTGCTACTCTG
SUBCOMPLEXOS MITOCONDRIAIS		
NDUFB8	GGGACTTCGCAGGATCAGTG	CGAGACCTCAGTGTGGGAAG
UQCRC2	ACATGCCACCATCCACAGTC	ACTGCCCAAGGACGCTTATG
ENZIMAS ANTIOXIDANTES		
CAT	CTGCAAATGCCCCAACTGTC	AGAAACTGAGACGGAGTCTGC
SOD	AAAGATGGTGTGGCCGATGT	TGGATCTTTAGAAACCGCGACT

5.7. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão da média. Para comparação dos dados foi utilizado o teste de análise de variância ANOVA One Way seguido do pós-teste de comparações múltiplas TUKEY. O nível de significância foi mantido em 5% ($p < 0.05$).

6 RESULTADOS

Análise sorológica e molecular da bioenergética, dinâmica mitocondrial e enzimas antioxidantes de células linfomononucleares (PBMC) de pacientes com infecção pelo vírus Chikungunya na fase crônica submetidos a um treinamento físico.

6.1 Ensaio imunoenzimático

Na primeira etapa da pesquisa foram conseguidos 42 pacientes. Esses pacientes tiveram seu sangue coletado e submetidos a técnica de ELISA para identificação de anticorpos de memória para CHIKV (Tabela 1). Dos 42 pacientes, cerca de 21,4% apresentaram resultado negativo para anticorpos de memória, assim, estes foram alocados para o grupo controle. Os outros 78,6% foram agrupados como grupo infectado por apresentarem anticorpos de memória para CHIKV. Desses indivíduos foi realizada a razão semiquantitativa e média da absorbância da cronicidade do vírus por IgG, onde o grupo controle ($<0,08/0,570$) apresentou resultados menores de IgG em relação ao infectado ($\geq 1,1/162,81$), o cálculo para medida de cronicidade foi baseado no protocolo descritos pelos fabricantes do kit. A fase crônica era identificada quando os pacientes apresentam sequelas da doença após cerca de 3 meses do período de viremia.

Entretanto, após avaliar o interesse e disponibilidade dos indivíduos em participar do programa de treinamento proposto, a amostra ficou composta por 21 pacientes, sendo destes, 8 com resultado negativo e 13 com resultado positivo pelo ensaio imunoenzimático.

Tabela 2 - Resultados do teste imunoenzimático por ELISA			
IDENTIFICAÇÃO	RESULTADO POSITIVO	IDENTIFICAÇÃO	RESULTADO NEGATIVO
P1	+	P8	-
P2	+	P25	-
P3	+	P26	-
P4	+	P30	-
P5	+	P35	-
P6	+	P39	-
P7	+	P40	-
P9	+	P41	-
P10	+	P42	-
P11	+		
P12	+		
P13	+		
P14	+		
P15	+		
P16	+		
P17	+		

P18	+		
P19	+		
P20	+		
P21	+		
P22	+		
P23	+		
P24	+		
P27	+		
P28	+		
P29	+		
P31	+		
P32	+		
P33	+		
P34	+		
P36	+		
P37	+		
P38	+		

6.2 Análise molecular

6.2.1 Expressão gênica das enzimas antioxidantes

Para realizar a avaliação do sistema antioxidante enzimático foi realizada a análise da expressão gênica das enzimas Catalase (CAT) e Superóxido dismutase (SOD), que são componentes importantes do sistema antioxidante enzimático que visam controlar a produção excessiva de espécies reativas através da transformação desses compostos em outros menos nocivos às células.

Os resultados do RT-PCR mostram que a infecção crônica por CHIKV causa um aumento na expressão da SOD (C: $1,000 \pm 0,9220$ vs CHIKV: $42,22 \pm 3,040$, $p < 0,0001$), entretanto, a CAT não sofre mudanças na sua expressão devido a infecção crônica. Por outro lado, quando os pacientes são submetidos ao treinamento físico, é identificado um aumento na expressão de ambas as enzimas antioxidantes, SOD (CHIKV: $42,22 \pm 3,040$ vs CHIKV + EF: $113,2 \pm 10,30$, $p < 0,0001$) e CAT (CHIKV: $1,294 \pm 0,7200$ vs CHIKV + EF: $50,80 \pm 9,058$, $p < 0,0001$) (Figura 10).

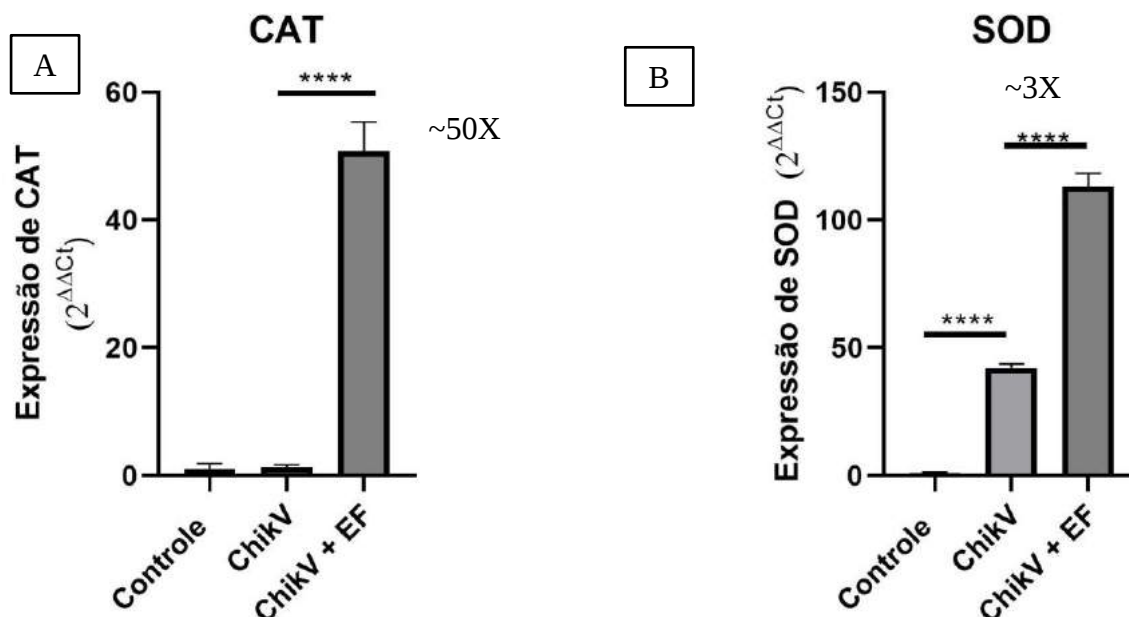


Figura 10- Enzimas antioxidantes. A-Expressão gênica da enzima catalase nos indivíduos com CHIKV e nos indivíduos submetidos ao treinamento; B- Expressão gênica da enzima superóxido dismutase nos indivíduos com CHIKV e nos indivíduos submetidos ao treinamento. N=4 pacientes por grupo. Os gráficos foram expressos em média do $2\Delta\Delta Ct \pm EPM$ considerando o teste Anova One Way, seguido pelo pos-teste de TUKEY. **** $p < 0,0001$.

6.2.2 Expressão gênica das proteínas de dinâmica mitocondrial

Para avaliar a dinâmica mitocondrial das PBMC, foi realizado o RT-PCR dos genes das seguintes proteínas: Dinamina citosólica 1 (DRP1) e da proteína de atrofia óptica 1 (OPA1). Nossos resultados mostram que a infecção crônica pelo CHIKV resulta em um aumento no processo de fissão mitocondrial, onde a expressão de DRP1 foi maior no grupo CHIKV em relação ao grupo Controle (C: $1,000 \pm 1,434$ vs CHIKV: $37,40 \pm 10,43$, $p = 0,0017$), entretanto, não houve diferença significativa na expressão de OPA 1 (C: $1,000 \pm 0,9760$ vs CHIKV: $1,193 \pm 1,160$) nos indivíduos do grupo CHIKV. Em relação ao grupo submetido ao exercício físico, os resultados mostram que o processo de fissão mitocondrial aumentou quase 2 vezes mais em comparação com o grupo CHIKV (CHIKV: $37,40 \pm 10,43$ vs CHIKV + EF: $67,00 \pm 12,53$, $p = 0,0017$). Além disso, o treinamento aumentou aproximadamente 16 vezes a expressão de OPA1 (CHIKV: $1,193 \pm 1,160$ vs CHIKV + EF: $16,06 \pm 0,9699$, $p < 0,0001$).

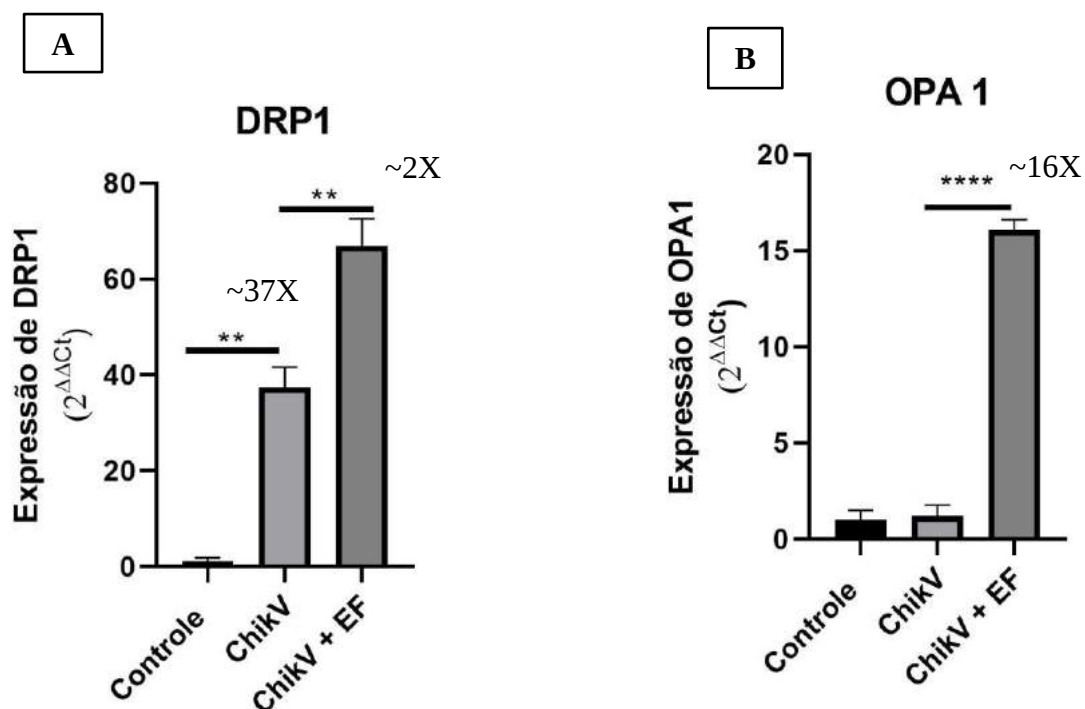


Figura 11- Dinâmica mitocondrial. A-Expressão gênica da proteína dinamina citosólica 1 nos indivíduos com CHIKV e nos indivíduos submetidos ao treinamento; B- Expressão gênica da proteína de atrofia óptica 1 nos indivíduos com CHIKV e nos indivíduos submetidos ao treinamento. N=3-5 pacientes por grupo. Os gráficos foram expressos em média do $2^{\Delta\Delta Ct} \pm EPM$ considerando o teste Anova One Way, seguido pelo pos-teste de TUKEY. ** $p=0,0017$ **** $p<0,0001$.

6.2.3 Expressão gênica do TFAM e complexos mitocondriais

Para avaliar como se encontra o processo de biogênese mitocondrial e a atividade da cadeia transportadora de elétrons (CTE), foi analisada a expressão gênica do fator de transcrição mitocondrial (TFAM) e de subunidades dos complexos mitocondriais 1 e 3. Nossos resultados mostram que a infecção crônica aumentou a expressão gênica de ambos os complexos mitocondriais, o complexo 1 (C: $1,000 \pm 2,182$ vs CHIKV: $17,21 \pm 5,440$, $p=0,0022$) e o complexo 3 (C: $1,000 \pm 1,020$ vs CHIKV: $20,74 \pm 8,072$, $p=0,0049$), como também a expressão do TFAM (C: $1,000 \pm 0,9682$ vs CHIKV: $14,25 \pm 2,885$, $p<0,0001$). Após o treinamento, ocorreu diminuição da expressão do complexo 3 (CHIKV: $20,74 \pm 8,072$ vs CHIKV+EF: $7,846 \pm 7,055$, $p=0,0235$) e do TFAM (CHIKV: $14,25 \pm 2,885$ vs CHIKV + EF: $0,1470 \pm 0,1160$, $p<0,0001$) e aumento na expressão do complexo 1 (CHIKV: $17,21 \pm 5,440$ vs CHIKV + EF: $56,10 \pm 5,641$, $p<0,0001$) em comparação com o grupo CHIKV, conforme mostra a figura 12.

