



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

ANGELA IASMIN DE BARROS FERREIRA

**BIOLOGIA DE SISTEMAS APLICADA AOS MECANISMOS
MOLECULARES DA FEBRE CHIKUNGUNYA**

Recife
2022

ANGELA IASMIN DE BARROS FERREIRA

**BIOLOGIA DE SISTEMAS APLICADA AOS MECANISMOS
MOLECULARES DA FEBRE CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Danyelly
Bruneska Gondim Martins

Co-orientadora: MSc. Thaysa Walleria de
Aragão Santos

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Ferreira, Angela Iasmin de Barros.

Biologia de Sistemas aplicada aos mecanismos moleculares da febre
chikungunya / Angela Iasmin de Barros Ferreira. - Recife, 2022.
77 : il., tab.

Orientador(a): Danyelly Bruneska Gondim Martins

Coorientador(a): Thaysa Walleria de Aragão Santos

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

Inclui referências, apêndices, anexos.

1. Bioquímica. 2. Biologia computacional. 3. Biologia molecular. 4. Doenças
infecciosas . I. Martins, Danyelly Bruneska Gondim. (Orientação). II. Santos,
Thaysa Walleria de Aragão. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

ANGELA IASMIN DE BARROS FERREIRA

**BIOLOGIA DE SISTEMAS APLICADA AOS MECANISMOS
MOLECULARES DA FEBRE CHIKUNGUNYA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Danyelly Bruneska Gondim Martins
Universidade Federal de Pernambuco/Departamento de Bioquímica

Prof. Dr. Andriu dos Santos Catena
Centro Universitário UniFBV/Núcleo de Saúde

MSc. Luiz Gustavo Nogueira de Almeida
University of Calgary/Department of Biochemistry and Molecular Biology

Dedico este trabalho à minha avó (*In memoriam*) e minha mãe, meus maiores exemplos de força e amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me sustentado até aqui, por ter me dado força para seguir até quando eu pensava não ter mais.

À Nossa Senhora, por ter me guiado na estrada da vida, como uma boa mãe faz com a sua filha.

À minha mãe, minha maior incentivadora, aquela que acreditou sempre que eu seria capaz e sempre disse que eu conseguiria chegar onde eu quisesse com os meus estudos. Esteve ao meu lado nas aflições pré-prova, nos resultados das aprovações, nas noites de estudo, nas comemorações das pequenas vitórias do dia a dia. Mamãe, nada do que eu faça, ou diga, será suficiente para agradecer, mas deixo aqui representada e eternizada a minha gratidão.

À minha avó, que cuidou tão bem de mim enquanto criança e que tempos depois, foi a minha vez de cuidar dela. Esse trabalho, como tudo o que faço, é para senhora.

À minha orientadora Profa. Dra. Danyelly Brunaska Gondim Martins, pelos conselhos em forma de conversas, paciência, otimismo, bom-humor e pela oportunidade de fazer o que eu sempre quis: ciência.

À minha co-orientadora MSc. Thaysa Walleria de Aragão Santos, por todas as infinitas mensagens, pelo dom de me dizer que tudo dará certo (e deu certo!) e por uma inusitada parceria de sucesso.

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, sempre solícitos em ensinar, ajudar e compartilhar a alegria que é ser um Prospecmoliano. Agradeço em especial à Carol e Joana, pelas caronas e conversas, e Fran, pelos inúmeros ensinamentos.

À Bruna, por ter me ajudado nos meus primeiros passos na Bioinformática, Isabella, pela companhia nas aventuras do time CHIKV, Carlos, pelas muitas conversas e risadas ao longo desses anos de LIKA, Malu e Amanda pela paciência e disposição em compartilhar conhecimento.

À Profa. Dra. Valéria Nunes-Souza, por ter me dado minha primeira oportunidade na pesquisa, contribuindo para meu amadurecimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos de fora da UFPE e da Universidade, por escutarem

minhas lamentações, confidências e todas as histórias ao longo desses anos. Agradeço em especial à Celina, Gutem, Guilherme, Dornelas e João Lucas, por compartilharem comigo a rotina árdua da UFPE.

Aos meus professores, que acreditaram sempre no meu potencial, desde a pré-escola até os tempos de graduação. Agradeço em especial ao meu professor de biologia do oitavo e nono ano do fundamental II, Allan Maia, que com uma frase mudou toda a minha vida. Agradeço também a minha professora de biologia do terceiro ano do ensino médio, Amélia, por acreditar no meu potencial e ter me apoiado num momento tão crucial da minha vida.

Ao pessoal do Real Lab, por ter me proporcionado o melhor estágio curricular que eu poderia ter, por todo aprendizado, risadas, apoio e amizades que cultivei durante os 5 meses.

À UFPE, LIKA e CNPq, por me proporcionarem a oportunidade de trilhar minha jornada na Biomedicina e pesquisa científica.

Por fim, mas não menos importante, a mim por não ter desistido em momento algum, e por ter uma teimosia e determinação suficiente para seguir os meus sonhos. Se a Angela criança não tivesse sonhado com isso, hoje eu não estaria vivendo este momento incrível.

“Eu escolhi a ciência, porque a ciência me deu o que eu precisava - uma casa em sua definição mais literal: um lugar seguro de se estar.”

~ Hope Jahren

FERREIRA, Angela lasmin de Barros. **Biologia de Sistemas aplicada aos mecanismos moleculares da febre chikungunya**. 2022. 77. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

RESUMO

A febre chikungunya é uma arbovirose endêmica no Brasil, conhecida pela forte artralgia que vem acompanhada de sintomas como febre alta, dor retro-orbital, cefaléia e erupção cutânea. A artralgia pode persistir da fase aguda à fase crônica da doença, não havendo tratamento específico em nenhuma das fases. Por ter uma fisiopatologia pouco esclarecida, a descoberta de biomarcadores para a doença tornou-se um grande desafio. Paralelamente, estudos trazem miRNAs como potenciais biomarcadores para doenças multifatoriais, genéticas e infecciosas. Esses pequenos fragmentos de RNAs, possuem uma excelente capacidade de regulação da expressão gênica, o que de acordo com os princípios da epigenética, explicaria alguns casos evoluírem para a cronicidade e outros não. Desta forma, o presente estudo buscou aplicar a biologia de sistemas para determinar o papel dos miRNAs, genes-alvos, e vias metabólicas que atuam integradamente no desenvolvimento das fases aguda e crônica da febre chikungunya. Para isso, realizou-se pesquisa em literatura dos miRNAs nas plataformas *PubMed*, *ScienceDirect*, *SciElo* e *Cochrane Library*. Posteriormente, foram utilizados os bancos de dados *miRBase*, *Targetexplore*, *Tarbase v.8* e *miRTargetLink 2.0* para seleção dos genes-alvos dos miRNAs. As bases *GeneMANIA* e *STRING* foram utilizadas para criação das redes de interação, enquanto *Metascape* e *Reactome* foram utilizadas para análise de enriquecimento funcional e ontologia gênica. Os miRNAs hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-5581-3p e hsa-miR-382-3p foram selecionados com base nos critérios pré estabelecidos e, por conseguinte, seus genes-alvos *AIFM1*, *CPEB4*, *DIO2*, *MEI4* e *XKR4*. Não foram encontradas interações diretas entre os genes, ou mesmo entre suas proteínas. Contudo, as análises de enriquecimento funcional e ontologia gênica apontaram envolvimento desses genes e proteínas com vias de estresse oxidativo, metabolismo do selênio e metabolismo de hormônios peptídeos. O estresse oxidativo pode desencadear ou agravar uma resposta inflamatória, podendo influenciar no quadro infeccioso da febre chikungunya. Além disso, as selenoproteínas também estão envolvidas com o estresse oxidativo, processos inflamatórios articulares e metabolismo do hormônio T3. Um desbalanço nesses processos, somada a patogênese do CHIKV, pode ser um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento de artralgias intensas em uma determinada porcentagem de pacientes ou pela evolução para a artrite crônica por chikungunya.

Palavras-chave: Arboviroses. Biologia computacional. Epigenética. miRNA. Rede de interação proteína-proteína.

FERREIRA, Angela Iasmin de Barros. **Systems Biology applied to the molecular mechanisms of chikungunya fever**. 2022. 77. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

ABSTRACT

Chikungunya fever is an endemic arbovirus in Brazil, known for its severe arthralgia, which is accompanied by symptoms such as high fever, retro-orbital pain, headache and skin rash. Arthralgia can persist from the acute to the chronic phase of the disease, and there is no specific treatment in any of the phases. Due to the poorly understood pathophysiology, the discovery of biomarkers for the disease has become a major challenge. In parallel, studies bring miRNAs as potential biomarkers for multifactorial, genetic and infectious diseases. These small RNA fragments have an excellent ability to regulate gene expression, which, according to the principles of epigenetics, would explain some cases evolving to chronicity and others not. Thus, the present study sought to apply systems biology to determine the role of miRNAs, target genes, and metabolic pathways that act in an integrated manner in the development of the acute and chronic phases of chikungunya fever. For this, a literature search of miRNAs was carried out on the PubMed, ScienceDirect, SciELO and Cochrane Library platforms. Subsequently, miRBase, Targetexplore, Tarbase v.8 and miRTargetLink 2.0 databases were used to select miRNA target genes. The GeneMANIA and STRING bases were used to create the interaction networks, while Metascape and Reactome were used to analyze functional enrichment and gene ontology. The hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-5581-3p and hsa-miR-382-3p miRNAs were selected based on pre-established criteria and, therefore, their target genes AIFM1, CPEB4, DIO2, MEI4 and XKR4. No direct interactions were found between the genes, or even between their proteins. However, functional enrichment and gene ontology analyzes showed involvement of these genes and proteins in oxidative stress pathways, selenium metabolism and peptide hormone metabolism. Oxidative stress can trigger or worsen an inflammatory response, which may influence the infectious condition of chikungunya fever. In addition, selenoproteins are involved in oxidative stress, joint inflammatory processes and T3 hormone metabolism. An imbalance in these processes, in addition to the pathogenesis of CHIKV, may be one of the factors that contribute to the development of severe arthralgias in a certain percentage of patients or to the evolution to chronic chikungunya arthritis.

Keywords: Arboviruses. Computational biology. Epigenetics. miRNA. Interaction network protein-protein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Mecanismo de infecção do CHIKV na célula.....	16
FIGURA 2	Modelo de patogênese aguda e crônica do CHIKV.....	19
FIGURA 3	O Dogma Central da Biologia Molecular.....	22
FIGURA 4	Modificações epigenéticas.....	25
FIGURA 5	Biogênese de miRNAs.....	27
FIGURA 6	Modelo de rede de interação.....	28
FIGURA 7	Diagrama de Venn dos miRNAs contendo três conjuntos representativos para as arboviroses.....	41
FIGURA 8	Esquema simplificado das etapas de filtragem dos miRNAs.....	42
FIGURA 9	Diagrama de Venn da seleção e intersecção entre os genes-alvos, contendo 4 principais conjuntos.....	44
FIGURA 10	Rede de interação entre os 5 genes selecionados, constituída por 50 vértices.....	45
FIGURA 11	Rede de interação física contendo 50 vértices.....	46
FIGURA 12	Rede de interação de gênica contendo 50 vértices.....	47
FIGURA 13	Rede de vias contendo 50 vértices.....	48
FIGURA 14	Rede de interação entre as 5 proteínas, constituída por 55 vértices construída pelo STRING.....	49
FIGURA 15	Gráfico em barra de enriquecimento funcional da rede da AIFM1.....	50
FIGURA 16	Gráfico em barra de enriquecimento funcional da rede de CPEB4.....	51
FIGURA 17	Gráfico em barra de enriquecimento funcional da rede do DIO2.....	51
FIGURA 18	Gráfico em barra de enriquecimento funcional da rede da MEI4.....	52
FIGURA 19	Gráfico em barra de ontologia gênica da rede das 5 proteínas.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros de inferência de rede no STRING.....	33
TABELA 2 - Tabela de artigos que foram encontrados nas plataformas de pesquisa utilizando os respectivos descritores.....	40
TABELA 3 - Tabela descritiva da quantidade de genes-alvos encontrados em cada banco de dados.....	43
TABELA 4 - Tabela de enriquecimento funcional das 5 proteínas.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIFM1	<i>Apoptosis inducing factor mitochondria associated 1</i>
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AR	Artrite Reumatoide
ATP	Adenosina trifosfato
BS	Biologia de Sistemas
CHIKV	Chikungunya Vírus
CLR	<i>C-type Lectin receptor</i>
COX2	Ciclo-oxigenase 2
CPEB4	<i>Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4</i>
CPV-1	Vacúolos citopáticos
CXCL9	<i>C-X-C motif chemokine ligand 9</i>
DENV	Dengue Vírus
DIO2	<i>Iodothyronine deiodinase 2</i>
DIO3	<i>Iodothyronine deiodinase 3</i>
DMARDs	Droga modificadora da doença
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metiltransferases
dsRBD	Domínio de ligação ao RNA de fita dupla
dsRNA	RNA de dupla fita
GO	Onthology genes
H ₂ O	Água
HATs	Lisinas acetiltransferases
HDACs	Lisinas desacetilases
HIF-1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-alpha</i>
hsa	<i>Homo sapiens</i>
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8

IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
INF- α	Interferon alfa
INF- γ	Interferon gama
iNOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
IP-10	<i>Interferon gamma inducible protein-10</i>
ITGB2	<i>Integrin subunit beta 2</i>
lncRNA	RNA longo não codificante
M6A	N6-metiladenosina
MCP-1	Proteína quimiotóxica de monócitos
ME	5-metilcitosina
MEI4	<i>Meiotic double-stranded break formation protein 4</i>
miRNA/miR	micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NAMPT	Nicotinamida fosforibosiltransferase
NF- $\kappa\beta$	<i>Nuclear factor kappa-beta</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLR	<i>NOD like receptor</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
nsP	Proteína não estrutural
OA	Osteoartrite
OH	Hidroxila
ONOO ⁻	Peroxinitrito
ORFs	<i>Open reading frame</i>
Oz ⁻	Ânion superóxido
PGE2	Prostaglandina E2
PARP	<i>Poly(ADP-ribose) polymerases</i>
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão

Pol II	RNA polimerase II
REDOX	Redução/oxidação
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNase III	Ribonuclease III
RNAp	RNA polimerase
RNA _t	RNA transportador
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com Transcriptase reversa
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real com Transcriptase reversa
T3	Tri-iodotironina
T4	Tetraiodotironina
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPO	Tireoide peroxidase
vRNA	RNA viral
XKR4	<i>XK related 4</i>
ZIKV	Zika Vírus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	Arboviroses.....	14
2.1.1	Febre chikungunya.....	14
2.1.1.1	Inflamação.....	17
2.1.1.2	Patogênese da Febre Chikungunya.....	17
2.2	Genética e Epigenética.....	20
2.2.1	Modificações epigenéticas.....	23
2.2.2	miRNAs.....	25
2.3	Biologia Computacional.....	27
2.3.1	Biologia de Sistemas.....	27
2.3.2	Redes Biológicas.....	30
2.3.3	Banco de Dados.....	31
2.3.3.1	Base de dados genômicos e transcriptômicos.....	31
2.3.3.2	Banco de dados para redes de interação.....	32
2.3.3.3	Banco de dados metabolômicos.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo Geral.....	36
3.2	Objetivos Específicos.....	36
4	METODOLOGIA.....	37
4.1	Busca Bibliográfica.....	37
4.2	Base de Dados.....	37
4.2.1	Seleção de miRNA.....	38
4.2.2	Seleção dos Genes-alvos.....	38
4.2.3	Determinação das Redes de Interação.....	38
4.2.4	Análises de Enriquecimento Funcional e Ontologia Gênica.....	39
5	RESULTADOS.....	40

5.1	Seleção de miRNAs.....	40
5.2	Seleção de Genes-alvo.....	43
5.3	Análise de Redes de interação.....	44
5.4	Análise de Enriquecimento funcional e Ontologia gênica...	50
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

As arboviroses, infecções causadas por arbovírus, são endêmicas no Brasil, sendo a dengue, Zika e febre chikungunya e febre amarela as mais predominantes territorialmente (LOPES; NOZAWA; & LINHARES, 2014). Nos anos de 2015 e 2016, ocorreu uma epidemia concomitante dessas três infecções pelo vírus da dengue (DENV), Zika vírus (ZIKV) e chikungunya vírus (CHIKV), porém, a epidemiologia das doenças continua apontando um alto número de casos todos os anos. Só no ano de 2021 no Brasil, até a 47ª semana epidemiológica, foram notificados 502.983 casos prováveis de dengue, 93.043 casos prováveis de chikungunya e 6.020 de casos prováveis de Zika. A região nordeste foi recordista em casos de febre chikungunya (BRASIL, 2021).

A febre chikungunya é uma doença causada pelo CHIKV e possui principalmente três fases (aguda, pós aguda e crônica). Na fase aguda há a sintomatologia geral de viroses combinada com um quadro característico de mialgia e poliartralgia, que pode persistir por mais algumas semanas, levando o paciente à fase pós aguda, e posteriormente, uma possível evolução da artralgia acompanhada ou não de edema articular (artrite) na fase crônica (VAIRO *et al.* 2019; SILVA; DERMODY, 2017). O sintoma de artralgia é característico da chikungunya, podendo causar dificuldade de retorno às atividades cotidianas, apresentando duração média de três meses (VAIRO *et al.* 2019; SILVA; DERMODY, 2017). Visto que ainda não existe uma farmacoterapia específica para a doença, o tratamento é feito à base de analgésicos, anti-inflamatórios não-esteroides (AINES), glicocorticoides e terapia medicamentosa anti-reumática modificadora da doença (DMARDs) (VAIRO *et al.* 2019; SILVA; DERMODY, 2017). A falta de especificidade, por vezes, atrasa o tratamento, contribuindo para o estabelecimento de comorbidades nesses pacientes, e conseqüentemente, diminuindo drasticamente a sua qualidade de vida.

Pela deficiência de estudos sobre a fisiopatologia e de tratamento adequado direcionado, a descoberta de biomarcadores para a doença tornou-se um grande desafio. A epigenética é uma vertente para além da genética, responsável por estudar as modificações fenotípicas que acontecem de forma não relacionadas às alterações genômicas (FELSENFELD, 2014; GAYON, 2016). Uma das

possibilidades de investigação, é acerca da regulação gênica pós transcricional, realizada por miRNAs, que são pequenos fragmentos de RNA que através do complexo mi-RISC, possuem a capacidade de degradar a fita de RNA mensageiro (mRNA) ao se ligar a ela (WAHID *et al.*, 2010; MOHR; MOTT, 2015). Os miRNAs têm sido amplamente estudados nas áreas da oncologia, neurologia, reumatologia, virologia, entre outras, provando ser uma abordagem promissora (MOHR; MOTT, 2015).

Nos últimos anos, a bioinformática vem sendo uma ferramenta constantemente utilizada nas pesquisas das ciências biológicas e da saúde, sendo uma área que visa desenvolver e aplicar ferramentas da informática, permitindo trabalhar com dados já existentes ou gerar dados próprios (POLONI *et al.*, 2014). A biologia de sistemas (BS), consegue através da bioinformática realizar o papel de estudar sistematicamente e de forma integrada dados biológicos, relacionando esses pontos por meio de *networks* ou redes de interação (POLONI *et al.*, 2014). Essas redes de interação podem ser obtidas, integradas e analisadas a fim de criar redes com finalidades distintas, desde estudos de imunologia de sistemas para propostas de vacinas, como também para compreensão da interação de moléculas e vias de sinalização (RODRIGUEZ *et al.*, 2019; SHUZHAO *et al.*, 2014). Dessa forma, a BS pode ser uma ferramenta para uma melhor compreensão da fisiopatologia de doenças negligenciadas como a febre chikungunya.

Com base nisso, o presente trabalho buscou elucidar os aspectos fisiopatológicos a nível molecular da febre chikungunya, através de ferramentas de bioinformática para a BS, visando a compreensão da fisiopatologia desta doença e descoberta de potenciais biomarcadores para novos alvos terapêuticos específicos para febre chikungunya.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arboviroses

As arboviroses são doenças causadas por vírus, onde a transmissão é feita através de artrópodes hematófagos durante o processo de repasto sanguíneo (LOPES; NOZAWA; & LINHARES, 2014). Esses arbovírus, como também são chamados, têm parte do seu ciclo de vida em invertebrados, utilizando-os também como vetores de modo a alcançar seu hospedeiro amplificador (RUST, 2012; CLETON *et al.*, 2012; GUBLER, 2006). Os arbovírus podem causar infecções em animais de sangue quente, incluindo os humanos (RUST, 2012).

A presença dos arbovírus está estritamente ligada a condições ambientais e socioeconômicas da região (RUST, 2012). Fatores como clima, desmatamento, migração populacional, expansão desordenada de áreas urbanas, precariedade de moradia e saneamento básico estão entre os mais cruciais para o favorecimento das endemias de arboviroses, tanto no Brasil como em outros locais do mundo (RUST, 2012). As principais famílias de arbovírus circulantes no Brasil são *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae* e *Reoviridae* (CLETON *et al.*, 2012; GUBLER, 2006).

No ano de maior importância epidemiológica para arboviroses, em 2015, o Brasil presenciou uma tríplice epidemia, com aumentos exorbitantes de casos de dengue, Zika vírus e febre chikungunya (SKALINSKI *et al.*, 2022). A co-circulação desses vírus nas mesmas regiões é uma realidade em boa parte do sudeste asiático e continente americano (LI *et al.*, 2021).

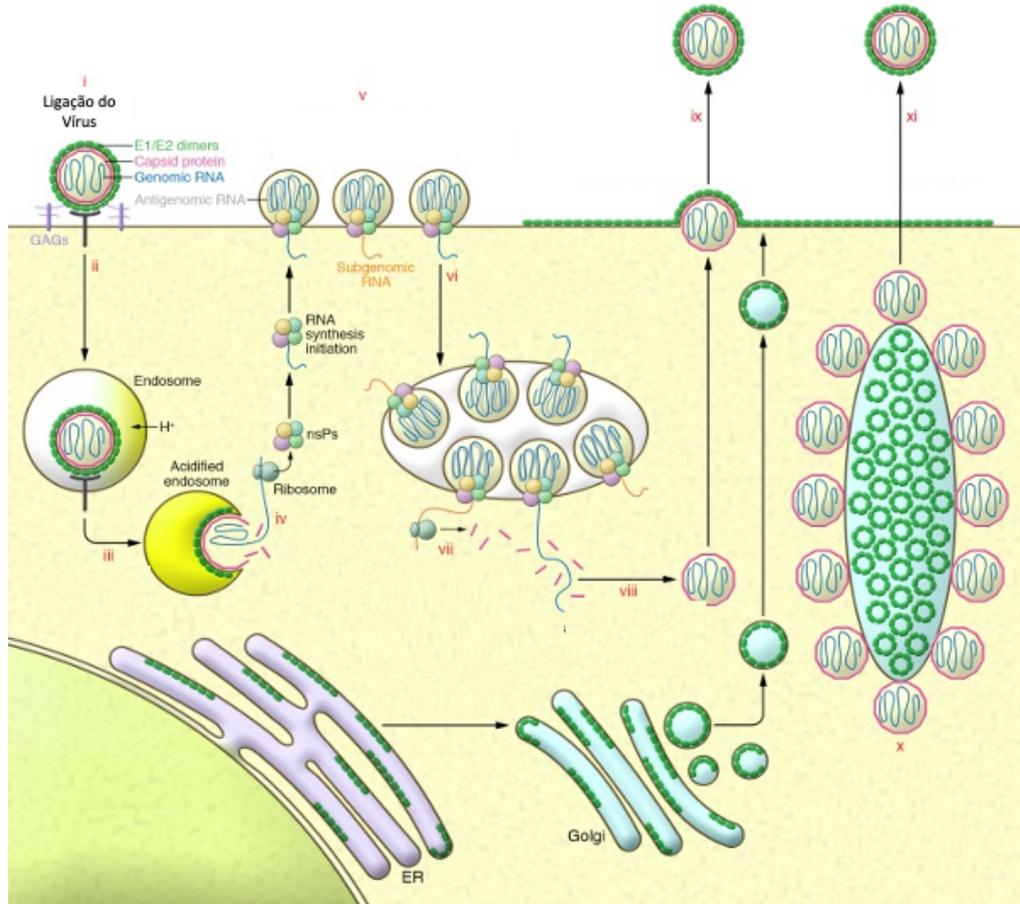
2.1.1 Febre Chikungunya

A febre chikungunya é a manifestação clínica da infecção pelo CHIKV, vírus o qual pertence ao gênero Alphavirus e família *Togaviridae*. Este gênero possui um histórico de endemias em regiões de clima tropical e subtropical da África subsaariana, Sudeste Asiático e Américas (DIALLO *et al.*, 2012; DIALLO, M. *et al.*, 1999; JUPP; MCINTOSH, 1990; JUPP; MCINTOSH; DOS SANTOS, 1981; AREAS, 2022). A febre chikungunya recebeu esse nome após perceberem que as pessoas

com a doença andavam com dificuldade e curvadas. Segundo o dialeto Kimakonde, *chikungunya* significa “aquele que se curva” (ROBINSON, 1955). O primeiro relato da doença, quando foi batizada com o nome de febre *Ccikungunya*, ocorreu em 1952 na Tanzânia (LUMSDEN, 1955). A transmissão se deve, principalmente, por intermédio de mosquitos do gênero *Aedes*, com predomínio do *Aedes aegypti* e do *Aedes albopictus* nas zonas urbanas (WEAVER, 2006).