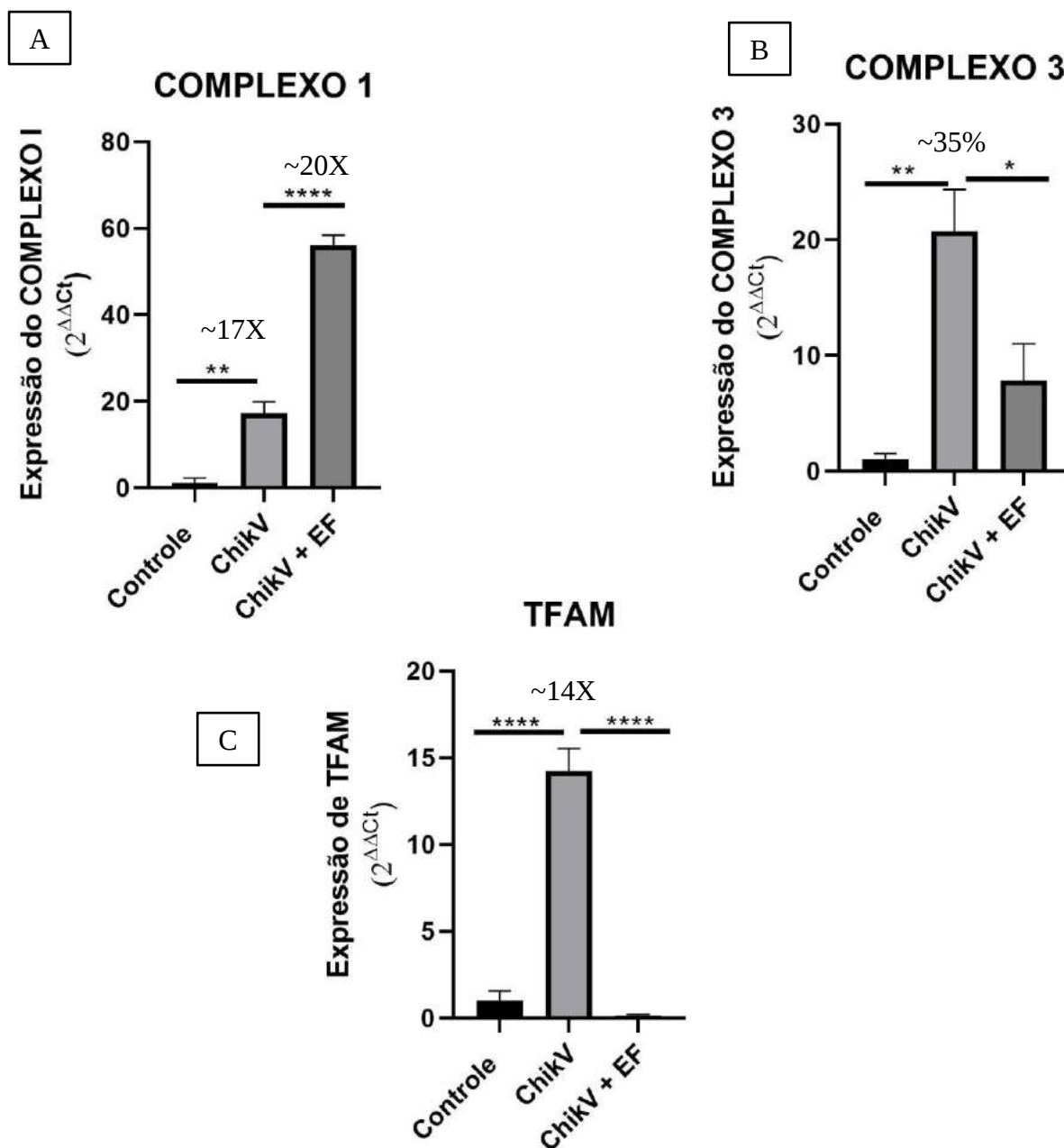


Figura 12- Complexos mitocondriais e TFAM. A-Expressão gênica do complexo 1 nos indivíduos com CHIKV e nos indivíduos submetidos ao treinamento; B- Expressão gênica do complexo 3 nos indivíduos com CHIKV e nos indivíduos submetidos ao treinamento; C- Expressão gênica do TFAM nos indivíduos com CHIKV e nos indivíduos submetidos ao treinamento. N=3-5 pacientes por grupo. Os gráficos foram expressos em média do $2^{\Delta\Delta Ct} \pm EPM$ considerando o teste Anova One Way, seguido pelo pos-teste de TUKEY. **p=0,0022 (figura 12-A); *p=0,0235 **p=0,0049 (figura 12-B), ****p<0,0001.

7 DISCUSSÃO

A literatura vem mostrando que em infecções virais de perfil crônico ocorre uma constante geração de espécies reativas, o que dependendo da intensidade nessa produção pode desencadear um estado de estresse oxidativo ao organismo (PETERHANS, 1979; RESHI *et al.*, 2014). Em nosso estudo, investigamos algumas alterações moleculares que a infecção por CHIKV causa nos indivíduos que apresentam a fase crônica da infecção e propomos um programa de exercício físico como terapia não farmacológica para o tratamento desses pacientes.

Dois pontos importantes a se destacar é que, primeiro, não há tratamento farmacológico específico para infecção por CHIKV; e segundo, existe uma escassez sobre a fisiopatologia dos arbovírus artrítogênicos na literatura. Sabendo disso, destaca-se a importância de novos recursos que possam auxiliar essa parcela da população infectada na melhoria de sua qualidade de vida.

Os resultados desse estudo mostram que a fase crônica da infecção causa diversas modificações em parâmetros moleculares das PBMC e que o programa de exercício físico proposto foi capaz de modular vários desses parâmetros. Em relação ao sistema antioxidante enzimático foi visto que a fase crônica da infecção por CHIKV promove aumento na expressão da enzima antioxidante SOD, e que o exercício físico proposto induziu tanto um maior aumento na expressão da SOD, como também na CAT em células imunes desses pacientes. Narayanan *et al.* (2011), mostrou em seu trabalho que em infecções por Vírus da Febre do Vale do Rift (RVFV), os níveis de SOD aumentam após 24h de infecção e isso acontece como uma resposta do hospedeiro em melhorar suas defesas antioxidantes para combater o patógeno invasor (NARAYANAN *et al.*, 2011). Além desse estudo, outro proposto por Banerjee, Mukhopadhyay (2018) com PBMC de pacientes acometidos por CHIKV também mostrou que durante à infecção, os níveis de SOD aumentam e que, além disso, existe uma correlação negativa entre a SOD e os níveis de MDA que é um biomarcador de peroxidação lipídica, onde quanto maior a atividade da SOD, menor os níveis de MDA (BANERJEE; MUKHOPADHYAY, 2018). Sobre a catalase, alguns estudos com arbovírus artrogênicos já vem mostrando o aumento de sua atividade, como no estudo de Cmini *et al* (2017), em que células de hepatocarcinoma humano infectadas com Mayaro vírus (MAYV) demonstraram aumentar a atividade da catalase 15h após à infecção, o que não foi encontrado em nossos resultados da infecção, porém, o exercício físico foi capaz de estimular a expressão dessa enzima para melhorar a atividade antioxidante de células

linfomononucleares desses pacientes. Nossos resultados sobre a infecção, atrelados a melhoria na expressão de enzimas do sistema antioxidante são indícios de que o treinamento atuou como um agente modulador celular positivo contra o estresse oxidativo.

Outro achado importante no nosso estudo foi a expressão dos genes relacionados a dinâmica mitocondrial, que é um processo importante para manutenção de mitocôndrias saudáveis metabolicamente e para a formação de novas mitocôndrias, no processo de biogênese mitocondrial. Durante infecções ou outras desregulações que danifiquem a mitocôndria, essa organela tem a capacidade de se fundir com outras mitocôndrias para tornar-se uma maior e metabolicamente mais ativa ou pode sofrer fissão das partes mitocondriais danificadas para melhorar sua atividade. Nossos resultados sugerem que a fase crônica da infecção por CHIKV aumenta a expressão do gene DRP1 relacionado ao processo de fissão e que após o treinamento ocorre um aumento tanto dos genes de fissão quanto de fusão (OPA1). Mostrando assim que o treinamento ajuda a mitocôndria tanto na retirada de suas partes lesadas e/ou disfuncionais pelo aumento de DRP1, quanto auxilia as mitocôndrias saudáveis a aumentarem de tamanho e se tornarem uma organela metabolicamente mais ativa. Essas alterações na dinâmica mitocondrial já foram encontradas em outros estudos com arbovírus, por exemplo, no estudo realizado por Barbier *et al.* (2017) com células Vero infectadas por dengue vírus (DENV), foi encontrado um aumento na expressão de DRP1 durante a infecção, além disso, quando realizaram uma superexpressão do DRP1 ocorreu inibição da replicação viral, sinalizando pelo autor que talvez haja uma relação do aumento da replicação viral e o aumento de DRP1 (BARBIER *et al.*, 2017). Outro estudo realizado por Yu *et al.* (2015) com células das linhagens Vero marcadas com mitoYFP e mitoCherry infectadas por DENV, mostrou que os níveis de proteínas de fissão se mantêm aumentados durante a infecção, porém diminuem os níveis das proteínas de fusão, o que corrobora com nossos resultados. Assim, o treinamento ao aumentar a expressão de proteínas de fissão e fusão mostrou ser um agente eficaz em auxiliar a mitocôndria em manter-se metabolicamente mais ativa.

Em relação a expressão de genes relacionados a cadeia transportadora de elétrons e biogênese mitocondrial foram avaliados a expressão de genes dos subcomplexos mitocondriais I e III e do TFAM, respectivamente. O TFAM é um importante gene associado a duplicação do DNA mitocondrial durante a formação de novas mitocôndrias, além disso, ele apresenta uma forte relação como sinalizador do processo inflamatório, auxiliando no controle da produção de citocinas por linfócitos (DESDIN-MICÓ *et al.*, 2020). Sobre os complexos mitocondriais da CTE, a literatura não mostra como se encontra sua expressão

em infecções por arbovírus, entretanto, alguns estudos analisam a atividade de fosforilação oxidativa através da avaliação da respiração mitocondrial e fazem uma co-relação com as atividades dos complexos da cadeia. Em um estudo realizado com células de neuroblastoma de camundongo infectadas por Sindbis vírus, foi identificado que ocorre um aumento na fosforilação oxidativa e o autor sugere que esse resultado pode estar associado a um aumento na capacidade de fosforilação suportadas pelos complexos I e II (COSTA *et al.*, 2012). Em um outro estudo realizado com células vero e células de astrocitoma humano infectadas com o vírus da encefalite equina venezuelana, foi identificado que a infecção reduz o potencial elétrico da membrana mitocondrial, sugerindo que essa diminuição afeta a cadeia transportadora de elétrons (CTE) diminuindo sua atividade de transporte reduzindo assim a fosforilação oxidativa (KECK *et al.*, 2018). Embora haja essa divergência de aumento ou diminuição da atividade da CTE em infecções virais na literatura, nosso estudo se assemelha aos resultados de Keck *et al.* (2018) mostrando uma redução na expressão do complexo I que é o primeiro complexo da CTE, além disso, o exercício aumentou a expressão de uma subunidade desse complexo em células imunes de pacientes submetidos ao exercício.

Nos nossos resultados, o TFAM apresentou-se aumentado no grupo CHIKV e após o exercício ocorreu uma redução bastante acentuada da sua expressão. Essa proteína é associada ao processo de biogênese mitocondrial, entretanto, alguns estudos vêm mostrando que existe uma relação do TFAM com a atividade inflamatória. Em um estudo realizado por Desdín-micó *et al.* (2020) foi visto que em células T de camundongos em que há o bloqueio na expressão do TFAM ocorre uma desregulação na produção de citocinas aumentando seus níveis circulantes no sangue gerando um desequilíbrio imunometabólico (DESDIN-MICÓ *et al.*, 2020). Não há estudos com humanos que analisem a relação do TFAM com a atividade inflamatória mediada por células T, porém, nossos resultados sugerem que o aumento na expressão do TFAM está associado a uma tentativa das PBMC de regular a produção excessiva de citocinas inflamatórias mesmo na fase crônica da infecção, a fim de evitar um distúrbio imunometabólico. Dessa forma, sua diminuição após o exercício físico estaria associada a uma melhoria do quadro inflamatório observado nesses pacientes. Um fator que merece ser destacado foram os relatos das pacientes que tiveram a infecção e realizaram o treinamento físico, todas elas disseram que faziam uso de analgésicos por conta das dores articulares recorrentes e que após o treinamento não precisaram fazer mais uso de medicações.

8 CONCLUSÃO

Em modelos de infecção *in vitro* por arbovírus, alterações na bioenergética mitocondrial podem auxiliar os vírus no processo de replicação, entretanto, alterações celulares decorrentes do aumento exagerado de espécies reativas causam um desequilíbrio no estado REDOX que pode levar ao estresse oxidativo e sinalização para morte celular.

Esse trabalho também mostrou que indivíduos acometidos por CHIKV na fase crônica apresentam alterações na expressão de genes associados ao balanço oxidativo e homeostase mitocondrial. Além disso, o treinamento físico proposto nesse estudo parece promover uma maior expressão do sistema antioxidante enzimático e de genes relacionados a dinâmica mitocondrial, podendo resultar numa melhoria da bioenergética de células linfomononucleares e no quadro inflamatório crônico observado nesses pacientes.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; PARIDA, M.; DASH, P.K. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. **Reviews in Medical Virology**, Chichester, v.7, n.5, e1941, 2017.
- ALMOKHTAR, A. A *et al.* Oxidative stress and antioxidant mechanisms in human body. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, Edmond, v.6, n.1, p.43-47, 2019.
- ALVES, J. C.; BASSITT, D. P. Quality of life and functional capacity of elderly women with knee osteoarthritis. **Einstein**, São Paulo, v. 11, n. 2, p. 209-215, 2013.
- AMARAL, J. K.; BILSBORROW, J. B.; SCHOEN, R. T. Brief report: the disability of chronic chikungunya arthritis. **Clinical rheumatology**, Brussels, v. 38, n. 7, p. 2011-2014, 2019.
- AN, W *et al.* Recent progress on chikungunya virus research. **Virologica Sinica**, Wuhan, v. 32, n. 6, p. 1-13, 2017.
- AZEREDO, E.L *et al.* Clinical and laboratory profile of Zika and dengue infected patients: lessons learned from the co-circulation of dengue, Zika and chikungunya in Brazil. **PLoS Curr**, San Francisco, v. 10, n.1, p1-19, 2018.
- BANERJEE, N.; MUKHOPADHYAY, S. Oxidative damage markers and inflammatory cytokines are altered in patients suffering with post-chikungunya persisting polyarthralgia. **Free radical research**, London, v.52, n.8, p.887-895, 2018.
- BARBANTI, V.J.; TRICOLI, V.; UGRINOWITSCH, C. Relevância do conhecimento científico na prática do treinamento físico. **Revista Paulista de Educação Física**, São Paulo (SP), v.18, p.101-109, 2004.
- BARBIER, V *et al.* Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. **Virology**, New York, v. 500, p.149-160, 2017.
- BECKHAM, D.J.; TYLER, K.L. Arbovirus Infections. Continuum (Minneapolis, Minn). **Neuroinfectious Disease**, Hagerstown, v.21, n.6, p.1599-611, 2015.
- BELEZA, J. D.; RIZO-ROCA, A.; ASCENSÃO, J. Magalhães Targeting mitochondria with sweat: improving mitochondrial function with physical activity. Mitochondrial biology and experimental therapeutics. **Springer**, New York, p. 379-406. Mar, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de Chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v. 46, n. 36, 2017.
- BREIVIK, H *et al.* Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. **Eur J Pain**: Inglaterra, Chichester, v.10, n.4, p287-333, 2006.
- BRITO, C.A.A *et al.* Pharmacologic management of pain in patient with Chikungunya: a guideline. **Rev Soc Bras Med Trop**, Uberaba, v.49, n.6, p.668-679, 2016.

BURT, F.J *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. **Lancet Infect Dis**, New York, v.17, n.4, p.107-117, 2017.