O CHIKV, apresenta sua organização genômica de RNA fita simples de sentido positivo, duas *open reading frames* (ORFs) para tradução de quatro proteínas não estruturais (nsp1, 2, 3 e 4) e cinco proteínas estruturais (capsídeo, E1, E2, 6K e E3) (KHAN *et al.*, 2002; SOLIGNAT *et al.*, 2009; VAN DUIJL-RICHTER *et al.*, 2015). A replicação viral do CHIKV ocorre em 11 etapas (**Figura 1**): a proteína estrutural E2 se liga à superfície celular através de um receptor (i) e então o CHIKV entra na célula através de endocitose mediada por clatrina (ii) e a acidificação dos endossomos leva à inserção do peptídeo de fusão em E1 na membrana endossomal. Após essa etapa, a fusão do envelope viral e da membrana endossomal libera o nucleocapsídeo no citosol (iii) e ocorre a desmontagem do nucleocapsídeo, com a liberação de RNA genômico de sentido positivo e a tradução de proteína não estrutural (nsP) (iv). Com isso, quatro nsPs, juntamente com RNA genômico e proteínas hospedeiras, montam-se na membrana plasmática e a modificam para formar compartimentos de replicação viral (esférulas) contendo vírus de RNA de dupla fita (dsRNA) (v). A internalização da esfera (vi) permite a formação de grandes vacúolos citopáticos (CPV-1). Assim, a tradução do RNA subgenômico produz a poliproteína estrutural e a autoproteólise do capsídeo libera o capsídeo livre no citoplasma (vii). Após essa etapa, ocorre a translocação de poliproteínas E3-E2-6K-E1/E2-E2-TK no retículo endoplasmático. A interação do capsídeo e do RNA genômico leva à formação de nucleocapsídeos icosaédricos (viii) que (ix) se montam com E2/E1 na MP, resultando em brotamento de virions de progênie madura (ix). Mais tarde na infecção, formam-se CPV-IIs, contendo redes hexagonais de E2/E1 e cravejadas de nucleocapsídeos (x). Os CPV-IIs provavelmente servem como veículos de transporte e locais de montagem para proteínas estruturais, permitindo a formação de virions maduros e sua saída (xi) (SILVA; DERMODY, 2017).

Figura 1 - Mecanismo de infecção do CHIKV na célula.



Fonte: adaptado de SILVA; DERMODY, 2017.

Ao contrário de outros arbovírus, boa parte das pessoas infectadas pelo CHIKV acabam desenvolvendo sua forma sintomática após um período de incubação entre 4 à 7 dias (LUM; NG, 2015). A infecção é dividida em três fases: aguda, pós-aguda e crônica. Na fase aguda o paciente pode manifestar febre alta, astenia, mialgia, poliartralgia, dor retro-orbital, cefaleia, erupção cutânea e fotossensibilidade, durando, em média, uma semana (GÉRARDIN *et al.*, 2011; MANIMUNDA *et al.*, 2010; MEJÍA; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018). A fase pós aguda é caracterizada pelo prolongamento de alguns dos sintomas da fase aguda, com ênfase na poliartralgia (GÉRARDIN *et al.*, 2011; MANIMUNDA *et al.*, 2010; MEJÍA; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018). Passados 3 meses da infecção, já na fase crônica, os

sintomas que mais comumente persistem, são poliartralgia (com ou sem edema articular), fadiga e neurite (GÉRARDIN *et al.*, 2011; MANIMUNDA *et al.*, 2010; MEJÍA; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018). Além da artralgia por inflamação articular (artrite), pacientes também podem apresentar casos de dores neuropáticas (SÁNCHEZ; CAÑÓN; LOMBO, 2019).

Além das manifestações clínicas mais recorrentes, os pacientes ainda podem apresentar manifestações clínicas atípicas no sistema nervoso (meningoencefalite, encefalopatia, convulsões e síndrome de Guillain-Barré), cardiovascular (miocardite, insuficiência cardíaca, arritmias e cardiomiopatia), renal (nefrite e insuficiência renal aguda) e ocular (uveíte, neurite óptica e retinite) (SILVA; DERMODY, 2017).

2.1.1.1 Inflamação

Um processo inflamatório ocorre com objetivo de eliminar a causa da lesão celular e promover o reparo da região. As moléculas, fluidos e células de defesa do organismo circulantes nos vasos sanguíneos são deslocados até o local para dar início ao processo de inflamação (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

A inflamação aguda é a primeira etapa do processo, consistindo numa resposta de curta duração que culmina numa regeneração ou cicatrização da região. Infecções por bactérias, fungos, vírus ou parasitas, traumas, necrose tecidual, reações de hipersensibilidade e corpos estranhos são estímulos para inflamação. As principais modificações no organismo durante o processo agudo são alterações cardiovasculares, formação de edema e infiltrados de neutrófilos, além da mediação por citocinas e quimiocinas, como as interleucinas 6 e 1 (IL-6 e IL-1), fator de necrose tumoral (TNF), e proteínas do sistema complemento (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

Já a inflamação crônica, é uma resposta de longa duração que prossegue, de modo geral, devido à persistência da agressão celular e tecidual. As modificações recorrentes nesse processo crônico são: a infiltração de mononucleares (macrófagos e linfócitos), a destruição do tecido onde está a lesão e, possivelmente, o reparo. Ainda ocorre mediação do processo por outras citocinas e quimiocinas, como a

IL-17, IL-12 e IL-23 (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013).

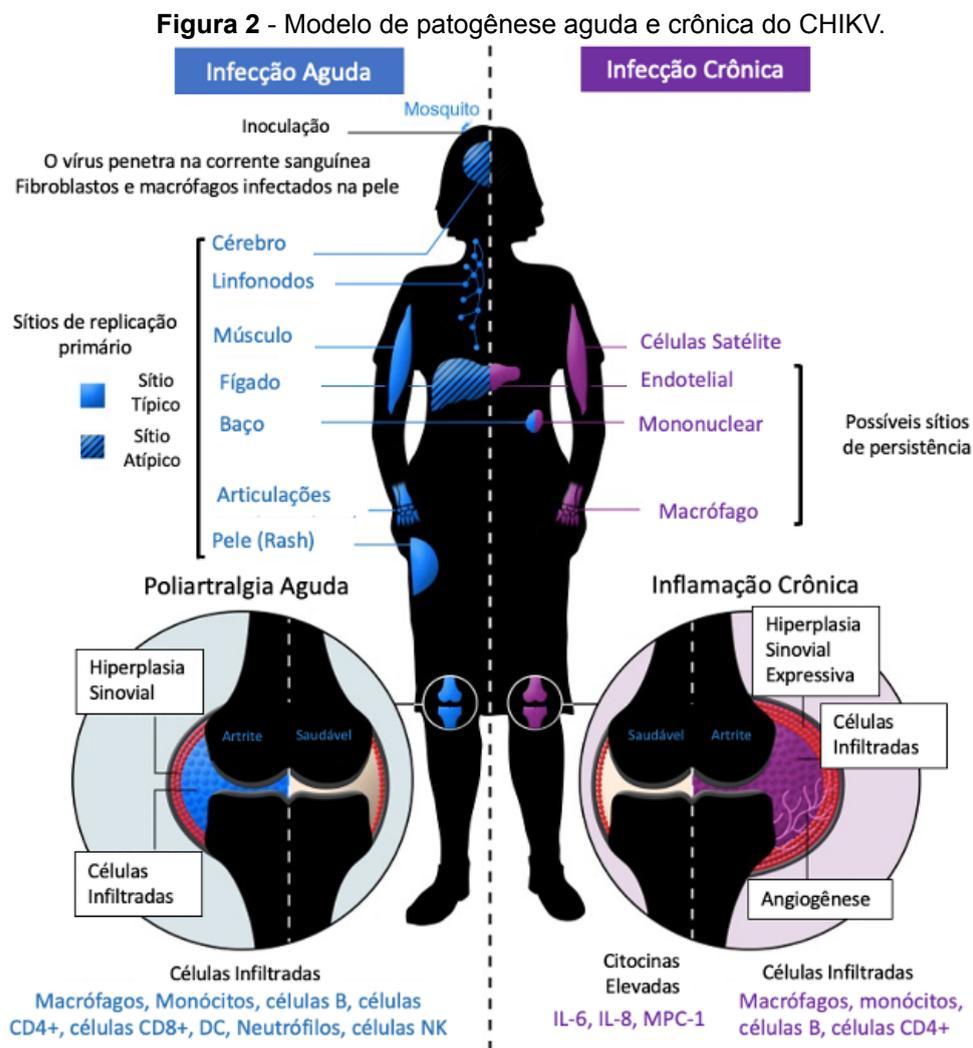
2.1.1.2 Patogênese da Febre Chikungunya

A febre chikungunya é um processo infeccioso com uma alta carga sérica do vírus, principalmente na fase aguda (SILVA; DERMODY, 2017). O tropismo celular em humanos gira em torno de fibroblastos dérmicos, cápsula articular, células musculares, epiteliais e endoteliais, e macrófagos (SOURISSEAU *et al.*, 2007; COUDERC *et al.*, 2008; OZDEN *et al.*, 2007). O processo inflamatório ocorre simultaneamente ao aumento de mediadores imunológicos, e à infiltração de células imunes nas articulações e tecidos (CHIRATHAWORN *et al.*, 2013; KELVIN *et al.*, 2011).

Na artralgia característica da Febre Chikungunya podem ser encontrados RNA e proteínas virais em tecido sinovial (fluido e fibroblasto) e macrófagos. Os macrófagos são as células mais propícias para a replicação viral, sugere-se que seja a célula mais abundante na infiltração sinovial, possibilitando que este mecanismo favoreça a patogênese de cronicidade da doença (WOODRUFF; BOWEN; PLATT, 1978; REZZA *et al.*, 2014; POWERS *et al.*, 2000; OZDEN *et al.*, 2007; WAUQUIER *et al.*, 2010). Outrossim, alta replicação em osteoblastos e danos ósseos são outras consequências da patogênese da infecção por CHIKV (ZHANG *et al.*, 2018; GOUPIL *et al.*, 2016; YOON *et al.*, 2015).

As diferenças na patologia aguda e crônica da infecção por CHIKV podem ser vistas na **Figura 2**. A infecção aguda pelo CHIKV começa com a transmissão do vírus através da picada de um mosquito infectado na pele, e a replicação do CHIKV ocorre em células suscetíveis, incluindo fibroblastos e macrófagos. A replicação viral e as respostas imunes do hospedeiro podem favorecer a ocorrência da mialgia e poliartralgia, especialmente nas articulações distais durante a fase aguda. Além disso, a infecção aguda provoca uma resposta inflamatória nos tecidos infectados com uma extensa infiltração principalmente de macrófagos e monócitos, mas também de neutrófilos, células NK e linfócitos nos tecidos-alvo e pela liberação de várias quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias. A doença crônica por CHIKV pode persistir por meses ou anos após a infecção aguda, mas geralmente é limitada a

articulações mais distais. Há hipóteses de que a doença crônica é provavelmente mediada por vírus persistente e inflamação. Dentro da articulação cronicamente infectada, no líquido sinovial, também há a presença contínua de um subconjunto de células infiltrantes (principalmente macrófagos, monócitos e linfócitos) além de mediadores pró-inflamatórios específicos (IL-6, IL-8 e CCL2/MCP-1). A patologia articular crônica assemelha-se à artrite reumatóide, com hiperplasia e angiogênese significativas (SILVA; DERMODY, 2017).



Fonte: adaptado de SILVA; DERMODY, 2017

O vírus se dissemina através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para locais típicos (quadrados sólidos) e atípicos (quadrados hachurados) de replicação primária (indicados em azul). Possíveis locais de persistência do CHIKV incluem células endoteliais no fígado e outros órgãos, células mononucleares no baço, macrófagos no líquido sinovial e tecidos circundantes e células satélites no músculo (indicadas em roxo).

A resposta imune adaptativa também possui relevância na fisiopatologia. Linfócitos T CD4⁺ apresentam acentuada circulação durante a fase aguda, enquanto os linfócitos CD8⁺ são mais presentes na fase crônica (HOARAU *et al.*, 2010; LABADIE *et al.*, 2010). Apesar da intrigante disparidade de perfil, estudos apontam que apenas o CD4⁺ pode contribuir como mediador inflamatório (TEO *et al.*, 2012).