CAETANO, C. C. D. S. **Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em macrófagos murinos após infecção pelo Mayaro virus (Togaviridae)**. 2016. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, MG. 2016.

CAMINI, F. C *et al.* Oxidative stress in Mayaro virus infection. **Virus research**, Amsterdam, v.236, p.1-8, 2017.

CAMINI, F. C. *et al.* Caraparú virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection. **Archives of Virology**, New York, v. 159, n. 10, p. 2621–2632, 2014.

CARRAL, L. *et al.* Chikungunya Virus Vaccine Candidates with Decreased Mutational Robustness Are Attenuated *In Vivo* and Have Compromised Transmissibility. **J Virol**, Washington, v.28, n.93, e00775-19, 2019.

CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public Health Rep**, Thousand Oaks-CA, v. 100, n. 2, p. 126-31, 1985.

CAVALHEIRO, M. 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.1485-99, 2016.

CHARREL, R.N. *et al.* Chikungunya outbreaks-the globalization of vectorborne diseases. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 356, n. 8, p. 769, 2007.

CHATEL-CHAIX, L *et al.* Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. **Cell host & microbe**, Cambridge, v.20, n.3, p.342-356, 2016.

CHERUPANAKKAL, C *et al.* Lipid peroxidation, DNA damage, and apoptosis in dengue fever. **IUBMB life**, London, v.70, n.11, p.1133-1143, 2018.

CHOW, A.*et al.* Persistent Arthralgia Induced by Chikungunya Virus Infection is Associated with Interleukin-6 and Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v.203, p.149– 157, 2011.

COFFEY, L. L *et al.* Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: Implications for the emergence of disease. **Future Microbiology**, London, v. 8, n.2, p.155-176, 2013.

COSTA, J. P.; BECK, S. T. Avanços no diagnóstico e tratamento da artrite reumatoide. **Saúde** (Santa Maria), Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 65-76, 2011.

DATAN, E *et al.* Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation. **Cell death & disease**, London, v.7, n.3, e2127, 2016.

DESDÍN-MICÓ, G *et al.* T cells with dysfunctional mitochondria induce multimorbidity and premature senescence. **Science**, New York, N.Y, v. 368, n. 6497, 2020.

DEZURE, A.D. *et al.* Whole-inactivated and virus-like particle vaccine strategies for chikungunya virus. **The Journal of infectious diseases**, Oxford, v. 214, n.5, p. 497-499, 2016.

DHANWANI, R *et al.* Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus research**, Amsterdam, Netherlands, v.163, n.2, p.563-72, 2012.

DINAKAR, C.; DJILIANOV, D.; BARTELS, D. Photosynthesis in desiccation tolerant plants: energy metabolism and antioxidative stress defense. **Plant Science**, Shannon, v. 182, p. 29-41, 2012.

ERASMUS, J.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.

FAUCI, A.S.; MORENS, D.M. Zika virus in the Americas yet another arbovirus threat. **N Engl J Med**, Boston, v.374, n.7, p.601–604, 2016.

FERNANDES-SIQUEIRA, L.O *et al.*, Anaplerotic Role of Glucose in the Oxidation of Endogenous Fatty Acids During Dengue Virus Infection. **mSphere**, Washington, v.3, n.1, e00458-17, 2018.

FERRARESSO, R. L. P. *et al.* Interaction between overtraining and the interindividual variability may (not) trigger muscle oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in rats. **Oxid Med Cell Longev**, New York, v.2012, n.1, p.11, 2012.

FIRTH, A. E *et al.* Discovery of frameshifting 6K resolves a 20 – years enigma. **Virology Journal**, London, v.5, n.108, p.1-19, 2008.

FLETCHER, J. A.; *et al.* Fibroblast growth factor 21 and exercise-induced hepatic mitochondrial adaptations. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, Bethesda, v. 310, p. G832-G843. May 2016.

FONTAINE, A. K *et al.* Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. **J Virol**, Washington, v.89, n.4, p.2358-66, 2014.

FORRESTER, N.L *et al.* Genome-Scale Phylogeny of the Alphavirus Genus Suggests a Marine Origin. **J Virol**, Washington, v.86, n.5, p.2729–2738. 2012.

FRANCO, E. J *et al.* The effectiveness of antiviral agents with broad-spectrum activity against chikungunya virus varies between host cell lines. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, London, v. 26, p. 2040206618807580, 2018.

FUMAGALLI, Marcílio Jorge. **Desenvolvimento de métodos sorológicos para diagnóstico de infecções pelos vírus Chikungunya e Mayaro**. 2018. Tese (Doutorado em Imunologia básica e aplicada) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

GALLÁN-HUERTA, K.A *et al.* Chikungunya vírus: A general overview. **Medicina Universitaria**, San Nicolás de los Garza, v.17, n.68, p.175-183, 2015.

GALLUZZI, G *et al.* Mitochondria: master regulators of danger signalling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, London, v.13, n12, p780–8, 2012.

GONCALVES, I. O *et al.* Exercise as a therapeutic tool to prevent mitochondrial degeneration in nonalcoholic steatohepatitis. **Eur J Clin Invest**, Oxford, v. 43, n. 11, p. 1184–94, 2013.

GRIFFIN, D. E. *et al.* (eds.). **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

GULLBERG, R.C *et al.* Oxidative Stress Influences Positive Strand RNA Virus Genome Synthesis and Capping. **Virology**, New York, v.15, p475:219-29. 2015.

HAWMAN D.W *et al.* Chronic Joint Disease Caused by Persistent Chikungunya Virus Infection is Controlled by the Adaptive Immune Response. **J. Virol.**, Washington, v. 87, n. 24, p. 13878–13888, 2013.

HER, Z. *et al.* Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. **J Immunol**, Baltimore, v. 184, p. 5903–5913, 2010.

HERMES, M. L. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. *In*: STOREY, K. B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, May 2004. p. 319- 368.

HOOD, D. A. *et al.* Coordination of metabolic plasticity in skeletal muscle. **J Exp Biol.**, London, v. 209, n. 12, p. 2265-2275, 2006.

HOOD, D.A. Mechanisms of exercise-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Appl Physiol Nutr Metab.**, Ottawa, v.34, n.3, p.465-472, 2009.

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

JAFFAR-BANDJEE, M. C. *et al.* Emergence and clinical insights into the pathology of Chikungunya virus infection. **Expert Rev Anti Infect Ther**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 987-96, 2010.

JOHNSON B.W.; RUSSELL BJ, GOODMAN C.H. Laboratory Diagnosis of Chikungunya Virus Infections and Commercial Sources for Diagnostic Assays. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v.214, n.5, p.471–474, 2016.

JOMOVA, K; VALKO, M. Importance of iron chelation in free radical- induced oxidative stress and human disease. **Current pharmaceutical design**, Sharjah, v. 17, n. 31, p. 3460-3473, 2011.

JONES, R. Arbovirus vectors of epidemiological concern in the Americas: A scoping review of entomological studies on Zika, dengue and chikungunya virus vectors. **PLoS One**, San Francisco, v.15, n.2, e0220753, 2020.

KECK, F *et al.* Altered mitochondrial dynamics as a consequence of Venezuelan Equine encephalitis virus infection. **Virulence**, Philadelphia, v.8, n.8, p.1849–1866, 2017.

KECK, F *et al.* Mitochondrial-Directed Antioxidant Reduces Microglial-Induced

Inflammation in Murine In Vitro Model of TC-83 Infection. **Viruses**, Basel, v.10, n.11, p.606, 2018.

KIM, S.J *et al.* Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.111, p.6413–6418, 2014

KUHN, R. J. Togaviridae. *In*: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology Sixth edition**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v. 1, p.629-650.

KUHN, R. J. Togaviridae: The viruses and their replication. *In*: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. v. 1. p. 1001-1022.

KURKELA, S *et al.* Clinical and laboratory manifestations of Sindbis virus infection: prospective study, Finland, 2002-2003. **J Infect Dis**, Chicago, v.191, n.11, p. 1820-9, 2005.

LABADIE, K *et al.* Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **J Clin Invest**, New Haven, v.120, n.3, p. 894-906, 2010.

LAI, J *et al.* Infection with the dengue RNA virus activates TLR9 signaling in human dendritic cells. **EMBO reports**, London, v.19, n.8, e46182, 2018.

LETA, S *et al.* Global Risk Mapping for Major Diseases Transmitted by *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*. **Int J Infect Dis**, Hamilton, v.67, p.25-35, 2018.

LEVERVE, X. M. Mitochondrial function and substrate availability. **Crit Care Med**, New York, v. 35, n. 9, p.454-60, 2007.

LI, G *et al.* Characterization of Cytopathic Factors Through Genome-Wide Analysis of the Zika Viral Proteins in Fission Yeast. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, v.114, n3, e376-E385, 2017.

LI, X. D *et al.* Effects of high intensity exhaustive exercise on SOD, MDA, and NO levels in rats with knee osteoarthritis. **Genet. Mol. Res**, Ribeirao Preto, v. 14, p. 12367–12376. Oct. 2015.

LIMA, F. D.; *et al.* Swimming training induces liver mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. **Plos One**, San Francisco, v. 8, p. 55668, 2013.

LIU W *et al.* Dynamic changes of mitochondrial fusion and fission proteins after transient cerebral ischemia in mice. **J Neurosci Res**, New York, v.90, n6, p1183-1189, 2012

LIU, J *et al.* Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. **J Appl Physiol**, Bethesda-MD, v. 89, n. 1, p. 21-28, 2000.

LIU, Y. Reviewing Estimates of the Basic Reproduction Number for Dengue, Zika and Chikungunya Across Global Climate Zones. **Environ Res**, Amsterdam, v.182, p109-114, 2020.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 5, n. 3, p.55-64,

2014. DOI:10.5123/S2176-62232014000300007

LUM, F.M.; N.G.; LISA, F.P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral research**, Amsterdam, v. 120, n.1, p. 165-174, 2015.

MANIMUNDA, S.P *et al.* Clinical progression of chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 392-399, 2010.

MARCHI, S.; TROMBETTA C.M.; MONTOMOLI, E. Emerging and Re-emerging Arboviral Diseases as a Global Health Problem. *In*: MAJUMDER, A. A.; KABIR, R.; RAHMAN, S. (eds.). **Public Health: Emerging and Re-emerging Issues**. London: IntechOpen, 2018.

MARQUES, C.D.L *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, n.2, p. 421-437, 2017.

MAYNARD, N.D *et al.* The virus as metabolic engineer. **Biotechnol J**, Weinheim, v.5, n.7, p.686–694, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2017. Epidemiológico. Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/10/2017-046-Publicacao.pdf> (Acesso em: 16/06/2018).

MOHAN, A. Chikungunya fever: clinical manifestations & management. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 124, n. 5, p. 471, 2006.

MORAIS, P.K *et al.* Acute resistance exercise is more effective than aerobic exercise for 24 h blood pressure control in type 2 diabetics. **Diabetes & Metabolism**, Paris (França), v.37, p. 112-117, 2011.

MORENO-ALTAMIRANO, M. M *et al.* Dengue Virus Serotype-2 Interferes with the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. **Intervirology**, Basel, v.58, n.4, p.250-9, 2015.

MORRISON, T.E *et al.* Characterization of Ross River virus tropism and virus-induced inflammation in a mouse model of viral arthritis and myositis. **J Virol**, Washington, v.80, n.2, p.737-49, 2006.

MUKHERJEE, P *et al.* Activation of the Innate Signaling Molecule MAVS by Bunyavirus Infection Upregulates the Adaptor Protein SARM1, Leading to Neuronal Death. **Immunity**, Cambridge, v.38, n.4, p.705-16, 2013.

MUNOZ, M.; NAVARRO, C. Mayaro a re-emerging Arbovirus in Venezuela and Latin America. **Biomédica**, Bogota, v. 32, p. 286-302, 2012.

NARAYANAN, A *et al.* Alteration in superoxide dismutase 1 causes oxidative stress and p38 MAPK activation following RVFV infection. **PloS one**, San Francisco, v.6, n.5, e20354, 2011.

NARAYANAN, A *et al.* Reactive oxygen species activate NFκB (p65) and p53 and induce

apoptosis in RVFV infected liver cells. **Virology**, New York, v.449, p.270–286, 2014.

NASAR, F *et al.* Eilat virus, a Unique alphavirus with host range restricted to insects by RNA replication. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v.109, n.36, p.14622-7, 2012.

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

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics**. [S. l.]: Elsevier, 2002.

NISOLI E. *et al.* Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v.101, n.47, p.16507-16512, 2004.

NUNES, M.R.T. *et al.* Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Med**, London, v. 13, p. 102. 2015.

OLAGNIER, D *et al.*, Cellular Oxidative Stress Response Controls the Antiviral and Apoptotic Programs in Dengue Virus-Infected Dendritic Cells. **PLoS Pathog**, San Francisco, v.10, n.12, e1004566, 2014.

OTERA, H.; MIHARA, K. Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. **J Biochem.**, Tokyo, v.149, n.3, p.241-51, 2011.

PACHAURI, R. K.; MAYER, L. **Climate change 2014: synthesis report**. Genebra: Intergovernmental Panel on Climate Change, 2015. Disponível em: <https://www.wcadapt.org/knowledge-base/national-adaptation-planning/climate-change-2014-synthesis-report>. Acesso em: 10 jul. 2019.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Preparedness and response for Chikungunya Virus: Introduction in the Americas**. Washington (DC): PAHO, 2011.

PIALOUX, G. *et al.* Chikungunya, an epidemic arbovirosis. **Lancet Infect Dis**, Nova York, v. 7, n. 5, p. 319-2, 2007.

PIERRO, D. J.; POWERS, E. L.; OLSON, K. E. Genetic Determinants of Sindbis Virus Mosquito Infection Are Associated With a Highly Conserved Alphavirus and Flavivirus Envelope Sequence. **Journal of Virology**, Washington, v.82, n.6 p. 2966-2974, 2008.

PIZZINO G. N *et al.*, Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxid Med Cell Longev**, New York, v. 2017, n.1, e6341671, 2017.

POWERS A.M *et al.* Overview of emerging Arboviruses. **Future Virology**, Londres, v.4, n.4, p391-401, 2009.

POWERS, A.M. Vaccine and therapeutic options to control Chikungunya virus. **Clin Microbiol Rev**, Washington, v.31, n.1, e00104–16, 2017.

QI, Y *et al.* IFI6 Inhibits Apoptosis via Mitochondrial-Dependent Pathway in Dengue Virus 2 Infected Vascular Endothelial Cells. **PloS one**, San Francisco, v.10, n.8, e0132743, 2015.

RAWAT, S.; CLIPPINGER, A.; BOUCHARD, M. Modulation of apoptotic signaling by the hepatitis B virus X protein. **Viruses**, Basel, v. 4, n. 11, p. 2945- 2972, 2012.

RESHI, M.L.; SU, Y.C.; HONG, J.R. RNA viruses: ROS- mediated cell death. **International journal of cell biology**, Londres, v. 2014, p.16, 2014.

RODEN M. Exercise in type 2 diabetes: to resist or to endure? **Diabetologia**, Berlin, v.55, p. 1235-1239, 2012.

ROMANELLO V, SANDRI M. Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of protein degradation in striated muscles. **J Mol Cell Cardiol.**, London, v.55, p.64-72, 2013.

SA, K.N. *et al.* Prevalência de dor crônica e fatores associados na população de Salvador, Bahia. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.43, n.4, p.1-8, 2009.

SCHILTE, C *et al.* Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v.7, p. 2137, 2013.

SCHWAMEIS, M *et al.* Chikungunya vaccines in development. **Human vaccines & immunotherapeutics**, Philadelphia, v.12, n.3, p.716-31, 2015.

SHEERAN, F.L.; PEPE S. Mitochondrial Bioenergetics and Dysfunction in Failing Heart. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 982, p. 65–80, 2017.

SILVA DA COSTA, L *et al.* Mitochondrial bioenergetic alterations in mouse neuroblastoma cells infected with Sindbis virus: implications to viral replication and neuronal death. **PloS one**, San Francisco, v.7, n.4, e33871, 2012.

SILVA, F. O. C. D.; MACEDO, D. V. Physical exercise, inflammatory process and adaptive condition: an overview. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, Florianópolis, v. 13, n. 4, p. 320-328, 2011.

SILVA, L.A.; DERMODY, T S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of clinical investigation**, Ann Arbor, v. 127, n. 3, p. 737-749, 2017.

SILVA, N.M *et al.* Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 27, p. 2017-127, 2018.

SIMON, F. *et al.* French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). **Med Mal Infect**, Paris, v. 45, n. 7, p. 243-63, 2015.

WILDER-SMITH, A.W *et al.* Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. **Lancet Infect Dis**, Nova York, v. 17, n. 3, p. 101-6, 2017.

SOURISSEAU, M. *et al.* Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. **PLoS Pathog.**, San Francisco, v. 89, n. 6, 2007.

STEINBACHER, P.; ECKL, P. Impact of oxidative stress on exercising skeletal muscle. **Biomolecules**, Basel, v. 5, p. 356–377, jun. 2015.

SUN, L., *et al.* Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. **Life Sci**, New York, v.86, n.1, p. 39-44, 2010.

SYNDER, J. E. *et al.* Functional Characterization of the Alphavirus TF Protein. **Journal of Virology**, Washington, v. 87, n. 15, p. 8511-8523, 2013.

TAIT, S.W.; GREEN, D.R. Mitochondria and cell signalling. **J Cell Sci**, London, v. 125, n. 4, p. 807–15, 2012.

TERASAKI, K.; WON, S.; MAKINO, S. The C-terminal region of Rift Valley fever virus NSm protein targets the protein to the mitochondrial outer membrane and exerts anti-apoptotic function. **Journal of virology**, Washington, v. 87, n. 1, p. 676- 682, 2013.

THIBERVILLE, S.D *et al.* Chikungunya fever: a clinical and virological investigation of outpatients on Reunion Island south-west indian ocean. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v.7, n. 1, e:2004, 2013.

TOFAS, T *et al.* Exercise-Induced Regulation of Redox Status in Cardiovascular Diseases: The Role of Exercise Training and Detraining. **Antioxidants**, Basel, v. 23, n. 1, p.1-13. 2019.

TUNG, W *et al.* Japanese encephalitis virus induces matrix metalloproteinase-9 in rat brain astrocytes via NF- κ B signalling dependent on MAPKs and reactive oxygen species. **British journal of pharmacology**, London, v. 161, n.7, p.1566-83, 2010.

VALERO N. *et al.* Differential oxidative stress induced by dengue virus in monocytes from human neonates, adult and elderly individuals. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, e73221, 2013.

VALKO, M *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Netherlands, v.39, n.1, p.44-84, 2006.

VAN REGENMORTEL, M. H. V *et al.* **Virus Taxonomy**: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000.

VANEY, M. C *et al.* Alphavirus struture: activation for entry at the target cell surface. **Current Opinion in Virology**, Amsterdam, v.3, n. 2, p.151-158, 2013.

VASILCEAC, F.A *et al.* The remodeling of collagen fiber in rats ankles submitted to immobilization and muscle stretch protocol. **Rheumatology International**, Berlin, v. 31, n. 6, p. 737-742, 2011.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. Antioxidants, tissue damage, and endurance in trained and untrained young male rats. **Arch Biochem Biophys**, New York, v. 331, n. 1, p. 63-8, 1996.

VERHOEVEN F *et al.* Physical activity in patients with rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**. Paris, v.83, n3, p. 265-270, 2016.

VERMA, A. K *et al.* Microglial activation induces neuronal death in Chandipura virus infection. **Scientific reports**, London, v.6, e:22544, 2016.

WADLEY, Alexander J. *et al.* Monitoring changes in thioredoxin and over-oxidised peroxiredoxin in response to exercise in humans. **Free radical research**, London, v. 49, n. 3, p. 290-298, 2015.

WANG, H *et al.* Effects of manipulating apoptosis on Sindbis virus infection of Aedes

aegypti mosquitoes. **Journal of Virology**, Washington, v. 86, n.12, p. 6546-54, 2012.

WANG, X *et al.* Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**, Washington, v. 29, n. 28, p. 9090-9103, 2009.

WEAVER, S.C.; REISEN, W.K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res**, Amsterdam, v.85, n.2, p.328-45, 2010.

WEGER-LUCARELLI, J *et al.* Dissecting the role of E2 protein domains in alphavirus pathogenicity. **Journal of virology**, Washington, v. 90, n. 5, p. 2418-2433, 2016.

WEGER-LUCARELLI, J *et al.* Taking a Bite Out of Nutrition and Arbovirus Infection. **PLoS Negl Trop Dis**, San Francisco, v. 12, n. 3, e0006247, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A global brief on vector-borne diseases**. Geneva: WHO, 2014. Disponível em:
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111008/1/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf.
 Acesso em 15 jun. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. Geneva: WHO, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Acesso em: 03 jun. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue: Guidelines for treatment, prevention and control**. Geneva: World Health Organization, 2009. Disponível em:
<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2019.

YANG, T *et al.* Japanese encephalitis virus down-regulates thioredoxin and induces ROS-mediated ASK1-ERK/p38 MAPK activation in human promonocyte cells. **Microbes and infection**, Paris, v.12, n.8-9, p.643-51, 2010.

YU, C *et al.* Dengue Virus Impairs Mitochondrial Fusion by Cleaving Mitofusins. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 11, n.12, e1005350, 2015.

APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO NO SÃO PAULO MEDICAL JOURNAL

**Mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in in vitro arbovirus infection models:
A systematic review**

The article was submitted in the São Paulo Medical Journal:

Impactor factor: 0.95

Qualis (Quadriênio 2013-2016): B2 para Nutrição

Mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in in vitro arbovirus infection models: A systematic review

Wellington de Almeida Oliveira^{1,2}, Renata Emmanuele Assunção Santos^{2,3}, Gizele Santiago de Moura Silva^{1,2}, Kelli Nogueira Ferraz-Pereira², Ana Lisa do Vale Gomes², Mariana Pinheiro Fernandes^{1,2*}

¹Laboratory of Biochemistry and Exercise Biochemistry, Departament of Physical Education and Sports Science, Federal University of Pernambuco, Academic Center of Vitoria-CAV, Vitoria de Santo Antao, Pernambuco, Brazil

²Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity graduate program, Federal University of Pernambuco-CAV, Vitoria de Santo Antao, Pernambuco, Brazil

³Nutrition graduate program, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Running Title: Mitochondrial function and cellular REDOX balance in Arboviruses.

Article type: Systematic review

Mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in in vitro arbovirus infection models: A systematic review

Abstract

Objectives: The review aimed to assess mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in in vitro arbovirus infection models. **Methods:** The review was written in accordance with the PRISMA and submitted to the Open Science Framework platform with DOI 10.17605 / OSF.IO / 8ZF5W. The search for articles based on the descriptors/MeSH (Arbovirus, Arboviruses, Arbovirus infections, Mitochondria, Oxidative stress and Reactive oxygen species) was carried out on the platforms: PubMed, SCOPUS, COCHRANE, Lilacs and Web of Science. The quality analysis of the studies was performed using the ARRIVE tool adapted to the CONSORT, followed by the KAPPA concordance test. Were used according to the eligibility criteria, 24 articles remained. **Results:** Results show morphological alterations in the mitochondria, such as swelling, fragmentation, and the appearance of membranes. Mitochondrial stretching was more intense in regions close to the convoluted zones, associated with changes in the genes of mitochondrial dynamics. Changes in oxidative stress biomarkers, antioxidant enzymes and ROS production were evident in most articles, except for those that used cells of immunological origin in the studies. **Conclusion:** This review showed that changes in mitochondrial bioenergetics can assist the virus in the replication process, however, cellular changes resulting from the exaggerated increase in reactive species lead to imbalance in the oxidative state of the cell, causing damage and a possible framework of oxidative stress.

Keywords: Arboviruses; cells; mitochondria; REDOX balance.

Introduction

The incidence of arboviruses has come to be considered one of the main public health problems in recent years.¹ According to the World Health Organization (WHO) (2014)², more than a billion people are infected and more than a million people die every year from

arboviruses. This index is associated with the diversity of arboviruses and the pathologies caused by them, as it is estimated that there are more than 500 species of arboviruses, among which, more than 100 are associated with diseases in humans.³

Among the diversity of arboviruses, some, such as Dengue, Zika, and Chikungunya stand out in this century for presenting the highest combined numbers of morbidity and mortality.⁴ In addition to these, yellow fever virus, Rift valley fever virus, Japanese encephalitis virus, Venezuelan equine encephalitis virus, and West Nile virus, also cause a large number of infections every year. Most individuals infected with arboviruses are asymptomatic, but in symptomatic cases, symptoms can vary depending on the tropism of the virus by cells, organs, and systems. In mild and moderate cases of viral pathogenesis there may be the presence of fever, severe headaches, body aches, joint pain, vomiting, diarrhea, and rash.⁵ In more severe cases, other clinical manifestations may appear depending on the type of virus, such as, for example, meningitis or encephalitis, chronic arthralgia, hemorrhage, congenital malformations, and microcephaly, which can lead to death.⁶

During infections, host cells can undergo modifications due to virus replication and infection, many of which are related to changes in cell metabolism.⁷ One of the consequences of these changes induced by the virus in the metabolic pathways is the preference of infected cells to oxidize specific energetic substrates, such as, for example, the use of glucose for the replication of the virus, which can compromise cellular functions^{8,9}. In addition, viral infections can also interfere with mitochondrial bioenergetics through effects on cellular respiratory functions and oxidative pathways⁹. These interferences include the altered redox state, dysregulation of energy metabolism, and changes in the structure and functions of the main complexes of the respiratory chain and mitochondrial enzymes.^{10,11,12}

Mitochondria have several functions such as the detection of intracellular

homeostasis disorders and regulation and transduction of signaling responses, especially during stress conditions.¹³ These organelles are responsible for the production of ATP, through the oxidative phosphorylation process, which occurs in the internal mitochondrial membrane through the respiratory chain, using oxygen as a substrate for consumption.¹⁴ During the transport of electrons through mitochondria, the formation of reactive oxygen species (ROS) also occurs, which in excess, when the action of antioxidant systems overlaps, can cause tissue damage and cell apoptosis.¹⁵ To combat excessive ROS production, the cell has antioxidant defense mechanisms (enzymatic and non-enzymatic). The enzyme system is composed mainly of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase, and glutathione peroxidase (GPX), which have the function of reducing the levels of ROS, preventing oxidative stress.¹⁶

In arbovirus infections, these mitochondrial functions can be affected, as shown in a study carried out with the Venezuelan equine encephalitis virus in which structural changes, excess ROS production, decreased mitochondrial membrane electrical potential, and induction of fission of the organelle were observed.¹⁷ In addition, other studies have already shown that viruses in the family Flaviviridae, such as dengue,¹⁸ and West Nile virus¹⁹ induced increased ROS production and oxidative stress in infected cells. In addition to these, another study carried out with CHIKV, a virus of the Togaviridae family, showed that the virus induces a decrease in the mitochondrial membrane potential and an increase in MDA levels. Knowing this, the current review proposes to evaluate mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in in vitro arbovirus infection models.

1. Methodology

2.1. Search strategy

The search for articles was carried out in the following platforms: Medline / PubMed (Online System of Search and Analysis of Medical

Literature), SCOPUS, COCHRANE, Lilacs (Health Sciences of Latin America and the Caribbean), and Web of Science. The following descriptors and MeSH were used in the platforms: Arbovirus, Arboviruses, Arbovirus infections, Mitochondria, Oxidative stress and Reactive oxygen species. The following crossings were performed: “Arbovirus Infections AND Mitochondria”, “Arboviruses AND Mitochondria”, “Arbovirus AND Mitochondria”, “Arbovirus AND Oxidative Stress”, “Arboviruses AND Oxidative Stress”, “Arbovirus Infections AND Oxidative Stress”, “Oxygen-reactive Species AND Arbovirus”, “Oxygen-reactive Species AND Arboviruses”, “Oxygen-reactive Species AND Arbovirus Infections”. The search was carried out without restriction of publication period and language. The references cited by the articles were also reviewed to identify any possible additional publications. This review was submitted to the Open Science Framework with identification DOI 10.17605 / OSF.IO / 8ZF5W.

2.2 Eligibility criteria and exclusion criteria

After removal of duplicates, the full articles were analyzed when they met the following criteria: 1) Type of study, in vitro studies that did not carry out pharmacological intervention; 2) Studies that performed some analysis on mitochondrial bioenergetics and / or oxidative balance; 3) Studies that used an arbovirus for infection in cells; 4) Original studies.

Thus, the following were excluded from this research: Review articles, case reports, papers that did not address mitochondrial bioenergetics or oxidative balance, papers without comparison with control, and any other study that did not meet the eligibility criteria.

2.3 Methods for data extraction

Two reviewers independently extracted data from each included article. A pre-piloted and standardized form was used to extract data from the included studies to assess the quality and synthesis of evidence. The primary outcomes of the study were: oxidative

stress biomarkers, mitochondrial morphology, activity of antioxidant systems, and production of ROS. Secondary outcomes were: type of virus, concentration of virus for infection, viral incubation period, and relationship of regression of infection over time.