Em ambas as fases da doença, aguda e crônica, a circulação de citocinas e quimiocinas é constante. As principais envolvidas nesse processo são, principalmente, as citocinas pró-inflamatórias IFN- α , IFN- γ e IL-6, as citocinas anti-inflamatórias IL-1, IL-4 e IL-10, e quimiocinas como a CCL2/MCP-1 e IP-10 (TENG *et al.*, 2015). Os maiores detalhes da patogênese da infecção por CHIKV permanecem desconhecidos, constatando que a literatura necessita de mais estudos acerca do tema.

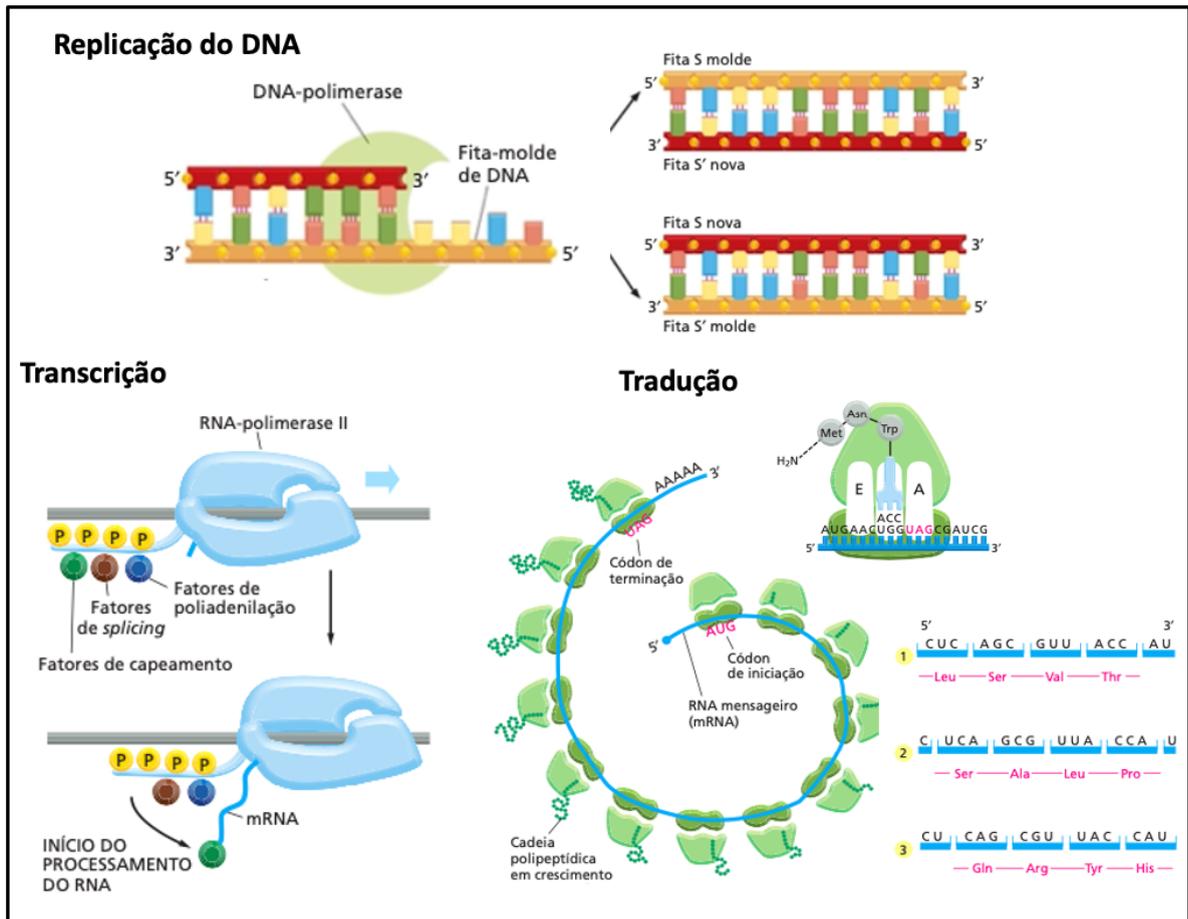
Até o presente momento, não existe farmacoterapia específica para febre chikungunya. Os medicamentos utilizados durante o tratamento visam a atuação na sintomatologia, diminuindo as manifestações clínicas como febre e dor, e impedindo algumas complicações específicas de alguns casos, como mau funcionamento de órgãos (VAIRO *et al.* 2019). Na fase aguda da infecção, os AINES são a primeira escolha para o tratamento, sendo recomendado o uso em até 14 dias do início do quadro clínico. Analgésicos também compõem o tratamento dessa primeira fase da doença, podendo ser receitados opióides fracos também na fase pós aguda (SIMON *et al.*, 2015). Nos casos de sintomas prolongados nas articulações, como em tenossinovite, bursite e capsulite, podem ser prescritos anti-inflamatórios tópicos e infiltrativos (VAIRO *et al.* 2019). Para os pacientes que desenvolvem artrite crônica por CHIKV, a estratégia terapêutica é baseada em glicocorticoides, e em alguns casos, DMARDs, como é o caso do Metotrexato, Sulfasalazina e Hidroxicloroquina (JAVELLE *et al.*, 2015; AMARAL; BINGHAM; SCHOEN, 2020). Todos esses tratamentos são paliativos, sendo apenas o Ribavirin, um antiviral, que após estudos *in vitro* e *in vivo*, teve eficácia comprovada na inibição da replicação viral em células Vero, e em camundongos reduziu a carga viral e inflamação quando combinados com Doxicilina (AMARAL; BINGHAM; SCHOEN, 2020; RAVICHANDRAN; MANIAN, 2008).

2.2 Genética e epigenética

No dogma central da biologia molecular, a informação genética é transmitida do DNA para o RNA (podendo haver o sentido inverso) e do RNA para a proteína. O processo transcricional (DNA → RNA), é uma vertente do tradicional dogma central da biologia molecular, que diz respeito ao fluxo de informação “decodificada” dos genes. Os nucleotídeos do DNA podem ser replicados (DNA → DNA) e posteriormente transcritos em RNA. O RNA pode ser traduzido (RNA → Proteína) para aminoácidos e, respectivamente, proteínas. Durante todos esses processos do dogma central da biologia molecular existem formas de regulação (SCHAEFFER; THOMPSON, 2015).

O material genético contém informações necessárias para a manutenção de todo funcionamento de um organismo vivo. O primeiro passo para que essas informações sejam transmitidas para células do mesmo organismo, ou para a prole, é o processo de replicação do DNA (**Figura 3**). A replicação possui caráter semi-conservativo e só acontece quando as pontes de hidrogênio, que unem as duas fitas de DNA, são quebradas. De modo geral, após a síntese do primer pela RNA polimerase (RNAP), a DNA polimerase se ligará a ele na fita do sentido 5' e dará início ao processo de replicação (SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

Figura 3 - Dogma Central da Biologia Molecular



Fonte: adaptado de ALBERTS *et al.*, 2011.

Para as informações contidas no DNA chegarem a maquinaria citoplasmática, os nucleotídeos são transcritos para mRNA, uma molécula capaz de atravessar a carioteca rumo ao citoplasma (SCHAEFFER; THOMPSON, 2015). O processo tem início quando fatores de transcrição são realocados para pontos específicos do DNA, quebrando as pontes de hidrogênio da região e, conseqüentemente, abrindo essa parte do gene ativo para ser transcrito (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). A RNA polimerase se liga a um promotor e começa a sintetizar uma *fita sense* de precursor de mRNA, de modo complementar a fita de DNA que está sendo exposta (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Em eucariotos, o transcrito primário é denominado pré-mRNA, sendo posteriormente direcionado para os ribossomos (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). O processamento de mRNA eucariótico

(por exemplo, splicing alternativo, capping 5' e formação de cauda poli(A) 3') governa a estabilidade do mRNA e determina seu destino traducional (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Modificações pós-traducionais das proteínas adicionam mais uma camada na modulação dinâmica de processos biológicos complexos (PRAMANIK *et al.*, 2021).

Por fim, o mRNA chega aos ribossomos e cada códon é substituído por um aminoácido seguindo a mesma direção, 5'-3', dando origem a uma unidade funcional: a proteína. Os RNAt, em uma extremidade, trarão sequências chamadas de anticódons que se ligarão ao mRNA. No ribossomo, cada códon será exposto e lido separadamente, até chegar no *stop* códon. A iniciação (AUG) e terminação (UAA, UAG ou UGA) da tradução são determinadas por códons específicos. Além disso, ainda há o enovelamento em formato 3D da proteína, permitindo que após a parada, ela siga para seu local de funcionamento celular (SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

2.2.1 Modificações Epigenéticas

As modificações epigenéticas são modificações de fenótipos que acontecem independentes às alterações genômicas, a partir de diferentes regulações que impactam na expressão dos genes (FELSENFELD, 2014; GAYON, 2016). Modificações químicas nos níveis de DNA (por exemplo, 5-metilcitosina [Me] e modificações de histonas) e RNA (por exemplo, a N6-metiladenosina [m6A]) são fatores cruciais no desenvolvimento da memória epigenética (PRAMANIK *et al.*, 2021). As principais alterações epigenéticas são: acetilação e fosforilação de histonas, metilação do DNA, remodelação de cromatina, e miRNAs (GAYON, 2016).

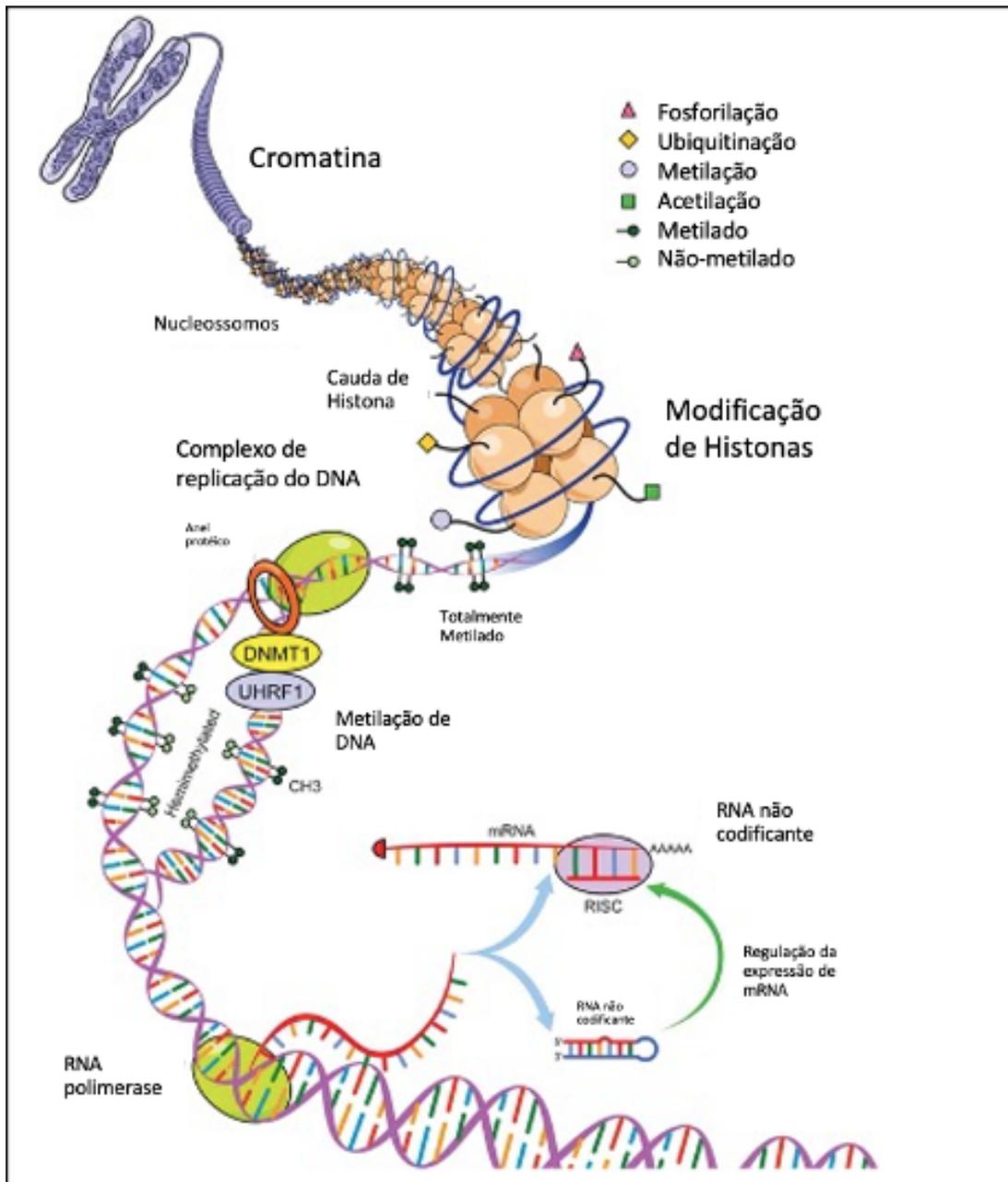
A metilação do DNA consiste na formação de uma 5-metil-citosina, pela transferência de um metil para o carbono 5, reação catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs). É proposto um padrão de metilação nas fitas do DNA no processo de replicação, tendo as DNMTs que catalisam a adição do grupo metil, as que removem o grupo metil e fazem a desmetilação, e por fim, as que reconhecem e região do DNA metilada e ligam-se para regular a expressão gênica. Esse processo de silenciamento acontece nos sítios CpG (citosinas que precedem uma guanina)

(MOORE; LE; FAN, 2012).

As histonas são proteínas carregadas positivamente e que interagem com o DNA, proporcionando seu enovelamento, e conseqüentemente, as regiões que ficarão disponíveis, ou não, para transcrição. A acetilação das histonas ocorre em seus resíduos de lisina, afastando-as da molécula de DNA devido a carga neutra que será configurada a elas. As lisinas acetiltransferases (HATs) e lisinas desacetilases (HDACs) são as classes enzimáticas que orquestram essa regulação da expressão gênica. Essas acetilações reduzem a afinidade do DNA com a histona, por conseguinte, afrouxa o nucleossomo, espécie de complexo de DNA mais as histonas, recruta outros componentes responsáveis pela transcrição e causa o remodelamento da cromatina (LEE *et al.*, 1993; LAWRENCE; DAUJAT; SCHNEIDER, 2016).

Além da acetilação, a regulação da expressão gênica através das histonas também pode acontecer pela fosforilação e desfosforilação delas. Os resíduos de serina e treoninas passam por esses dois processos, sendo usados para a “abertura” desses espaços específicos. A fosforilação das histonas serve como um *insight* para essa abertura e transcrição do DNA (PETERSON; LANIEL, 2004) **(Figura 4)**.

Figura 4 - Modificações epigenéticas.



Fonte: KLEIN; BENARROCH, 2014.

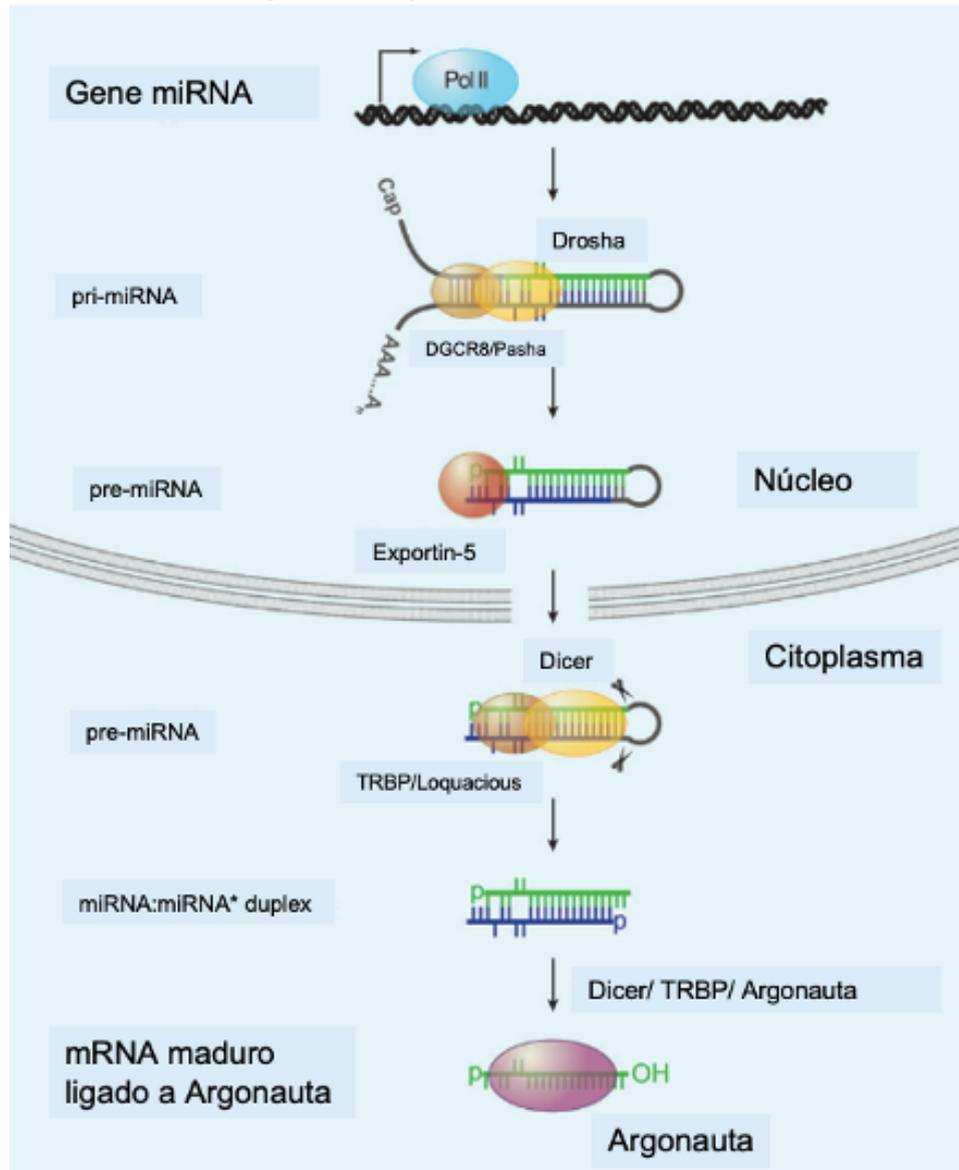
2.2.2 miRNAs

Entre as modificações epigenéticas, pode-se destacar os miRNAs, que possuem como função principal a regulação da expressão gênica. Humanos produzem diferentes miRNAs, que parecem regular ao menos um terço de todos os genes que codificam proteínas. Os miRNAs são pequenos fragmentos de RNA que

contribuem para a degradação da fita de mRNA, caso se ligue a ela pelo complexo mi-RISC. A regulação da expressão gênica se dá pelo pareamento de bases com mRNAs específicos, além de sua estabilidade e tradução (BUSHATI; COHEN, 2007).

Sua biogênese tem início na expressão e transcrição dos genes *mir*. O processo de formação do transcrito começa pela atuação das enzimas RNA polimerases II e III, formando um miRNA primário (pri-miRNA), que será clivado pela enzima *Drosha* e exportado para o citoplasma como o precursor pré-miRNA. Esse precursor sofrerá outra clivagem, dessa vez pela enzima *Dicer*, originando um miRNA maduro. A partir dele, terá duas fitas: a guia e a passageira. A primeira, será encaminhada para o processo de formação do complexo de mi-RISC, formando por fim, o miRNA maduro e apto à clivar e silenciar um mRNA. Já a segunda, é degradada no citoplasma e encaminhada para reciclagem (WAHID *et al.*, 2010). Essas fitas também podem receber a nomenclatura de braços 3p ou 5p e, a depender do miRNA, uma delas pode compôr o complexo mi-RISC por apresentar um acúmulo majoritário na célula ou, pode haver produção em quantidade semelhantes de ambos os braços do transcrito (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2011; HUTVAGNER, 2005).

A degradação do mRNA culmina na não-tradução de uma proteína, causando uma ausência em determinados processos e vias moleculares, gerando um desbalanço nos eventos biológicos. O processo de biogênese dos miRNAs pode ser visualizado na **Figura 5**.

Figura 5 - Biogênese de miRNAs.

Fonte: BUSHATI; COHEN, 2007.

Um gene de miRNA é transcrito, geralmente pela RNA polimerase II (Pol II), gerando o miRNA primário (pri-miRNA). No núcleo, a endonuclease RNase III Drosha e a proteína DGCR8/Pasha do domínio de ligação ao RNA de fita dupla (dsRBD) cliva o pri-miRNA e produzem uma saliência de 2 nt 3' contendo o miRNA precursor de ~70 nt (pré-miRNA). Exportin-5 transporta o pré-miRNA para o citoplasma, onde é clivado por outra RNase III endonuclease, Dicer, juntamente com a proteína dsRBD TRBP/Loquacious, liberando a saliência de 2 nt 3' contendo um ~21-nt miRNA:miRNA* duplex. A fita de miRNA é carregada em um Argonauta contendo Complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), enquanto a fita miRNA* é tipicamente degradada.

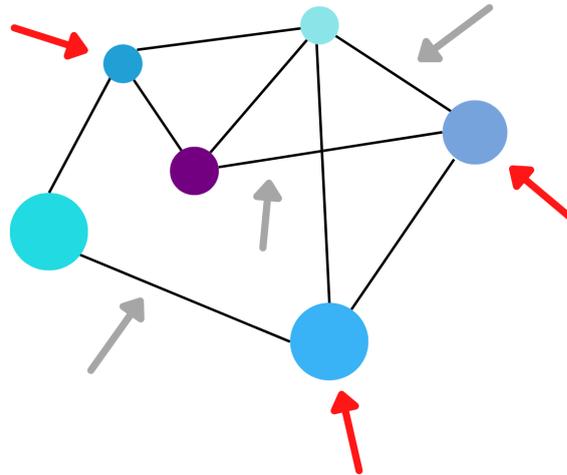
2.3 Biologia computacional

2.3.1 Biologia de Sistemas

Partindo do pressuposto que há interação entre itens de um sistema, a BS surgiu com o intuito de compreender os sistemas complexos na biologia (ZOU; LAUBICHLER, 2018; IDEKER; GALITSKI; HOOD, 2001). Pautada pela teoria geral de sistemas, seu objetivo é estudar e entender a organização de fenômenos por meio de princípios comuns dos elementos específicos envolvidos nesses fenômenos (ZOU; LAUBICHLER, 2018; IDEKER; GALITSKI; HOOD, 2001). A ascensão da era das “ômicas” contribuiu diretamente para o crescimento da BS e com estonteantes números de dados sendo produzidos, houveram novas possibilidades para estes estudos sistemáticos e de integração de dados biológicos (POLONI *et al.*, 2014).

Para o processo de integração, a BS utiliza de artifícios como a montagem de redes de interação (POLONI *et al.*, 2014). Essas redes, ou *networks*, são formadas por nós (vértices) e conectores (arestas), e, elas são construídas com base na primária teoria de grafos. Com base na teoria, as redes podem conter conectores unidirecionais (rede direcionada) ou conectores não direcionais (rede não direcionada), como é demonstrado na **Figura 6**. A conformação de uma rede pode se expandir por diversos tipos, tendo sua aplicabilidade dependente da análise a ser desenvolvida (POLONI *et al.*, 2014). Esses princípios matemáticos são uma espécie de “fôrma”, onde colocam os dados biológicos provenientes de técnicas experimentais, a fim de torná-los uma conformação de rede (KITANO, 2002a; KITANO, 2002b).

Figura 6 - Modelo de rede de interação.



Fonte: os autores, 2022.

Rede de interação não direcional com 6 vértices e 8 arestas. As setas vermelhas apontam para as vértices e as setas cinzas para as arestas.

Ao analisar uma rede de interação, algumas características de topologia auxiliam no entendimento da representação gráfica e estatística do *network*. A modularidade, ou clusterização, é uma propriedade referente ao padrão de conectividade entre itens e funções distintas, que ocorrem de forma orgânica no meio biológico, onde será analisada a clusterização de um nó com os seus vizinhos. A ontologia gênica consiste na propriedade totalmente voltada para o produto e função que um determinado gene exerce em diferentes tipos de hierarquia: a nível celular, processo biológico e função molecular. Todas essas informações são armazenadas em forma de “anotações” com o intuito de alimentar banco de dados ontológicos. Na investigação do elemento mais importante da rede, é aplicada a propriedade da centralidade para nós (POLONI *et al.*, 2014).

Além da importância, outras informações são necessárias para análise, como a quantidade de nós conectados a outros nós, com um grande ou baixo volume de conexões. Esses nós com uma quantidade elevada de conexões são chamados de *hubs*. *Betweenness* e *closeness* compreendem propriedades acerca do número de caminhos que passam por um nó e a menor distância entre esses caminhos, respectivamente. O diâmetro corresponde a distância entre os nós mais

distantes da rede, auxiliando na análise de compactação. E por fim, a centralidade de conectores é baseada em cálculos de outras propriedades, como o *betweenness*, para analisar quais *hubs* com maior relevância na rede (POLONI *et al.*, 2014).

Na SB as redes de interação representam, em sua maioria, interações proteína-proteína, proteína-ácidos nucleicos, vias metabólicas, interação entre transcritos (mRNA-miRNA) e análises isoladas de ontologia gênica. No ramo bioquímico, é comum o uso de redes ponderadas de multigrafos (itens de classes diferentes) e redes de hipergrafos (cada sub grafo contendo itens de funções diferentes), principalmente para avaliação de interação proteína-proteína e de vias metabólicas de um ou mais sistemas biológicos (POLONI *et al.*, 2014).