2.4 Quality assessment of included studies

In the absence of a consensus standard for evaluating the quality of in vitro studies, we used the modified ARRIVE tool, combined with the CONSORT guidelines (Consolidated standards for evaluation reports) for in vitro experiments, based on previous studies. The checklist contains 12 items to evaluate. For each item, a judgment related to the article was assigned, taking into account a pre-specified question. Next, Kappa statistics were used to assess interobserver agreement for items at risk of bias, using the software Statistical Package for the Social Sciences - SPSS versão 20 para Windows (IBM SPSS Software, Armonk, NY, EUA). The results were synthesized in the form of summary tables and a descriptive summary to enable their comparison.

2. Results

After searching the electronic databases, 1741 articles were found. After the evaluation of duplicates, 1206 articles were excluded and 535 were submitted to reading of the title and abstract. In total, 28 articles were read in full because they fit the eligibility criteria, of which 4 were excluded due to the exclusion criteria. All results were published in English. The details of this search are shown in the Figure 1.

3.1 Evaluation of the quality of studies

The results of the Kappa tests revealed an almost perfect agreement, $Kappa = 0.82$ for the items evaluated by the tool (table 1) by described Viera, Garrett, 2005. The biggest disagreements were found in the objective items, sample discrimination, and reporting of procedures to reduce bias.^{9,11,17,18,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34} Regarding the objectives, some articles did not make their objective clear, with a tendency when writing the articles to

observe the objectives implicit in the main results mentioned in the introduction. Regarding the discrimination of the samples, a failure was identified in the articles to detail the concentration of cells for the analyses, as well as the MOI (multiplicity of infection) of viruses that would be used for infection, which can represent a risk of bias when the analyses are associated with the evolution of the infection over a period of time. In addition, 13 of the 24 articles did not report any procedure to minimize possible bias in the study. Most of the articles presented a clear and adequate description of the results (n=17) and discussion (n=23) for the proposed study, indicating a good written and argumentative relationship between the results and discussion, as well as clearly stating the values (mean, error, and standard deviation) of the results obtained.

3.2 Cell characteristics and virus titration used in the studies

The cells used in the studies, for the most part, were of human origin. The results show that 79% of the studies with in vitro virus infection used cells of human origin and the other 21% used neuronal cells from mice and / or rats. The diversity of cells of human origin was associated with the type of virus and its preference for the cell type. The majority of the studies, especially those with Flavivirus, used blood cells for the experiments (dendritic cells, monocytes / macrophages, lymphomononuclear cells). Regarding the concentration of cells used for the experiments, the lowest concentration used was 10^3 cel / mL,¹⁷ but most articles used the concentration of cells 10^6 cel / mL.¹⁷

Regarding the virus titer, not all articles adequately defined the concentration used for the infection, but those which reported it presented an MOI variation from 0.1 to 10. The MOI value used in each experiment varied according to the cellular response to the virus infection, in general, an MOI of 2 or 5 was used in most articles. The studies were carried out with 5 families of pathogenic viruses in humans, covering the following families: *Rhabdoviridae* (n=1), *Flaviviridae* (n=13), *Togaviridae* (n=7), *Peribunyaviridae* (n=1), and

151 *Bunyaviridae* (n=2).

152 3.3 Arbovirus Infection and Mitochondrial Bioenergetics

153 The results of the studies show that arbovirus infections cause a series of
154 mitochondrial changes that arise as a result of viral action or metabolic alterations in cells.
155 To facilitate the understanding of the virus and mitochondria relationship, the results are
156 described according to the family of the virus studied (Table 2).

157 In relation to the family *Peribunyaviridae*, infection by the La Cross virus, showed
158 that in neurons there is an increase in the expression of the SARM1 binding protein and that
159 this protein has a strong relationship with mitochondrial damage. The neurons infected by
160 the virus showed mitochondria in a state of degeneration and increased production of EROS.
161 The increase in the production of EROS was also identified in infections by viruses of the
162 *Togaviridae* and *Flaviviridae* family.

163 With respect to the *Flaviviridae* family, in infected cells, the mitochondria in the host
164 undergo changes in the consumption of energy substrate, for example, in DENV infections,
165 mitochondria use palmitate and glucose as an energy substrate, whereas in non-infected cells
166 glutamine is the most commonly used substrate. In addition, studies show that DENV
167 infection increases the oxidation capacity of fatty acids. In another study,³⁵ showed that in
168 infected cells there is an increase in the mitochondrial respiration process, indicating greater
169 availability of ATP for the cell, which contributes to viral replication³⁵. Mitochondrial
170 morphology also changes during Flavivirus infections, as the results indicate that the
171 infection inhibits the expression of proteins associated with mitochondrial fusion and
172 induces an increase in DRP1 expression. The increase in DRP1 expression associated with
173 a decrease in MFN1 and MFN2 proteins induces a mitochondrial fission process. An
174 increase in mitochondria elongation was also seen in some regions of the cell, especially
175 near the convoluted membranes (CM), regions of intense viral replication during Flavivirus

infection.^{9,18,22,25,35}

Regarding the *Togaviridae* family, studies were found with MAYV, VEEV, CHIKV, and SINV viruses. Regarding MAYV, studies show that infected cells demonstrate an increase in the production of ROS after 6 hpi and that this production signals the immune system to produce TNF- α , indicating that there is a relationship between the immune response and the production of EROS. With respect to SINV, in intact cells, there is no change in O₂ consumption during 15hpi, but there is a reduction in the electron transport system (ETS); in permeabilized cells, however, there is a reduction, although not statistically significant, in the capacity of oxidative phosphorylation of cells when using substrates of Complex I or II, of the electron transport chain. Thus, the capacity of the ETS dependent on CI and CII was not significantly affected after 15 h of infection by SINV, contrasting with the results with intact cells, where a significant decrease in maximum uncoupled respiration was observed at this time. However, the data point to a decrease in the activity of the mitochondrial membrane potential of cells infected by CHIKV and VEEV. Along with this change there is an increase in DRP1, indicating an increase in mitochondrial fission, in addition to changes in infected mitochondria such as swelling, membrane compression, and aggregation of damaged mitochondria.^{17,21,28,30}

3.4 Oxidative balance and Arbovirus infection

Oxidative balance is extremely important for maintenance of cellular homeostasis. The results show several changes in the levels of oxidative stress biomarkers, and expression and/or antioxidant enzymes activity, in addition to changes in the cellular redox state. Changes were verified in the ROS production in more than 80% of the articles of this review. All the results described with respect to oxidative balance are shown in Table 3.

3.4.1 Antioxidant enzymes and oxidative stress biomarkers

In the *Bunyaviridae* family, the results show that in infections with Rift Valley Fever

Virus (RVFV), SOD activity decreases in infected cells, and when the SOD is blocked, apoptosis levels increase about seven times.¹¹. These results are similar to those of Banerjee and Mukhopadhyay (2018)³², who observed a decrease in SOD activity in Chikungunya virus (CHIKV) infections, but differ from those found in the *Flaviviridae* family, where Valero *et al.* (2013)²⁴, showed an increase in SOD activity in Dengue virus (DENV) infections. In the *Togaviridae* family, a study conducted with Mayaro virus (MAYV) showed an increase in SOD activity throughout the period of infection. In addition, in the *Bunyaviridae* family a negative regulation was observed between the SOD levels and ROS production.¹¹

Regarding catalase, no studies have evaluated its activity in the family *Bunyaviridae* and *Rhabdoviridae*. However, studies with the *Flaviviridae* and *Togaviridae* families show that Arbovirus infection results in increased catalase activity associated with the proportion of virus per cell.^{24,33}

The articles that assessed GSH levels were performed with viruses from the families *Flaviviridae* and *Togaviridae*. The results show that in DENV and MAYV infections, there is an increase in GSH levels, however, in cells infected with CHIKV there was a decrease in GSH, associated with an increase in the time of infection. The GSH/GSSG ratio was performed in only one article, in which a decrease in the cell REDOX status between 15 to 24 hpi was observed in MAYV infections.^{24,33}

Some articles also evaluated MDA levels in infected cells. For Flavivirus infections, Cherupanakkal *et al* (2018)²⁷ showed that in lymphomonuclear cells, DENV infection did not cause changes in MDA levels, however when related to cell apoptosis there was a significant difference between the infected group and the control group. In contrast, Valero *et al* (2013) showed that monocytes infected by DENV show increased MDA levels²⁴. These discrepancies may be associated with the methodology used to infect the cells depending on

the strain type. Regarding the *Togaviridae* family, Banerjee and Mukhopadhyay (2018) showed that in infections by the Chikungunya virus, lymphomonuclear cells of patients with or without polyarthralgia have high levels of MDA and high levels of the MDA/SOD ratio, indicating a possible situation of oxidative stress in these cells.³²

3.4.2 ROS and NO production

The ROS production was evaluated in most studies, thus, the ROS levels of all virus families in this review were quantified. Only one article did not show an increase in intracellular ROS levels; in that article the neutrophils infected by DENV with an MOI of 10 did not demonstrate an increase in the ROS production. In addition, the author concluded that the production and neutrophil activity are not associated with ROS.²³

In the *Bunyaviridae* family, there was an increase in the ROS production in liver cells infected by RVFV, associated with the presence of non-structural viral proteins and a decrease in SOD levels, where the author reports that there is down-regulation between the decrease in SOD levels and increase in ROS.¹¹ In the family *Flaviviridae*, the ROS increase was found in infections by DENV and JEV, in several cell types. In addition, astrocytes isolated from rats and infected by JEV showed a relationship between the increase in ROS and the expression of metalloproteinase-9 (mmp-9).^{24,26,27,36,37,38} Studies with Flavivirus have shown that an increase in ROS occurs between 18 to 48 hpi. The *Togaviridae* and *Rhabdoviridae* families also demonstrated increases in ROS in infections by VEEV, CHIKV, SINV, and CHPV.^{29,31}

Regarding NO production, two studies carried out experiments to quantify NO production. In the first study performed with DENV, it was observed that in infections by the 4 dengue serotypes there is an increase in NO production, however the highest production was found in DENV-2. In addition, the NO increase was associated with an increase in MDA.²⁴ The other study was carried out with CHPV, in which Verma *et al.* (2016) showed

that at 16hpi there is an increase in NO production associated with ROS production in BV-2 cells²⁹. In addition, when the neuronal apoptosis index was evaluated, an increase in the cell death of the infected group was evidenced, indicating that NO and ROS production may be associated with apoptosis of infected cells.

Discussion

Viral infections have already been associated with imbalances in the oxidative metabolism of infected people, however, to date, no review has been carried out to identify how arbovirus infections act on REDOX status and mitochondrial activity in *in vitro* models. Therefore, the current study aimed to evaluate how arbovirus infections affect oxidative balance and mitochondrial bioenergetics in *in vitro* study models. Thus, analyzing the effects that infections cause in *in vitro* models, can serve as a basis for understanding the pathological mechanisms caused by arboviruses and directing pharmacological or non-pharmacological treatments to act more effectively in minimizing cell damage caused by infections.

4.1 Cell response to arbovirus infection

In general, all articles indicate an increase in the production of reactive oxygen species as a result of infection. The increase in the production of ROS was also associated with an increase in proteins such as sterile Protein α and TIR containing protein 1 (SARM1) as well as which, changes in the energy substrate were also identified, as a result of the process of infection and viral replication. The change in the energy substrate associated with an increase in the breathing process, and an increase in the MMP, indicate greater availability of ATP for the virus, which may indicate a viral stimulus to obtain energy through changes in cellular homeostasis. This became more evident when it was identified that the morphofunctional changes in the mitochondria occurred close to the CM, an area where viral replication is intense.^{20,31}

Regarding the changes in mitochondrial morphodynamics, of the 24 selected articles, only 4 performed analyses related to mitochondrial dynamics, in which, in the consequences, it was identified that arbovirus infections increase the expression of Drp1, indicating a process of fission of mitochondria. In addition, two of the studies showed that the expression of MFN1 and MFN2 decreased with viral infection. In relation to the total number of articles found in the research, few assess the mitochondrial dynamics in infections; of the 24 articles, only 8% show analyses on the mitochondrial dynamics.^{22,35}

The mitochondrial elongation was quite expressive in the mitochondria, however, this was not the only change in morphology found; since the articles show that there are partially swollen mitochondria, and inner membrane compaction and mitochondria agglomeration. Therefore, mitochondria respond to viral infections by increasing their respiratory activity and generating morphofunctional changes, however, it was not clear in the studies whether these responses decrease the infectious process or if, due to the increase in the availability of ATP, they facilitate the viral replication process, or even if there were harmful changes to the cell, especially as a result of the increase in ROS.

Therefore, the increase in total cell ROS was evaluated by some studies, followed by analyses of some biomarkers of oxidative stress. One study stated that there was no increase in the production of reactive species in neutrophils infected by DENV. This result implies that there is no relationship between the increase in ROS and infection of neutrophils by the dengue virus. However, other studies show a relationship between the increase in ROS as a signal for an immune response. The study by Qi Y et al (2015), showed that in infections by DENV, the increase in ROS is associated with the production of IFN-6 and that this affects the cell's MMP.³⁸ In addition, another study by Narayanan et al (2011) showed that there is a negative relationship between ROS, SOD, and the increase in TNF- α ¹¹. Thus, although ROS does not stimulate the production of neutrophils, it is associated with the activation of

some mechanisms related to the immune system, indicating that it may be one of the triggers for the activation of the immune response against viral infection. Regarding biomarkers and enzymes, viral infection induces an increase in the activity of SOD and CAT enzymes. In the studies in which SOD levels were reduced, there was an increase in MDA associated with an increase in apoptosis of infected cells. In addition, the levels of GSH and the GSH / GSSG ratio were also reduced in viral infections. In short, the reduction in the activity of the antioxidant defense system is associated with an increase in the MDA biomarker, indicating a possible framework of oxidative stress during infection. In addition, MDA levels were also associated with increased NO in infected cells and increased apoptosis.

4.1 Study information

The availability of articles that evaluated the damage to mitochondria and the oxidative balance of infected cells is quite scarce when taking into account the diversity of pathogenic arboviruses that affect humans. Most studies are related to Flavivirus or Togavirus, such as Dengue and Chikungunya; this result may be associated with the importance that these viruses have for public health, principally in this century (Who, 2019). However, some arboviruses that were also of great importance in this century were not the subject of in vitro studies and research that met the eligibility criteria of this work, for example, none of the studies available with the Zika virus were found in the search.