2.3.2 Redes Biológicas

As proteínas são as moléculas em maior abundância em um ser vivo, especialmente, no ser humano. Essas cadeias ramificadas de aminoácidos possuem diversas funções na maquinaria celular, desde a catalização de uma reação (enzimas), transporte do oxigênio (hemoglobina e mioglobina), até a composição do sistema imune (imunoglobulinas). Para desempenhar seu papel funcional, as proteínas podem atuar sozinhas ou ligadas a outros elementos, sendo chamados de grupos prostéticos (NELSON; COX, 2014; ALBERTS *et al.*, 2017).

Reações básicas à homeostase de um organismo são exemplos naturais de interações proteína-proteína, como uma ligação enzima-substrato ou uma de antígeno-anticorpo. Nas redes de interação proteína-proteína, além dos nós representarem as proteínas e os conectores serem interações, deve-se levar em consideração: ligações temporárias ou permanentes; obrigatoriedade de funcionalidade conjunta ou não; e interface, tendo nas maiores interfaces uma mudança conformacional mais acentuada e apresentando interações permanentes. Ademais, componentes de formação e estabilização de proteínas como as ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, complementaridade esférica e força eletrostática, podem atuar diferenciando o tipo de conformação e disposição da rede de interação (POLONI *et al.*, 2014).

Os metabólitos são produtos de reações bioquímicas que se tornarão

substratos em reações subsequentes, formando assim uma grande reação em cadeia. Essas redes metabólicas podem ser classificadas como redes de fluxo, tendo em vista que variáveis de energia e massa podem ter valores distintos de acordo com cada nó. A disposição da rede pode ter metabólitos e reações sendo representados tanto como nós, como arestas ou como ambos sendo representados ao mesmo tempo, como ocorre em grafos bipartidos. De modo geral, redes metabólicas apresentam conexões menos coesas em estruturas hierárquicas maiores, e mais coesas em módulos hierárquicos menores (BRANDÃO, 2020).

2.3.3 Bancos de Dados

2.3.3.1 Bancos de dados genômicos e transcriptômicos

A genômica avalia os genomas, destacando a interação entre os genes e o meio ambiente, além da função e estrutura gênica. A transcriptômica é o estudo do transcriptoma, ou seja, do conjunto completo de todas as moléculas de RNA expressa em uma célula, tecido ou organismo. Uma das possibilidades para avaliação do genoma e de transcritos é a utilização de bases de dados (POLONI *et al.*, 2014).

O *miRBase* é uma base de dados amplamente utilizada para verificação da fita do miRNA, ou seja, se tanto a 3p quanto a 5p são atuantes e para predição de genes alvos para miRNA. O *miRBase* atua com uma atribuição de valores de P a locais de ligação de miRNA e seu alvo, priorizando aqueles que foram conservados ao decorrer da evolução de diferentes espécies. Para isto, são usados modelos estatísticos. Já na predição de genes-alvos, é utilizado o algoritmo do *miRanda*, buscando resultados de predição em outros bancos de dados de vertente semelhante. O resultado será um redirecionamento para esses outros bancos de dados, já com o resultado da predição. Os bancos que aparecem com mais frequência para esse redirecionamento são o *miRDB* e *TargetScan* (KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2018).

O *Targetexplorer* é outro exemplo de banco de dados que pode ser utilizado para predição de genes-alvos para miRNAs e visualização de vias metabólicas. O *Targetexplorer* contém informações de bibliotecas genômicas que

são selecionadas a partir de uma expressão matemática. O programa *Patser* é utilizado para avaliar e pontuar, com base em estatística, os locais de ligação no DNA (gene) (SOSINSKY, 2003).

O banco de dados *Tarbase v.8* pode ser aplicado para predição de genes-alvos para miRNA. O *Tarbase v.8* realiza a análise a partir de cálculos estatísticos e inferência baseados em pipeline de linguagem R, após o processamento de dados experimentais que alimentam a base de dados (KARAGKOUNI *et al.*, 2017).

A base de dados *miRTargetLink 2.0* é utilizada para predição de genes-alvos para miRNAs a partir de gráficos de interação e análise de enriquecimento funcional. Faz o processamento utilizando dados de miRNAs e genes-alvos de outros seis bancos de dados (*miRBase*, *miRTarBase*, *mirDIP*, *miRDB*, *miRATBase* e *miRPathDB*), e as ferramentas *miEAA* e *GeneTrail* para as análises de enriquecimento (KERN *et al.*, 2021).

2.3.3.2 Bancos de dados para redes de interação

Com a possibilidade de manejar dados próprios e em larga escala de interactomas e outras ômicas, os bancos de dados e plataformas *online* para construção de redes de interação, trazem uma nova possibilidade para interpretação desses dados, por intermédio de redes.

A formação de redes de interação física, co-expressão, predição, interação genética, co-localização, vias metabólicas e de compartilhamento de domínios proteicos, podem ser então as quais são escolhidas de acordo com as necessidades de uma pesquisa. O algoritmo usa métodos de ponderação por consulta de genes para inferência dessas redes (WARDE-FARLEY *et al.*, 2010).

Trabalhando com dados mais amplos, de genômica, proteômica e metabolômica, a inferência das redes de interação na plataforma *GeneMANIA* é realizada seguindo as informações disponíveis: dados de co-expressão do *Gene Expression Omnibus (GEO)*, interação física e genética do *BioGRID*, interação protéica baseada em ontologia do I2D, dados de interação e vias metabólicas do *Pathway Commons*, *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*, *Human Protein*

Reference Databases, HumanCyc, MINT, Reactome, Systems Biology Center New York IntcAt e NCI-Nature Pathway Interaction Database (WARDE-FARLEY et al., 2010).

O *STRING* é um banco de dados que tem como produto inferências de redes de interação proteína-proteína, utilizando todos os parâmetros de associação disponibilizados pela plataforma, gerando um *score* de interação. A seleção de proteínas mais relevantes no *network* é realizada com base na quantidade de parâmetros (**Tabela 1**) em que elas se repetem, dando prioridade a presença no parâmetro de dados experimentais, contando como uma espécie de validação (SZKLARCZYK et al., 2020).

Tabela 1 - Parâmetros de inferência de rede no *STRING* (continua).

Parâmetro	Aplicação	Local de coleta de dados	Cor representativa das arestas
Vizinhança	Pontuação de <i>score</i> atrelada à proximidade dos genes no mesmo cromossomo, calculada em cima dos nucleotídeos não codificantes entre as <i>open reading frames</i> (ORFs)	Associação computacional de comparações de genoma completo disponível.	Verde
Fusão	O algoritmo busca por ORFs que pareçam ser oriundas de fusão de genes. A pontuação é proporcional ao evento de fusão	Associação computacional de comparações de genoma completo disponível	Laranja
Co-ocorrência	O algoritmo busca por pares de genes que ao longo da evolução apresentaram alguma semelhança. Essa semelhança pode acontecer por transferência, duplicação ou simplesmente, genes perdidos	Associação computacional de comparações de genoma completo disponível.	Azul marinho
Co-expressão	Evidências de expressão gênica são pesquisadas em diferentes fontes e comparadas pelo algoritmo	Experimentos de genômica funcional e ensaios laboratoriais. Os dados são baseados em RNA, mas também, são adicionados os de expressão de proteoma pelo <i>ProteomeHD</i> .	Preto

Tabela 1 - Parâmetros de inferência de rede no *STRING* (concluída).

Parâmetro	Aplicação	Local de coleta de dados	Cor representativa das arestas
Dados experimentais	São coletados e reunidos dados de interação proteína-proteína de experimentos laboratoriais do espectro biofísico, bioquímico e genético	Experimentos de genômica funcional e ensaios laboratoriais. Os dados são importados de bancos de dados e realizada a curadoria por iMEX e <i>BioGRID</i>	Rosa
Associação em bancos de dados de vias	Analisa evidências de associação com curadoria manual	Anotações realizadas no <i>KEGG, Reactome, MetaCyc, EBI Portal Complex</i> e <i>Gene Ontology Consortium</i>	Azul
Associação em literatura	Analisa menções das proteínas juntas no mesmo <i>abstract</i> e artigos científicos. O cálculo é feito baseado na proximidade dessas menções, se é na mesma frase, parágrafo ou artigo	Menções no <i>PubMed, PMC, OMIM</i> e <i>SGD</i>	Amarela

Fonte: adaptado de SZKLARCZYK *et al.*, 2022.

Os dados são constantemente atualizados e coletados de outros algoritmos de bancos de dados, sendo os mais recorrentes o *FunCoup, GeneMANIA, IMP, IID, HumanNet, HumanBase/GIANT* e *Consensus PathDB*. Ademais, O *STRING* também proporciona análise de dados de enriquecimento funcional e ontologia gênica (SZKLARCZYK *et al.*, 2020).

2.3.3.3 Banco de dados metabolômicos

A metabolômica, é o estudo do conjunto de metabólitos (produto do metabolismo de uma determinada molécula ou substância) de um determinado sistema biológico. A utilização de bancos de dados metabolômicos, dessa forma, é importante para entender o impacto de um produto transcricional ou traducional, a partir da sua função molecular e seu papel celular.

O *Metascape* é um banco que proporciona dados organizados, principalmente, em formatos de gráficos de barra, *Circus plot* e redes de interação. Podendo ser utilizado, também, para análises de enriquecimento funcional e ontologia gênica. O *Metascape* utiliza pesquisas em mais de 20 bancos de dados genômicos, proteômicos e metabolômicos para suas análises (ZHOU *et al.*, 2019).

As análises de enriquecimento funcional realizadas no banco de dados, podem ser aplicadas de modo complementar às análises do *Metascape*. O algoritmo utiliza o *PARADIGMA*, que é capaz de integrar dados genômicos. Além da possibilidade de escolha, no próprio banco, de diferentes algoritmos conforme a necessidade do estudo (GRISS *et al.*, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Aplicar a biologia de sistemas para determinar o papel dos miRNAs, genes-alvos, e vias metabólicas que atuam integradamente no desenvolvimento das fases aguda e crônica da Febre Chikungunya

3.1 Objetivos específicos

- Selecionar os miRNAs associados com a fisiopatologia da Febre Chikungunya.
- Selecionar os genes-alvos associados aos miRNAs envolvidos na fisiopatologia da Febre Chikungunya.
- Identificar as redes de interação oriundas desses genes-alvos e suas respectivas proteínas.
- Identificar as vias metabólicas dos genes-alvos e relacioná-las com as fases aguda e crônica da febre Chikungunya.
- Analisar a ontologia dos genes-alvos escolhidos na fisiopatologia da Febre Chikungunya nas fases aguda e crônica.

4 METODOLOGIA

4.1 Busca Bibliográfica

Realizou-se pesquisa em plataformas e repositórios de artigos científicos, a fim de fazer um levantamento dos miRNAs já descritos em literatura relacionados aos arbovírus mais circulantes no Brasil: DENV, ZIKV, CHIKV. Foram escolhidas as seguintes plataformas: *PubMed* (<http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), *ScienceDirect* (<http://sciencedirect.com>), *SciELO* (<http://scielo.org>) e *Cochrane Library* (<http://cochranelibrary.com>), aplicando os descritores em inglês "CHIKV AND miRNA", "Chikungunya AND miRNA", "Chikungunya AND epigenetics", "CHIKV AND epigenetics", "DENV AND miRNA", "Dengue AND miRNA", "Dengue AND epigenetics", "DENV AND epigenetics", "ZIKV AND miRNA", "Zika AND miRNA", "Zika AND epigenetics" e "ZIKV AND epigenetics".

Para a primeira etapa de análise do estudo, foram considerados elegíveis os artigos de miRNAs que utilizavam metodologias experimentais *in vitro* (cultura de células humana ou animal rato ou camundongo) e *in vivo* (modelo animal rato e camundongo, e amostra biológica humana). Artigos *in silico* (bioinformática e biologia computacional) só foram incluídos quando possuíam validação experimental e artigos de revisão focados em miRNAs humanos. Para a segunda etapa de análise, permaneceram os artigos que continham informações de miRNAs humanos na infecção por CHIKV e apresentavam modelo experimental com amostra biológica humana. Foram excluídos artigos de revisão, análises de bioinformática e biologia computacional e os que possuíam metodologia unicamente de modelo animal.

4.2 Base de Dados

Foram utilizados base de dados de genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, disponibilizadas gratuitamente de forma *online*, para seleção de miRNAs, identificação dos seus *targets* e acessar informações de sequência, estrutura e interações sobre estas moléculas. Esses repositórios passaram por processo de curadoria manual e computacional, proporcionando uma constante e

confiável atualização dos seus dados.