In the majority of the studies, the cell infection process is not very detailed and, in some articles, important parameters such as infection time, virus MOI, cell concentration, and culture medium details were not identified. These results can serve as a bias for comparing the work, where the evolution of the infectious process may be associated with the concentration of virus used.

In addition, another limitation of the studies was the use of the term “oxidative stress” in studies that evaluated, solely, the production of reactive species or a single biomarker of

326 oxidative stress, therefore, few methodological analyses were performed to indicate that the
327 cells really were experiencing oxidative stress.

328 1. CONCLUSION

329 The results of this review indicate that in in vitro arbovirus infection models changes
330 in the mitochondrial bioenergetics can help the virus in the replication process, however,
331 cellular changes resulting from the exaggerated increase in reactive species cause an
332 imbalance in the cell REDOX state which can lead to oxidative stress and cell death signaling

REFERENCES

1. Powers AM. Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. *Clin Microbiol Rev.* 2017 Dec 13;31(1):e00104-16. doi: 10.1128/CMR.00104-16. PMID: 29237708; PMCID: PMC5740971.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) A global brief on vector-borne diseases. 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/111008/1/WHO_DCO_WHD_2014.1_eng.pdf
3. Lopes Nayara, Nozawa Carlos, Linhares Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* [Internet]. 2014 Set [citado 2021 Jan 28] ; 5(3): 55-64. Disponível em: http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=pt
4. Leta S, Beyene TJ, De Clercq EM, Amenu K, Kraemer MUG, Revie CW. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis.* 2018 Feb;67:25-35. doi: 10.1016/j.ijid.2017.11.026. Epub 2017 Nov 28. PMID: 29196275; PMCID: PMC5976855.
5. Azeredo EL, Dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, Nunes PCG, de-Oliveira-Pinto LM, de Filippis AM, Dal Fabbro M, Hoscher Romanholi I, Venancio da Cunha R. Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil. *PLoS Curr.* 2018 Feb 15;10:ecurrents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5. doi: 10.1371/currents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5. PMID: 29588874; PMCID: PMC5843488..
6. Beckham JD, Tyler KL. Arbovirus Infections. *Continuum (Minneapolis Minn).* 2015 Dec;21(6 Neuroinfectious Disease):1599-611. doi: 10.1212/CON.0000000000000240. PMID: 26633778; PMCID: PMC5089063.
7. Maynard ND, Gutschow MV, Birch EW, Covert MW. The virus as metabolic engineer. *Biotechnol J.* 2010 Jul;5(7):686-94. doi: 10.1002/biot.201000080. PMID: 20665642; PMCID: PMC3004434.
8. Fontaine KA, Sanchez EL, Camarda R, Lagunoff M. Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication. *J Virol.* 2015 Feb;89(4):2358-66. doi: 10.1128/JVI.02309-14. Epub 2014 Dec 10. PMID: 25505078; PMCID: PMC4338897.
9. Fernandes-Siqueira LO, Zeidler JD, Sousa BG, Ferreira T, Da Poian AT. Anaplerotic Role of Glucose in the Oxidation of Endogenous Fatty Acids during Dengue Virus Infection. *mSphere.* 2018 Jan 31;3(1):e00458-17. doi: 10.1128/mSphere.00458-17. PMID: 29404419; PMCID: PMC5793041.
10. Kim SJ, Syed GH, Khan M, Chiu WW, Sohail MA, Gish RG, Siddiqui A. Hepatitis C virus triggers mitochondrial fission and attenuates apoptosis to promote viral persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Apr 29;111(17):6413-8. doi: 10.1073/pnas.1321114111. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24733894; PMCID: PMC4035934.
11. Narayanan A, Popova T, Turell M, Kidd J, Chertow J, Popov SG, Bailey C, Kashanchi F,

- Kehn-Hall K. Alteration in superoxide dismutase 1 causes oxidative stress and p38 MAPK activation following RVFV infection. *PLoS One*. 2011;6(5):e20354. doi: 10.1371/journal.pone.0020354. Epub 2011 May 31. PMID: 21655261; PMCID: PMC3105056.
12. Terasaki K, Won S, Makino S. The C-terminal region of Rift Valley fever virus NSm protein targets the protein to the mitochondrial outer membrane and exerts antiapoptotic function. *J Virol*. 2013 Jan;87(1):676-82. doi: 10.1128/JVI.02192-12. Epub 2012 Oct 24. PMID: 23097454; PMCID: PMC3536385.
13. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci*. 2012 Feb 15;125(Pt 4):807-15. doi: 10.1242/jcs.099234. PMID: 22448037; PMCID: PMC3311926.
14. Sheeran FL, Pepe S. Mitochondrial Bioenergetics and Dysfunction in Failing Heart. *Adv Exp Med Biol*. 2017;982:65-80. doi: 10.1007/978-3-319-55330-6_4. PMID: 28551782.
15. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763. doi: 10.1155/2017/8416763. Epub 2017 Jul 27. PMID: 28819546; PMCID: PMC5551541.
16. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012 Jan;5(1):9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613. Epub 2012 Jan 13. PMID: 23268465; PMCID: PMC3488923.
17. Keck F, Brooks-Faulconer T, Lark T, Ravishankar P, Bailey C, Salvador-Morales C, Narayanan A. Altered mitochondrial dynamics as a consequence of Venezuelan Equine encephalitis virus infection. *Virulence*. 2017 Nov 17;8(8):1849-1866. doi: 10.1080/21505594.2016.1276690. Epub 2017 Jan 25. PMID: 28075229; PMCID: PMC5810500.
18. Olganier D, Peri S, Steel C, van Montfoort N, Chiang C, Beljanski V, Slifker M, He Z, Nichols CN, Lin R, Balachandran S, Hiscott J. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells. *PLoS Pathog*. 2014 Dec 18;10(12):e1004566. doi: 10.1371/journal.ppat.1004566. PMID: 25521078; PMCID: PMC4270780.
19. Gullberg RC, Jordan Steel J, Moon SL, Soltani E, Geiss BJ. Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology*. 2015 Jan 15;475:219-29. doi: 10.1016/j.virol.2014.10.037. Epub 2014 Dec 13. PMID: 25514423; PMCID: PMC4332586.
20. Mukherjee P, Woods TA, Moore RA, Peterson KE. Activation of the innate signaling molecule MAVS by bunyavirus infection upregulates the adaptor protein SARM1, leading to neuronal death. *Immunity*. 2013 Apr 18;38(4):705-16. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.013. Epub 2013 Mar 14. PMID: 23499490; PMCID: PMC4783152.
21. Dhanwani R, Khan M, Bhaskar AS, Singh R, Patro IK, Rao PV, Parida MM. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: role of apoptosis in neuronal cell death. *Virus Res*. 2012 Feb;163(2):563-72. doi: 10.1016/j.virusres.2011.12.009. Epub 2011 Dec 21. PMID: 22210004.
22. Yu CY, Liang JJ, Li JK, Lee YL, Chang BL, Su CI, Huang WJ, Lai MM, Lin YL. Dengue

Virus Impairs Mitochondrial Fusion by Cleaving Mitofusins. *PLoS Pathog.* 2015 Dec 30;11(12):e1005350. doi: 10.1371/journal.ppat.1005350. PMID: 26717518; PMCID: PMC4696832.

23. Moreno-Altamirano MM, Rodríguez-Espinosa O, Rojas-Espinosa O, Pliego-Rivero B, Sánchez-García FJ. Dengue Virus Serotype-2 Interferes with the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *Intervirology.* 2015;58(4):250-9. doi: 10.1159/000440723. Epub 2015 Oct 24. PMID: 26496355.

24. Valero N, Mosquera J, Añez G, Levy A, Marcucci R, de Mon MA. Differential oxidative stress induced by dengue virus in monocytes from human neonates, adult and elderly individuals. *PLoS One.* 2013 Sep 17;8(9):e73221. doi: 10.1371/journal.pone.0073221. PMID: 24069178; PMCID: PMC3775775.

25. Lai JH, Wang MY, Huang CY, Wu CH, Hung LF, Yang CY, Ke PY, Luo SF, Liu SJ, Ho LJ. Infection with the dengue RNA virus activates TLR9 signaling in human dendritic cells. *EMBO Rep.* 2018 Aug;19(8):e46182. doi: 10.15252/embr.201846182. Epub 2018 Jun 7. PMID: 29880709; PMCID: PMC6073071.

26. Tung WH, Tsai HW, Lee IT, Hsieh HL, Chen WJ, Chen YL, Yang CM. Japanese encephalitis virus induces matrix metalloproteinase-9 in rat brain astrocytes via NF- κ B signalling dependent on MAPKs and reactive oxygen species. *Br J Pharmacol.* 2010 Dec;161(7):1566-83. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00982.x. PMID: 20698853; PMCID: PMC3010568.

27. Cherupanakkal C, Samadanam DM, Muthuraman KR, Ramesh S, Venkatesan A, Balakrishna Pillai AK, Rajendiran S. Lipid peroxidation, DNA damage, and apoptosis in dengue fever. *IUBMB Life.* 2018 Nov;70(11):1133-1143. doi: 10.1002/iub.1925. Epub 2018 Aug 18. PMID: 30120880.

28. Cavaleiro Mariana G., Costa Leandro Silva, Campos Holmes S., Alves Letícia S., Assunção-Miranda Iranaia, Poian Andrea T. Macrophages as target cells for Mayaro virus infection: involvement of reactive oxygen species in the inflammatory response during virus replication. *An. Acad. Bras. Ciênc.* [Internet]. 2016 Sep [cited 2021 Jan 28]; 88(3): 1485-1499. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652016000401485&lng=en. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150685>.

29. Verma AK, Ghosh S, Pradhan S, Basu A. Microglial activation induces neuronal death in Chandipura virus infection. *Sci Rep.* 2016 Mar 2;6:22544. doi: 10.1038/srep22544. PMID: 26931456; PMCID: PMC4773833.

30. Silva da Costa L, Pereira da Silva AP, Da Poian AT, El-Bacha T. Mitochondrial bioenergetic alterations in mouse neuroblastoma cells infected with Sindbis virus: implications to viral replication and neuronal death. *PLoS One.* 2012;7(4):e33871. doi: 10.1371/journal.pone.0033871. Epub 2012 Apr 2. PMID: 22485151; PMCID: PMC3317446.

31. Keck F, Khan D, Roberts B, Agrawal N, Bhalla N, Narayanan A. Mitochondrial-Directed Antioxidant Reduces Microglial-Induced Inflammation in Murine In Vitro Model of TC-83 Infection. *Viruses.* 2018 Nov 2;10(11):606. doi: 10.3390/v10110606. PMID: 30400156; PMCID: PMC6266753.

32. Banerjee N, Mukhopadhyay S. Oxidative damage markers and inflammatory cytokines are

altered in patients suffering with post-chikungunya persisting polyarthralgia. *Free Radic Res.* 2018 Aug;52(8):887-895. doi: 10.1080/10715762.2018.1489131. Epub 2018 Jul 23. PMID: 29898618.

33. Camini FC, da Silva Caetano CC, Almeida LT, da Costa Guerra JF, de Mello Silva B, de Queiroz Silva S, de Magalhães JC, de Brito Magalhães CL. Oxidative stress in Mayaro virus infection. *Virus Res.* 2017 May 15;236:1-8. doi: 10.1016/j.virusres.2017.04.017. Epub 2017 Apr 25. PMID: 28455127.

34. Narayanan A, Amaya M, Voss K, Chung M, Benedict A, Sampey G, Kehn-Hall K, Luchini A, Liotta L, Bailey C, Kumar A, Bavari S, Hakami RM, Kashanchi F. Reactive oxygen species activate NF κ B (p65) and p53 and induce apoptosis in RVFV infected liver cells. *Virology.* 2014 Jan 20;449:270-86. doi: 10.1016/j.virol.2013.11.023. Epub 2013 Dec 15. PMID: 24418562.

35. Chatel-Chaix L, Cortese M, Romero-Brey I, Bender S, Neufeldt CJ, Fischl W, Scaturro P, Schieber N, Schwab Y, Fischer B, Ruggieri A, Bartenschlager R. Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe.* 2016 Sep 14;20(3):342-356. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.008. Epub 2016 Aug 18. PMID: 27545046; PMCID: PMC7105029.

36. Yang TC, Lai CC, Shiu SL, Chuang PH, Tzou BC, Lin YY, Tsai FJ, Lin CW. Japanese encephalitis virus down-regulates thioredoxin and induces ROS-mediated ASK1-ERK/p38 MAPK activation in human promonocyte cells. *Microbes Infect.* 2010 Aug;12(8-9):643-51. doi: 10.1016/j.micinf.2010.04.007. Epub 2010 Apr 27. PMID: 20430109.

37. Datan E, Roy SG, Germain G, Zali N, McLean JE, Golshan G, Harbajan S, Lockshin RA, Zakeri Z. Dengue-induced autophagy, virus replication and protection from cell death require ER stress (PERK) pathway activation. *Cell Death Dis.* 2016 Mar 3;7(3):e2127. doi: 10.1038/cddis.2015.409. PMID: 26938301; PMCID: PMC4823927.

38. Qi Y, Li Y, Zhang Y, Zhang L, Wang Z, Zhang X, Gui L, Huang J. IFI6 Inhibits Apoptosis via Mitochondrial-Dependent Pathway in Dengue Virus 2 Infected Vascular Endothelial Cells. *PLoS One.* 2015 Aug 5;10(8):e0132743. doi: 10.1371/journal.pone.0132743. Erratum in: *PLoS One.* 2015;10(9):e0138896. PMID: 26244642; PMCID: PMC4526556.

ACKNOWLEDGMENT/ FINANCING SOURCE

The authors are grateful to Coordination for the improvement of Higher Education Personnel (CAPES), which provided scholarships for the students and Foundation to support Science and Research from Pernambuco state (FACEPE grant: APQ-0746-2.11/17 - PPSUS 2017 - 10/2017), Brazil.

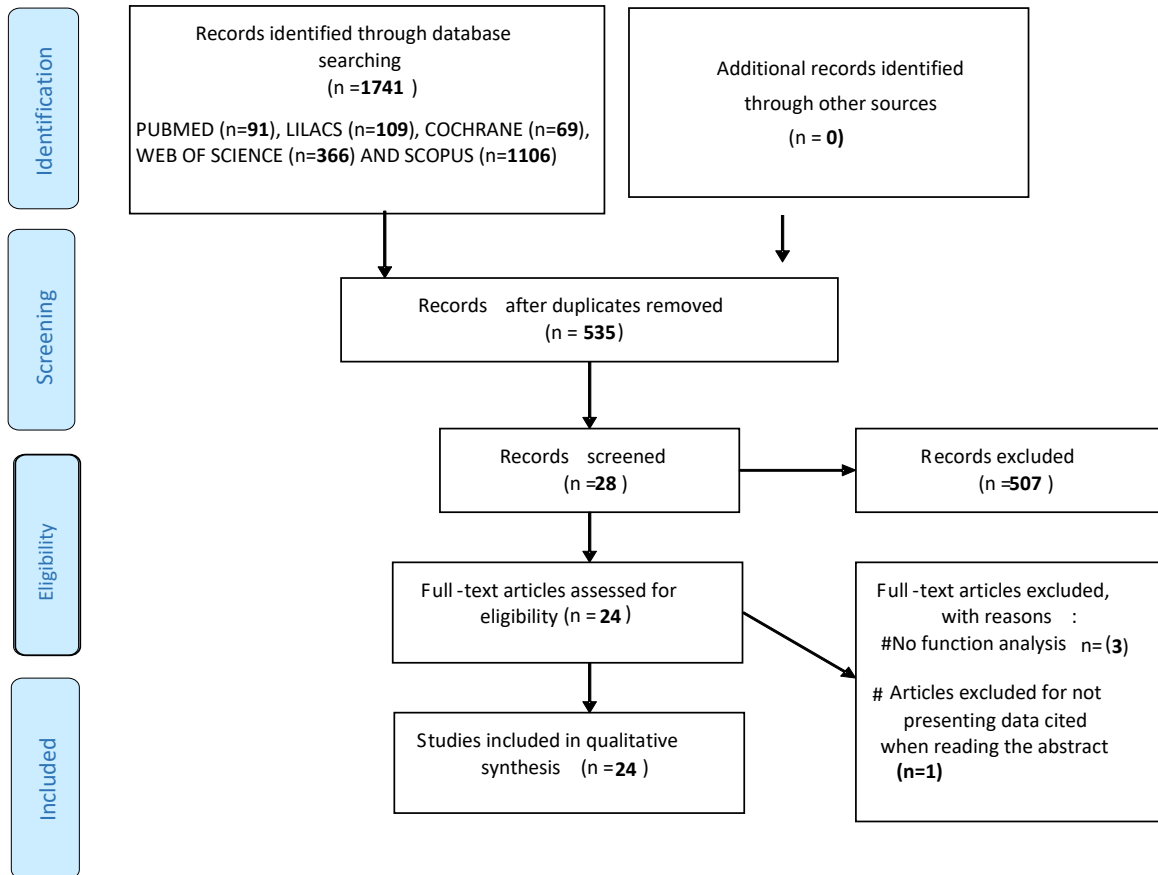
CONFLICT OF INTERESTS

All authors declare for due purpose that there are no conflicts of interest in the construction and publication of the manuscript, including both financial and personal interests.

ETHICAL APPROVAL

As it is a systematic review article, it was not necessary to authorize an ethics committee to perform the work.

Figure 1. Flowchart of the study selection process. The selection of studies took place in four phases:



1) Identification: potential studies were collected from databases; 2) Screening: screening of the studies was carried out based on the reading of the titles and abstracts, according to the PICO scale; 3) Eligibility: studies were accepted according to the eligibility criteria for complete reading of the articles; 4) Articles selected after complete reading for data extraction and qualitative analysis.

Table 2 Results related to mitochondrial bioenergetics.					
Author	Family of vírus	Type Vírus/MOI	Cell/Concentration	Objective	Results
Mukherj, <i>et al</i> (2013)	<i>Peribunyaviridae</i>	La Cross vírus (LACV)/0.01; 0.1 and 1	Primary Neuro/8.10 ⁵ cel/ml	To assess the relationship of SARM1 in neuronal apoptosis that is caused by LACV infections .	• SARM1 protein is associated with mitochondrial damage; • Infected cells showed an increase in the expression of SARM1 binding proteins with the mitochondria. • Neurons containing swollen and / or damaged mitochondria in cell bodies and axons from cultures infected with LACV; • Blocking the mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS), showed an inhibition of SARM1 activity and EROS production. • There is no blockage of MAVS when there is an increase in the production of EROS; • SARM1 interacts with MAVS and induces oxidative stress, mitochondrial damage, and neuronal death.
Fernandes-siqueira et	<i>Flaviviridae</i> .	Dengue vírus (DENV) / MOI of	Huh7 cells, a strain of human	Using high-resolution	• Infection of cells by DENV inhibits mitochondrial breathing;

al (2018)		1	hepatocarcinoma / The cells were seeded in 60 cm plastic Petri dishes, at a density of 10^5 cel / mL, but in experiments such as oxygen consumption, concentrations of 10^6 cel / mL were used	respirometry to assess metabolic circuits that occur during DENV infection	• Infected Huh7 cells effectively use palmitate as an oxidative substrate, since oxygen consumption in the presence of palmitate was higher than that observed in the control; • Glutamine was the best substrate used by control cells in all conditions, however, DENV infection strongly inhibited the use of this nutrient as an energy substrate for cells; • The presence of glucose in the control cells inhibited consumption, but these effects were attenuated in cells infected by DENV, confirming that the use of glucose by these cells increases the oxidation capacity of endogenous fatty acids.
Olagnier et al (2014)	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV)/ not described	Dendritic cells derived from primary human monocytes (Mo-DC) / 10^6 cel/mL	To conduct an in-depth analysis of the transcriptome, along with biochemical and functional analyses of the early host response to DENV infection in Mo-DC	• The number of mitoSOX positive cells increased from $31.9 \pm 12.3\%$ (uninfected) to $56.8 \pm 7.9\%$ (infected) after 48 hours of infection; • Both the mitochondrial release of ROS and mitochondrial depolarization were associated with the induction of apoptosis, through the mitochondria-dependent pathway in Mo-DC cells infected with DENV.
Yu CY et al (2015)	<i>Flaviviridae</i>	DENV/ MOI of 10	Cells A549 / mitoYFP and A549 / mitoCherry	To evaluate, in DENV infections, how	• In simulation-infected cells, continuous mitochondrial fusion / fission led to uniform redistribution and colocalization of mitoYFP and

				the mitochondrial dynamics behave	mitoCherry (mitochondrial markers) in fused cells, while much less colocalization of mitoYFP and mitoCherry was observed in DENV infected cells within 24 days after infections, but without significant cytotoxicity. • The levels of proteins related to fission, Drp1, pDrp1, optic atrophy 1 (OPA1) and mitochondrial fission 1 (Fis1) were similar during the course of infection, while MFN1 and MFN2 proteins were reduced in infected cells; • In cells that had induction of MFN1 overexpression, the proportion of cells with clustered mitochondria decreased from 86.2% to 37.1% when compared to cells simulated to those infected with DENV; • It has been suggested that DENV can block MFN1-mediated mitochondrial fusion.
Barbier et al (2017)	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV) / Not described	Vero cells, reporter cells (Huh7.5), and human liver cancer cells (HepG2) / Not described	To evaluate the relationship of Drp1 with mitochondrial length and respiration during DENV infection.	• Using images of live cells from cultures infected with DENV, it was seen that the infection induces mitochondrial elongation; • The mitochondria of cells infected with DENV showed increased respiration, which can lead to an increase in ATP production, when compared to uninfected cells; • Viral proteins, such as NS4b, were preferentially located in subcellular fractions of mitochondria; • The characterization of fusion and fission proteins revealed a decrease in Drp1 in mitochondria in the Huh7 cell line and in monocyte-derived dendritic

					cells (DCs); • The decrease in Drp1 was correlated with a reduction in the phosphorylation of Drp1 in S616 in the Huh7 cell line. On the other hand, the induction of mitochondrial fission or overexpression of Drp1 and Drp1 S616D of wild type (WT) inhibited DENV replication.
Chatel-Chaix. <i>et al.</i> , 2016	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV) / Not described	Huh7 cells / 1.10^5 cel/mL	To evaluate the function of NS4B protein during DENV infection	• Mitochondria were elongated and often in physical contact with punctuated structures that contained NS3 and NS4B; • In cells infected with DENV, the elongation of the mitochondria became visible for the first time 23 hours after infection (hpi) and remained between 35 and 50 hpi; • The development of infection in the mitochondrial network collapsed, concomitantly with cell death due to cytopathic effects induced by DENV; • Elongation of the mitochondria has been observed in cells infected with DENV2; • The greatest mitochondrial elongation was found close to the convoluted membranes (CM) of the infected cells, which are sites of greater viral replication; • A large spatio-temporal relationship was detected between the increase in CM and mitochondrial elongation, where cells with CMs were detectable at 21 hours after infection and accumulated over time, and 86% of cells with CMs showed a network of elongated mitochondria. In

					approximately 36% of infected cells, it was seen that the formation of CMs and the elongation of mitochondria occurred simultaneously; • The decrease in the expression of DRP1 stimulated the mitochondria elongation, while the reduced expression of MFN2 favored its fragmentation, without affecting cell viability during a 5-day observation period; • The elongation mediated by the decrease in DRP1 stimulated the replication of both strains of DENV (DVs and NGC), while the fragmentation of mitochondria forced by the decrease in MFN2 inhibited DENV replication, suggesting a relationship of viral replication capacity and expression of mitochondrial dynamics proteins.
Lai et al (2018)	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV) / MOI of 5	Dendritic cells (DC) and Human lung epithelium cell (A549) / DC: 10^6 cel / mL and A549: $2,5 \times 10^5$ cel/mL	To evaluate the role of the TLR9 gene (specific mitochondrial DNA receptor) in DENV infection	• The total number of cell mtDNA copies decreased slightly after DENV infection within 24 hours; • There was a significant and proportional increase in cytosolic mtDNA 12 and 24 hours after DENV infection; • DENV-induced TLR9 activation and mtDNA release were also demonstrated when DCs were infected with different DENV serotypes (serotypes 1, 3, and 4), as well as different DENV2 strains; • DENV infection induced an increase in ROS in DCs, evidenced by increased staining with MitoSOX. These effects were inhibited by

					MitoTEMPO, a mimetic of superoxide dismutase directed at mitochondria, which has properties for eliminating superoxide and alkyl radicals; • Treatment with MitoTEMPO reduced the total oxidized DNA and, specifically, the levels of cytosolic oxidized DNA; • MitoTEMPO inhibited the release of mtDNA induced by DENV in the cytosol and expression of TLR9; • EROS production induces the release of mtDNA that activates TLR9 expression.
Cavaleiro et al (2016)	<i>Togaviridae</i>	Mayaro vírus (MAYV)/ MOI of 1 to 5	Macrophages/ 10^6 cel/mL	To investigate MAYV's ability to replicate in macrophages and to induce inflammatory responses and cell death	• MAYV induces a progressive increase in the generation of ROS in the early stages of infection (6 h), with intense viral replication before the peak of TNF production and cell death. • Investigation of the role of ROS in the production of virus-induced TNF showed a reduction in the release of TNF by infected cells to baseline levels, indicating an involvement of ROS signaling in the release of inflammatory cytokines by macrophages during MAYV infection.
Silva da Costa et al (2012)	<i>Togaviridae</i>	Sindbis vírus (SINV) / MOI of 1 to 5	Mouse neuroblastoma (Neuro 2a) / 10^6 cel/mL	To characterize morphologically and biochemically, and evaluate mitochondrial bioenergetics and energy	• The routine breathing of Neuro 2a cells (in culture medium containing 5 mM glucose) did not differ between infected and simulation; • The rate of oxygen consumption in the presence of oligomycin in cells with simulated infection was 31.1 and that of cells infected with SinV was 26.6 pmoles. There was a statistical tendency for leakage breathing to decrease after 15 h of SinV

				homeostasis in SINV infections	infection; • The capacity of the electron transport system (ETS) was reduced by 36% in Neuro 2a cells after 15 h of infection by SinV, while the average rates in the infected simulations and SINV-infected Neuro 2a cells were 139.6 and 102.7 pmoles; • After 24 h the infected cells cleared, so that the same fraction of ETS was activated to conduct ATP synthesis; • Regarding permeabilized cells, after 15 h of infection, there was a reduction, although not statistically significant, of the oxidative phosphorylation capacity of Neuro 2a cells supported by Complex I (CI: pyruvate / malate) or Complex II (CII) substrates: succinate). • The maximum uncoupled breath measured after adding the FCCP did not differ in infected and infected cells by simulation. Therefore, the capacity of the ETS depending on CI and CII was not significantly affected after 15 h of infection by SinV, contrasting with the results of intact cells, where a significant decrease in maximum uncoupled respiration was observed at this time.
Keck f et al (2018)	<i>Togaviridae</i>	Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV) / MOI of 2 to 10	Human astrocytoma cells (U-87 MG), VERO cells, and murine microglial cells (BV2) / U-87MG and BV2	To determine whether murine microglia is susceptible to VEEV infection and	• Treatment with BAY-82 and MitoQ not only recovered the electrical potential of the mitochondrial membrane (MMP) in the infected cells, but also increased this electrical potential in the treated samples compared to the uninfected simulated control.

				whether the infection results in mitochondrial dysfunction	In their most effective form, BAY-82 and MitoQ increased the membrane potential by 29% and 48%. The antioxidant directed at mitochondria is more effective in restoring mitochondrial function than the anti-inflammatory BAY-82.
Dhanwani R et al (2012)	<i>Togaviridae</i>	Chikungunya virus (CHIKV) / MOI of 0.1 to 5	Human neuroblastoma (SH-SY5Y) / 1.10^6 cel/mL	To evaluate the role of apoptosis and oxidative damage in SH-SY5Y cells infected with CHIKV	- The results indicated a significant change in the electrical potential of the mitochondrial membrane (MMP). - JC-1 staining of infected cells revealed a change in fluorescence from red to green, consistent with a decrease in mitochondrial membrane potential
Keck, f et al (2017)	<i>Togaviridae</i>	Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV) / MOI of 2 to 10	Human astrocytoma cells (U87MG cells) and African green monkey kidney cells (Veros) / Concentration varied according to the average tests used/ 10^3 cel/mL	To assess the role of mitochondrial dynamics in VEEV infections	- TC-83 infection resulted in a decrease in membrane potential at all times tested, with significant reductions of 6 hpi in the highest MOIs (10 and 20) and in all MOIs tested at 24 hpi when compared to the respective controls simulated. - The infected group showed an increase in the expression of the Drp1 protein from 24 dpi in MOI of 5 to 10, while in MOI of 20 there was a drop in levels. - Infected cells showed a series of changes in structure, including partially swollen mitochondria, inner membrane compaction, and assembled mitochondria.
Abbreviations: Moi (multiplicity of infection); dpi (days after infection); hpi (hours after infection)					