4.2.1 Seleção de miRNA

Os miRNAs foram selecionados com base nos artigos, e posteriormente, aplicado os seguintes filtros de exclusão: sem informações sobre a fita (3p/5p), presente simultaneamente nas infecções de ZIKV e DENV e, por fim, os que estavam registrados em todas as bases de dados escolhidas para esta seleção de genes-alvos.

4.2.2 Seleção dos genes-alvos

Os miRNAs selecionados foram submetidos em quatro bases de dados para busca dos genes-alvos, sendo elas *miRBase* (*miRDB* e *TargetScan*), *Targetexplorer*, *Tarbase v.8* e *miRTargetLink 2.0*. Foi feito *download* dos resultados do *miRTargetLink 2.0* e *TargetScan* em formato *xlsx*. Para as outras bases de predição, a importação dos dados aconteceu de forma manual, para planilhas em formato *xlsx* também.

Após essa etapa, os genes-alvos passaram por um processo de filtragem, foram utilizadas fórmulas de filtro do excel para retirada dos repetidos intra-base de dados. O intuito desse processo foi encontrar os dados mais fidedignos possíveis, acerca dos números de genes-alvos nas bases de dados.

4.2.3 Determinação das Redes de Interação

O *GeneMANIA* foi utilizado para determinação de redes de interação de genes entre os genes-alvos selecionados, posteriormente determinados utilizando no input o critério de interação entre 55 vértices. Obtivemos redes de interações genômicas (co-expressão, interação genética, predição), proteica (interação física, compartilhamento de domínios proteicos, co-localização) e metabólica (vias moleculares).

A inferência da rede de interação proteína-proteína foi formada no *STRING*, também, com 55 vértices para as 5 proteínas escolhidas e com 20 vértices para cada uma delas separadamente, com critérios de parâmetros disponibilizados pela plataforma.

4.2.4 Análises de Enriquecimento Funcional e Ontologia Gênica

As análises de enriquecimento funcional e ontologia foram realizadas de modo complementar, simultaneamente, nas bases de dados *Metascape* e *Reactome*.

No *Metascape*, para a análise de ontologia e enriquecimento, realizou pesquisa no *KEGG*, *GeneOntology*, *MSigDB*, o próprio *Reactome*, entre outros. Os dados utilizados no *input* foram oriundos das redes de interação inferidas no *STRING*. Para a análise de interação proteína-proteína, os bancos de dados utilizados são *BioGrid*, *InWeb_IM55* e *OminiPath*, contudo, não usufruímos desses dados do *Metascape* para a finalidade do projeto.

Nas análises de enriquecimento e ontologia realizadas pelo *Metascape*, foi aplicado o teste hipergeométrico e o algoritmo de *Benjamini-Hochberg*, disponibilizados e realizados pela própria plataforma, para correção do valor de p . Realizado o agrupamento de termos enriquecidos, de forma não redundante, as semelhanças entre os pares foram calculadas pela pontuação do teste *Kappa*. O menor valor de p , equivalente ao termo mais significativo de cada cluster, foi escolhido para representá-lo no gráfico em barras.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção de miRNAs

As buscas nas plataformas PubMed e Science Direct resultaram em 51 artigos que foram elegíveis para seleção de miRNAs. Na plataforma *SciElo* os resultados foram de apenas quatro artigos, sendo dois para Dengue e dois para Zika vírus, que não foram elegíveis por não apresentarem os critérios de exclusão. A *Cochrane Library* não apresentou nenhum artigo com os referidos descritores.

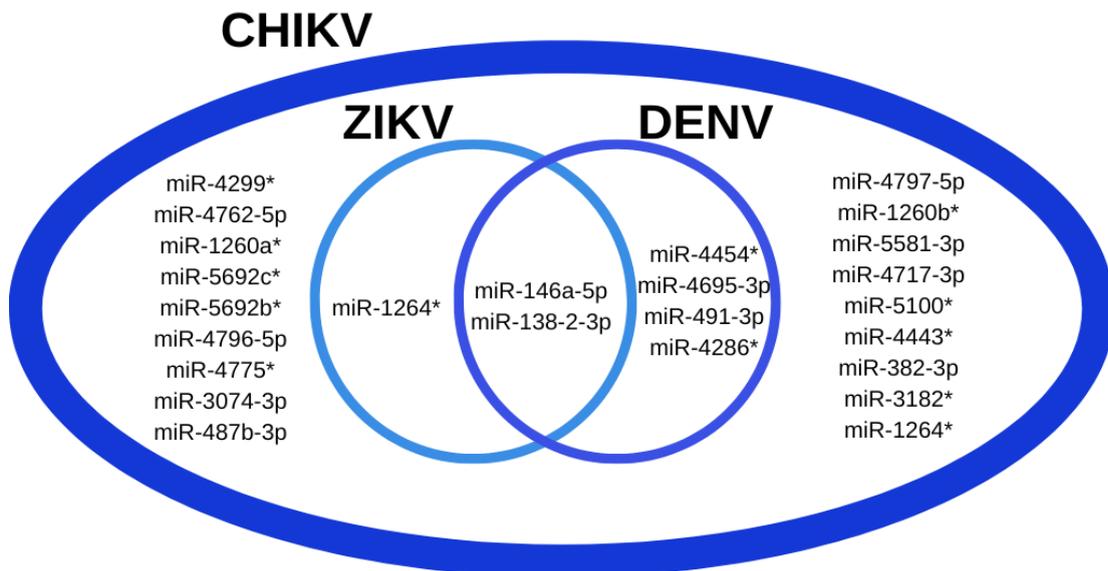
Tabela 2 - Tabela de artigos encontrados nas plataformas de pesquisa utilizando os respectivos descritores.

Descritores	PubMed	Science Direct	Selecionados
CHIKV AND miRNA	17	113	7
Chikungunya AND miRNA	33	250	0
Chikungunya AND epigenetics	5	225	0
CHIKV AND epigenetics	2	63	0
DENV AND miRNA	74	288	27
Dengue AND miRNA	148	814	7
Dengue AND epigenetics	22	685	0
DENV AND epigenetics	7	153	0
ZIKV AND miRNA	61	184	10
Zika AND miRNA	67	481	0
Zika AND epigenetics	31	574	0
ZIKV AND epigenetics	29	152	0
Total	496	3982	51

Fonte: os autores, 2022.

Após a aplicação dos critérios da segunda etapa da seleção de artigos, apenas quatro sobre miRNA e CHIKV foram selecionados para leitura. A metodologia dos artigos incluía cultura de células de fibroblasto sinovial humano, e técnicas como miRNA assay, RT-PCR e RT-qPCR para experimentação de bancada. Dois artigos aplicavam os dados obtidos pelos experimentos para realizar análises de bioinformática, predição de genes-alvos e montagem de redes de interação. Desta forma, a partir de destes artigos, foram selecionados 24 miRNAs humanos *upregulated* na infecção por CHIKV (**Figura 7**). Dentre os miRNAs selecionados quatro (hsa-miR-4454*, hsa-miR-4695-3p, hsa-miR-491-3p e hsa-miR-4286*) estavam presentes na infecção por DENV, dois deles também na infecção por ZIKV (hsa-miR-146a-5p e hsa-miR-138-2-3p), e um simultâneo para ZIKV e CHIKV (hsa-miR-1264*).

Figura 7 - Diagrama de Venn dos miRNAs contendo três conjuntos representativos para as arboviroses.



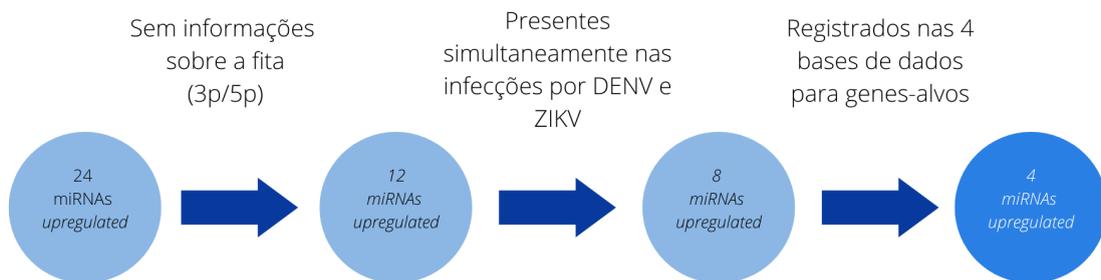
Fonte: os autores, 2022.

Os asteriscos representam aqueles miRNAs que não tinham informações sobre sua fita, 3p ou 5p.

Dentre 24 os miRNAs selecionados, doze foram excluídos, pois não possuíam informações sobre qual das fitas se liga ao mRNA (3p ou 5p). Além

destes, outros quatro miRNAs sofreram exclusão por estarem presentes simultaneamente nas infecções por DENV e ZIKV, independente da sua concentração estimada, tendo em vista que o propósito do trabalho é identificar miRNAs exclusivos da infecção por CHIKV. Para a etapa de seleção de genes-alvos, os oito miRNAs restantes passaram por mais uma filtragem, onde o critério era a presença simultânea nas bases de dados *miRBase*, *Targetexplorer*, *Tarbase v.8* e *miRTargetLink 2.0*. Ao final, quatro miRNAs foram selecionados para a identificação e listagem dos seus alvos: hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-5581-3p e hsa-miR-382-3p. O esquema de seleção desses miRNAs está resumido na **Figura 8**.

Figura 8 - Etapas de filtragem dos miRNAs com critérios de exclusão.
Fonte: os autores, 2022.



5.2 Seleção de Genes-alvos

A partir dos quatro miRNAs selecionados, foram avaliados os genes-alvos listados em quatro bases de dados diferentes. Ao total foram identificados 10.852 genes-alvos, sendo 4.023 para o miRNA-3074-3p, 271 para o miRNA-487b-3p; 5.321 para o miRNA-5581-3p; e 1.237 para o miRNA-382-3p. Vale ressaltar que o *miRBase* realiza o levantamento de informações e seus resultados englobam outras bases para genes-alvos como o *miRBase*, *miRDB* e *TargetScan*, além do *Targetexplorer*, *Tarbase v.8* e *miRTargetLink 2.0*. A quantidade de genes-alvo encontrados em cada base de dados está descrita na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Tabela descritiva da quantidade de genes-alvos encontrados em cada banco de dados.

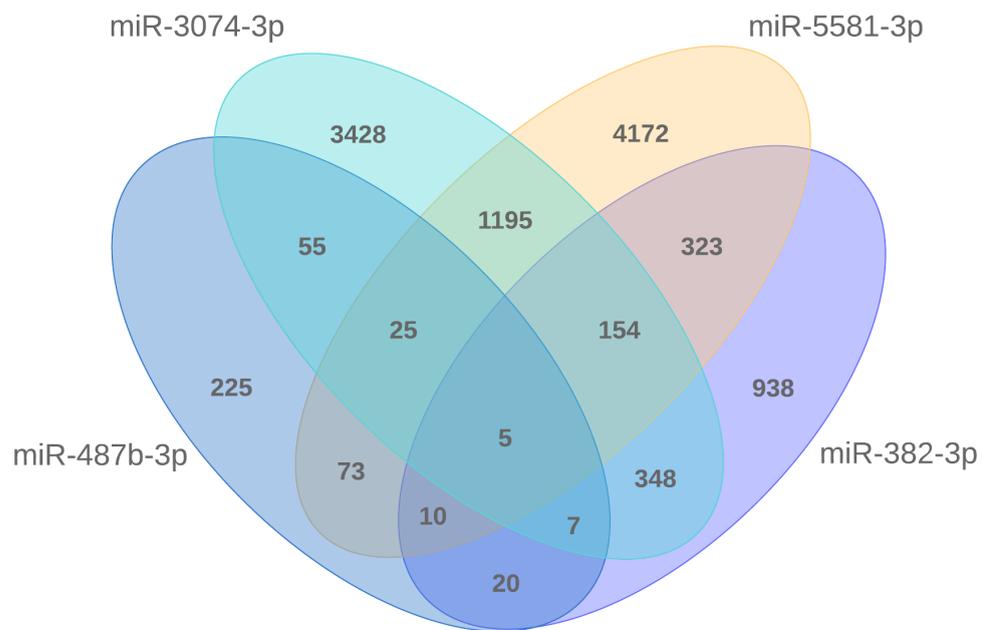
miRNA	miRDB	TargetScan	Targetexplorer	Tarbase v.8	miRTargetLink 2.0
hsa-miR-3074-3p	422	3378	160	4	59
hsa-miR-487b-3p	31	16	154	50	20
hsa-miR-5581-3p	487	3952	592	235	55
hsa-miR-382-3p	501	270	338	47	81

Fonte: os autores, 2022.

Após a montagem de uma base de dados local com os dados obtidos nas cinco bases citadas, foi realizada uma análise de redundância de genes-alvos entre as bases. Primeiro, excluímos os genes-alvos duplicados entre as bases de dados, em sequência, marcamos os genes-alvos repetidos entre os quatro miRNAs escolhidos para o estudo, e por fim, selecionamos os genes-alvos em comum entre os quatro miRNAs.

O final da etapa culminou na seleção de 5 genes-alvos para as análises de enriquecimento funcional, redes de interação e ontologia gênica: *AIFM1*, *CPEB4*, *DIO2*, *MEI4* e *XKR4*. A **Figura 9** mostra o número de genes-alvos em comum entre os quatro miRNAs selecionados.

Figura 9 - Diagrama de Venn da seleção e intersecção entre os genes-alvos, contendo 4 principais conjuntos.



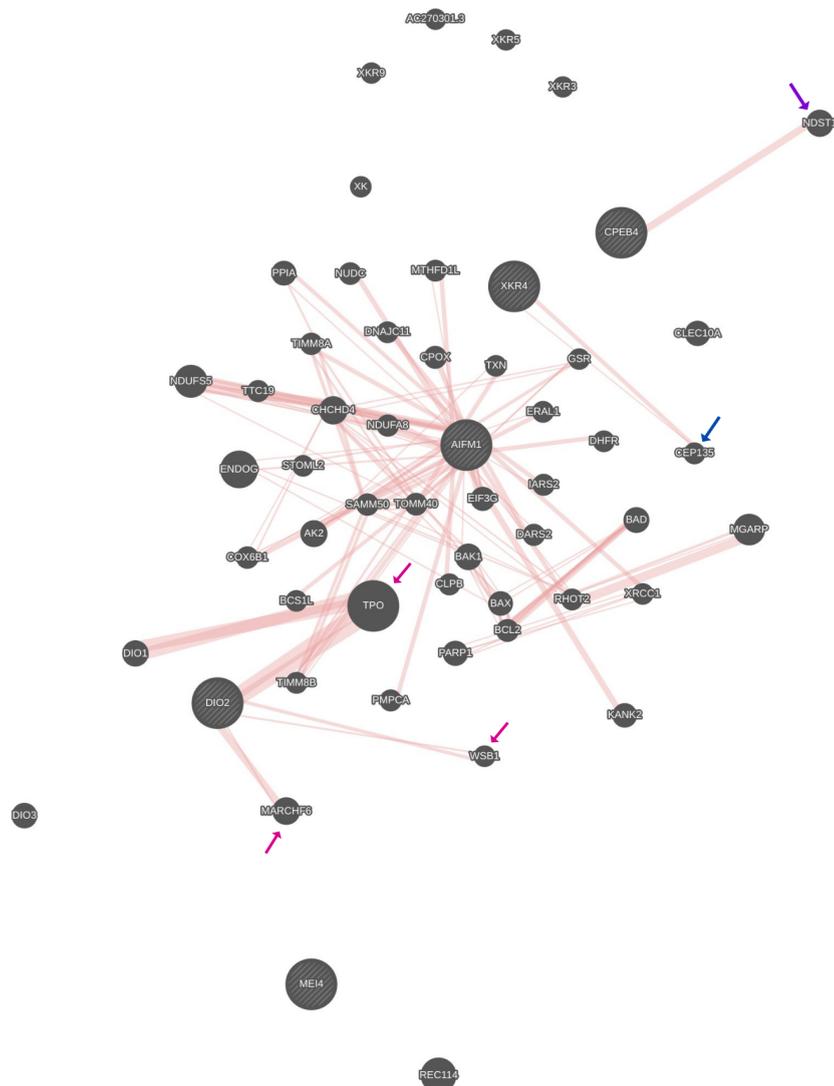
Fonte: os autores, 2022.

5.3 Análise de Redes de interação

Uma análise geral da rede de interação entre os genes-alvos *AIFM1*, *CPEB4*, *DIO2*, *MEI4* e *XKR4*, foi obtida utilizando o *GeneMANIA* (**Figura 10**). Não foi encontrada interação direta entre *AIFM1* e *DIO2*, *CPEB4* ou *XKR4*. Contudo, os genes interagem indiretamente por meio de vértices comuns. O *XKR4* e o *AIFM1* interagem indiretamente por meio do *TXN*, *BAK1*, *ENDOG*, *BAD*, *PARP1* e *METHFD1L* (setas em azul). O *CPEB4* e *AIFM1* interagem indiretamente por meio do *TIMM8A*, *CPOX*, *MGARP* e *NDUFA8* (setas em roxo). O *DIO2* e *XKR4* interagem indiretamente através do *TPO* (seta em verde), e o *DIO2* também interage indiretamente com *AIFM1* por meio do *TTC19* e *BCL2* (setas em rosa). E por fim,

Considerando a rede de interações físicas, não foram encontradas interações simultâneas entre os 5 genes alvos da pesquisa (**Figura 11**). No entanto, o gene *AIFM1* interage fisicamente com 36 moléculas, enquanto que o *CPEB4* e *XKR4* interagem com uma molécula cada, *NDST1* (seta em roxo) e *CEP135* (seta em azul), respectivamente, e o *DIO2* com três moléculas: *TPO*, *WSB1* e *MARCHF6* (setas em rosa). O gene *MEI4* não apresentou interação física com os demais genes.

Figura 11 - Rede de interação física contendo 55 vértices.

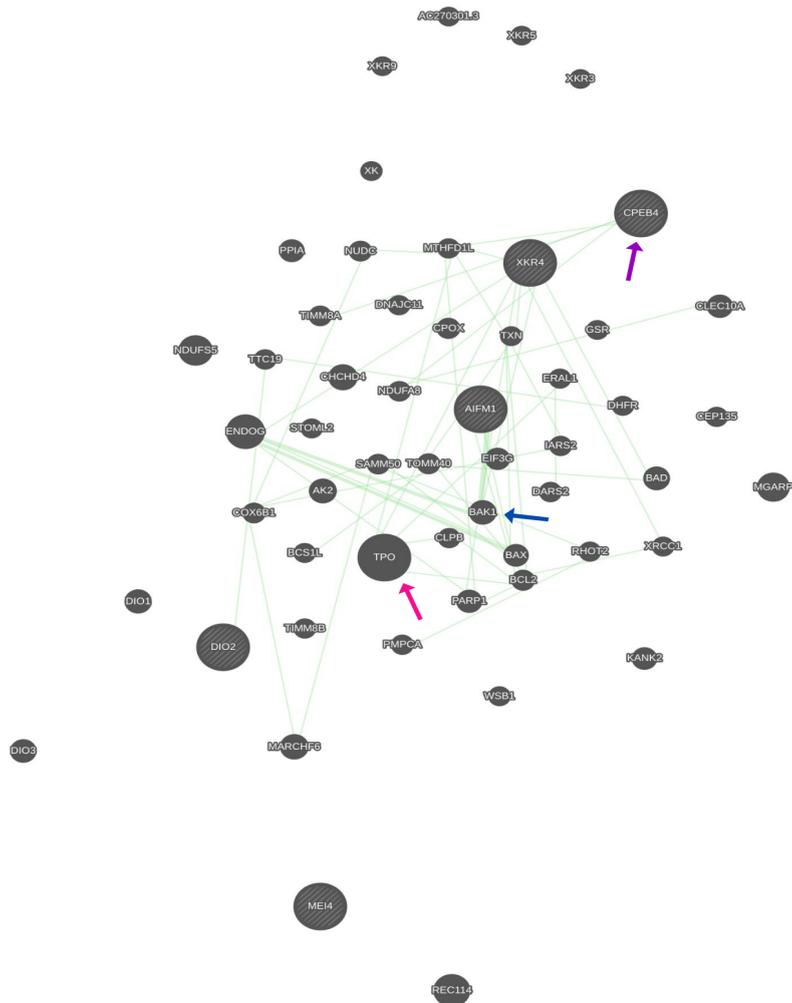


Fonte: os autores, 2022.

Na figura podemos ver o *AIFM1* com a maior parte das interações físicas, seguido do *DIO2*. *CPEB4* e *XKR4*. O *DIO2* interage principalmente com a *TPO*, que assim como ele, está envolvido com metabolismo de hormônios tireoidianos.

Em relação à rede de interações genéticas, existe uma interação entre os genes *CPEB4* e *XKR4* (seta em roxo). O gene *BAK1* (seta em, antagonista do *BCL2*, é o elo indireto da interação entre os genes *AIFM1* e *XKR4* (**Figura 12**). O gene *XKR4* interage com o gene da *TPO*, o qual tem sua proteína TPO, interagindo fisicamente com a *DIO2*. A TPO é uma proteína do metabolismo de hormônios tireoidianos, assim como a *DIO2*. Repetindo o padrão, o *MEI4* não apresentou interação gênica com nenhum outro gene da rede.

Figura 12 - Rede de interação gênica contendo 55 vértices.

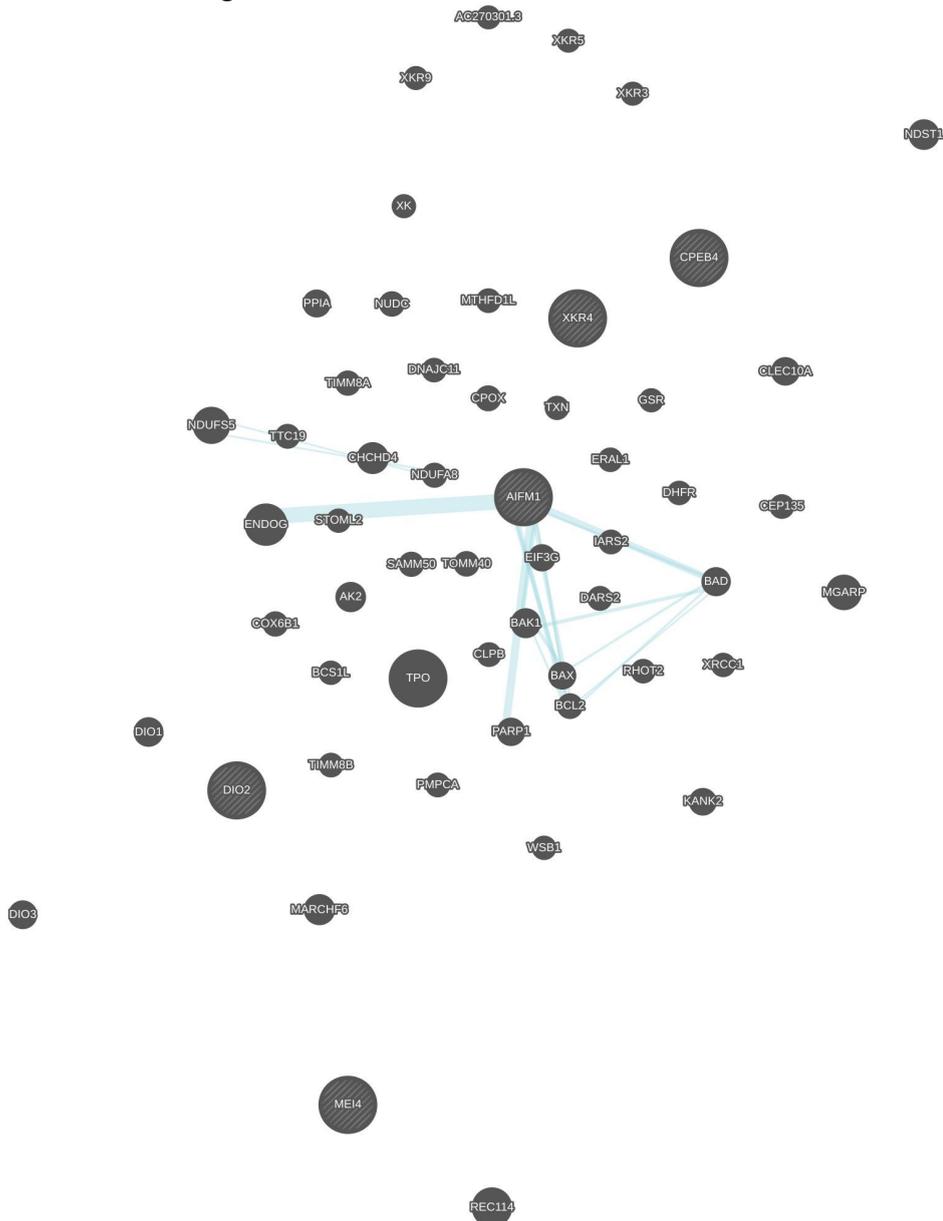


Fonte: os autores, 2022.

Na figura podemos observar a interação entre os genes *TPO* e *XKR4*. O gene *BAK1* serve como elo de ligação de interação entre *AIFM1* e *XKR4*. Também observamos a interação direta entre *CPEB4* e *XKR4*.

Em relação à interação das vias, segundo os resultados no *GeneMANIA*, o gene *AIFM1* é a única com interações entre suas vias moleculares (**Figura 13**).

Figura 13 - Rede de vias contendo 55 vértices.