Table 3. Oxidative balance in arbovirus infections					
Author	Family of virus	Type Virus/MOI	Cell/Concentration	Objective	Results
Narayanan <i>et al.</i> , 2011	<i>Bunyaviridae</i>	Rift Valley Fever Virus (RVFV) / The viruses of the MP12 strain were infected at an MOI of 3, while the viruses of the ZH501 strain at an MOI of 2	Lung epithelial cells of small human airways (HSAECs)/ 1.10^6 cell/mL	To determine if RVFV infection caused oxidative stress in infected human cells and if there were host responses associated with this condition of cellular stress and production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α)	• The infected cells showed a consistent decrease in expression of superoxide dismutase 1 (SOD1) from the initial moments (24 and 30 h); • There was an increase in the ROS production in infected cells related to the negative regulation of cytosolic SOD; • The increase in the production of superoxides was visible from 12dpi and 24dpi; • Control cells treated with TNF-α showed lower levels of SOD1 compared to untreated cells, in a 24-hour period; • After depletion of SOD1, the percentage of cells undergoing apoptosis was almost seven times higher than the control cells; • SOD1-depleted cells that were not infected by the virus had significantly less apoptosis (1.5 times greater than control cells; data not shown); • The results indicate that SOD1 depletion makes the cells more susceptible to apoptosis during MP12 infection;

					• Activation of the AMPK pathway was necessary to combat the damage caused by changes in the SOD1 concentration; • Cells infected with the ZH501 strain of RVHV were subjected to the same experiments and demonstrated similar results, but the MOI used was lower than that of the MP12 strain due to its pathogenicity.
Narayanan et al (2014)	<i>Bunyaviridae</i>	Rift Valley Fever Virus (RVFV) / MOI of 3.5 or 10	Liver stellate cell line (CFSC-8B) / 1.10^6 cell/mL	To investigate whether oxidative stress occurs and whether it leads to apoptotic responses in patients infected with RVFV	• Quantification of fluorescence revealed an approximate 6-fold increase in superoxide levels in virus-infected cells over controls infected by simulation; • The presence of the viral protein NSs in the mitochondria of infected cells contributes to the early increase of ROS; • ROS increased levels correlated with the activation of nuclear factor-κB (NFκB), p65 and p53 responses, which together with the infection were also reflected as macromolecular rearrangements; • ROS act as critical contributors to liver cell apoptosis during RVFV infection.
Moreno-Altamirano et	<i>Flaviviridae</i>	Dengue Virus (DENV) / MOI of	Neutrophils / 10^6 cell/mL	To assess whether Nets (extracellular	• There was no change in the ROS production in DENV infections, thus, the production

al (2015)		10		neutrophil traps) are released by DENV2-infected neutrophils	and activity of neutrophils is not associated with ROS production;
Yang T et al (2010)	<i>Flaviviridae</i>	Japanese encephalitis virus (JEV)/MOI 0.1 to 1	Human lung epithelial cells (A549) / 5.10^6 cell/mL	To identify apoptotic processes and pathways related to JEV infection	- The ROS production in JEV infected cells increased tenfold 24 and 48 hours post-infection; - The ROS increase signaled cell apoptosis and correlated with negative regulation of thioredoxin in infected cells.
Olagnier et al (2014)	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV)/ Not described	Primary human monocyte-derived dendritic cells (Mo-DC) / 10^6 cell/mL	To perform an analysis of the transcriptome, along with biochemical and functional analyses of the host's early response to DENV infection in Mo-DC	- The ROS production was observed in Mo-DC infected by DENV, with a 2-fold increase in DCF fluorescence detected by cytometry, 18 h after infection; - DENV infection increased the intracellular accumulation of ROS in a dose dependent manner.
Datan et al (2016)	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV) / MOI of 5	Canine renal cells Madin-Darby (MDCK) / 10^4 cell/mL	To evaluate the mechanism of autophagy in DENV infection at an early stage and how this process is related to the endoplasmic reticulum (ER) and the protein kinase of the type R endoplasmic reticulum (PERK)	- The inhibition of ER stress or ataxia mutated telangiectasia (ATM) signaling cancels the protection provided by dengue against other cellular stressors; - Direct inhibition of the ER stress response in infected cells decreases the renewal of the autophagosomes, reduces the ROS production, and limits the dengue virus reproduction; - Blocking ATM activation, which is an early response to infection, decreases the transcription of ER stress response proteins, but the ATM has a limited impact on the ROS production and viral titers;

					• The ROS production determines only late-onset autophagy in infected cells and is not necessary for dengue-induced protection against stressors; • Among the various autophagy-inducing pathways during infection, ER stress signaling is most important for viral replication and cell protection.
Valero et al (2013)	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV-1, DENV-2 and DENV-4) / MOI of 1	Monocytes / 3.10^5 cell/mL	To analyze the oxidative (nitric oxide-NO and malondialdehyde-MDA levels) and antioxidant (catalase-CAT, superoxide dismutase-SOD and reduced glutathione-GSH) responses of monocytes of newborns, young adults, and older adults during in vitro study of dengue virus infection	• Lower values of SOD, MDA, GSH, and NO were found in neonates and older adults, whereas the highest values were observed in adults; • The increase in NO, MDA production, catalase and SOD activities, and the GSH content were induced by different viral serotypes and LPS in monocytes of neonatal individuals, adults, and older adults; • DENV-2 induced the highest NO production accompanied by high MDA production; • The antioxidant response was observed in all types of DENV; • The highest values of catalase activity were observed for DENV-1 and DENV-4 and SOD activity for DENV-1; • The highest GSH content was observed in DENV-4 infected monocytes in all groups analyzed; • The degree of oxidative and antioxidant response was influenced by the source of monocytes.

Qi Y et al (2015)	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV-2) / MOI of 4	Primary isolates from human umbilical veins (HUVECs) / 10^6 cell/mL	To evaluate the interferon 6 (IFN-6) role in infection by DENV-2	- The decrease in mitochondrial membrane potential (MMP) was noticeable from 24 hours to 48 hours after DENV2 infection; - Infected IFN 6 cells (+/+) showed no changes in MMP for long periods of time. On the other hand, IFN6 -/- cells appeared to be more sensitive to DENV-2.
Tung et al (2010)	<i>Flaviviridae</i>	Japanese encephalitis virus (JEV) / Not described	Rat brain astrocytes (RBA-1)/Not described	To evaluate the molecular mechanisms underlying JEV-induced MMP-9 expression in RBA-1 cells	- Treatment with JEV induced a significant increase in ROS levels, measurable in 5 minutes and sustained for more than 90 min, which may be associated with an increase in NADPH oxidase; - JEV-induced MMP-9 expression was mediated through ROS-dependent activation of p42 / p44 MAPK in RBA-1 cells.
Cherupanakkal et al (2018)	<i>Flaviviridae</i>	Dengue virus (DENV) / Not described	Lymphomonuclear cells /Not described	To assess biomarkers of oxidative stress, apoptosis, and DNA damage in individuals infected by dengue virus	- Increased levels of lipid peroxidation were found in the infected group when compared to controls with febrile illnesses and controls without febrile illnesses; - When MDA data were correlated with apoptosis levels, a positive correlation was found according to Spearman's correlation.
Keck et al (2017)	<i>Togaviridae</i>	Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV)/ MOI of 2 at 10	Human astrocytoma cells (U87MG) and African green monkey kidney cells (Veros)/ 10^3 cell/mL	To evaluate mitochondrial dynamics and ROS production in VEEV infections	- The data indicated a significant ROS increase in cells infected with TC-83 compared to uninfected cells, in all MOIs and time intervals tested; - U87MG cells treated with hydrogen peroxide (H_2O_2) demonstrated ROS accumulation.
Banerjee N, Mukhopadhyay (2018)	<i>Togaviridae</i>	Chikungunya virus (CHIKV) / Not described	Lymphomonuclear cells /Not described	To evaluate the ROS concentration, oxidative stress	The MDA level was high in infected patients who did not have persistent polyarthralgia

				markers, antioxidant potential, and cytokines in the peripheral blood of patients infected by CHIKV	(ChikWoPP) when compared to healthy controls; - Nitric oxide (NO) was 1.82 times higher in infected patients who had persistent polyarthralgia (ChikWPP); - The ChikWopp group had higher levels of thiols than ChikWPP; - Carbonyl levels were higher in patients with polyarthralgia; - SOD levels were lower than the control; - The SOD level was 1.02 times lower, while the radical scavenging activity was 1.16 times lower in infected patients than in controls; - The MDA/SOD ratio was 1.57 times higher in the ChikWPP group; - There was a 2.42-fold increase in intracellular ROS production when compared to the control group
Silva da Costa et al (2012)	<i>Togaviridae</i>	Sindbis virus (SINV) / MOI of 1 at 5	Neuroblastoma of mice (Neuro 2a) / 10^6 cell/mL	To characterize morphologically and biochemically, evaluate mitochondrial bioenergetics and energy homeostasis in SINV infections	- After 15 h of infection, there was a 40% increase in the ROS accumulation when compared to uninfected cells; - ROS accumulation increased significantly (2.3-fold increase) after 24 hours of SINV infection, suggesting that ROS could have contributed to mitochondrial dysfunction and cell death of Neuro 2a induced by SINV.
Keck et al (2018)	<i>Togaviridae</i>	Venezuelan Equine Encephalitis Virus (VEEV) / MOI of 2 at 10	Human astrocytoma cells (U-87 MG), VERO cells and murine microglial cells (BV2) /U-	To determine whether murine microglia is susceptible to VEEV infection and whether the infection results	At 24 hpi using an MOI of 2, the ROS levels increased 256% and 171% in U-87 MG and BV2 cell lines, respectively;

			87MG and BV2 10^4 cell/mL, VERO 10^5 cell/mL	in mitochondrial dysfunction	- The ROS increase corresponded to a decrease in the mitochondrial membrane potential (MMP) in both cell lines; - At 24 hpi, astrocytes infected with TC-83 exhibited a 53.6% decrease of the MMP compared to uninfected control; - Correlating with the lower ROS level, the BV2 microglia suffered a 40% decrease in MMP at 24 hpi; - The ROS accumulation and the MMP decrease were not dependent on the MOI and, therefore, all subsequent experiments were conducted using the MOI of 2; - The anti-inflammatory BAY-82 decreased the total ROS levels by 16% at 6 hpi and 22% at 24 hpi when compared to the control infected by TC-83.
Cmini FC et al (2017)	<i>Togaviridae</i>	Mayaro virus (MAYV) / MOI of 5	Human hepatocarcinoma cells (HepG2) or Macrophages (J774) / $2.5 \cdot 10^4$ cell/mL or 1.10^6 cell/mL	To investigate whether MAYV causes oxidative stress in infected cells and affects the host's antioxidant system	- There was an increase in total SOD activity at all times in cells infected with MAYV; - There was an increase in the CAT activity at 15 hpi, in cells infected with MAYV; - The total glutathione content in cells infected with MAYV increased by approximately 4 and 2.5 times at 6 and 15 hpi; - Total glutathione levels remained normal in cells at 24 hpi; - There was a progressive decrease in the GSH/GSSG ratio in HepG2 cells after infection by MAYV, with 35% and 37% reductions in this ratio at 15 and 24 hours after infection, respectively;

					• Similar to observations in HepG2 cells, ROS production was increased in MAYV-infected J774 cells; • Regarding HepG2 cells, there was an increase in ROS generation at all times tested (1, 2, 4, 6, 15, and 24 h pi), while in J774 cells an increase was observed after longer periods of infection (6, 15, and 24 h pi); • J774 cells showed a decrease in total SOD activity and increase in MDA levels at 6, 15, and 24 hpi
Dhanwani R et al (2012)	<i>Togaviridae</i>	Chikungunya virus (CHIKV) / MOI of 0.1 to 5	Human neuroblastoma (SH-SY5Y) / 1.10^6 cell/mL	To evaluate the role of apoptosis and oxidative damage in SH-SY5Y cells infected with CHIKV	• There was a decline in the GSH level over time; • Substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS) production reached a maximum at 48 hpi. In addition, the oxidative stress level increased in parallel with the viral titer, at all times.
Verma AK et al (2016)	<i>Rhabdoviridae</i>	Chandipura virus (CHPV) / MOI of 0.1 for 2h	Rat hippocampal neuronal cell line (HT-22 cells) and mouse microglial cell line (BV2 cells) / 3.10^3 cell/mL	To evaluate the pattern of microglial activation and dosage of pro-inflammatory cytokines in CHPV infection	• The ROS and NO levels were evaluated at different incubation times and increased concomitantly with time; • It was found that the NO level was higher at 16 hpi; • The ROS level in the sample infected by CHPV was higher at 24 hpi, compared to those infected by simulation; • Regarding cell death, neuronal cells treated with the supernatant obtained from CHPV-infected microglia showed a greater number of TUNEL positive cells, compared to cells infected by simulation.

Tabela 4: Diretrizes PRISMA

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
TITLE			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	1
ABSTRACT			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	2
INTRODUCTION			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	3-4
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	4-5
METHODS			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	5
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	5-6
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	5
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	5
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	5-6
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	6

Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	*
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	6
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	6
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., I^2) for each meta-analysis.	*

Page 1 of 2

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	*
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	*
RESULTS			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	7
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	8-12
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	7 - Annex
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	Annex
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	*
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	7
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	*
DISCUSSION			

Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	13-15
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	15
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	13-14
FUNDING			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	16

From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit: www.prisma-statement.org.

ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO NO SÃO PAULO MEDICAL JOURNAL

29-Jan-2021

Dear Mr. Almeida Oliveira:

Your manuscript entitled "Mitochondrial bioenergetics and oxidative balance in in vitro arbovirus infection models: A systematic review" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the São Paulo Medical Journal.

Be aware that there may be delays in the processing and review of manuscripts due to interruptions caused by the COVID-19 pandemic. The Journal is prioritizing the review of articles on COVID-19. This means that there may be delays in processing your manuscript. We have a small staff, but we hope to start processing your manuscript soon.

Your manuscript ID is SPMJ-2021-0079.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/spmj-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/spmj-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the São Paulo Medical Journal.

Sincerely,
São Paulo Medical Journal Editorial Office

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

UFPE - CENTRO ACADÊMICO
DE VITÓRIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO - CAV/UFPE

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Distribuição de arbovírus em Vitória de Santo Antão e efeitos de intervenções não farmacológicas sobre os parâmetros mitocondriais, moleculares e imunológicos em células do sangue de pacientes infectados

Pesquisador: ANA LISA DO VALE GOMES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 16223519.1.0000.9430

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.511.388

Apresentação do Projeto: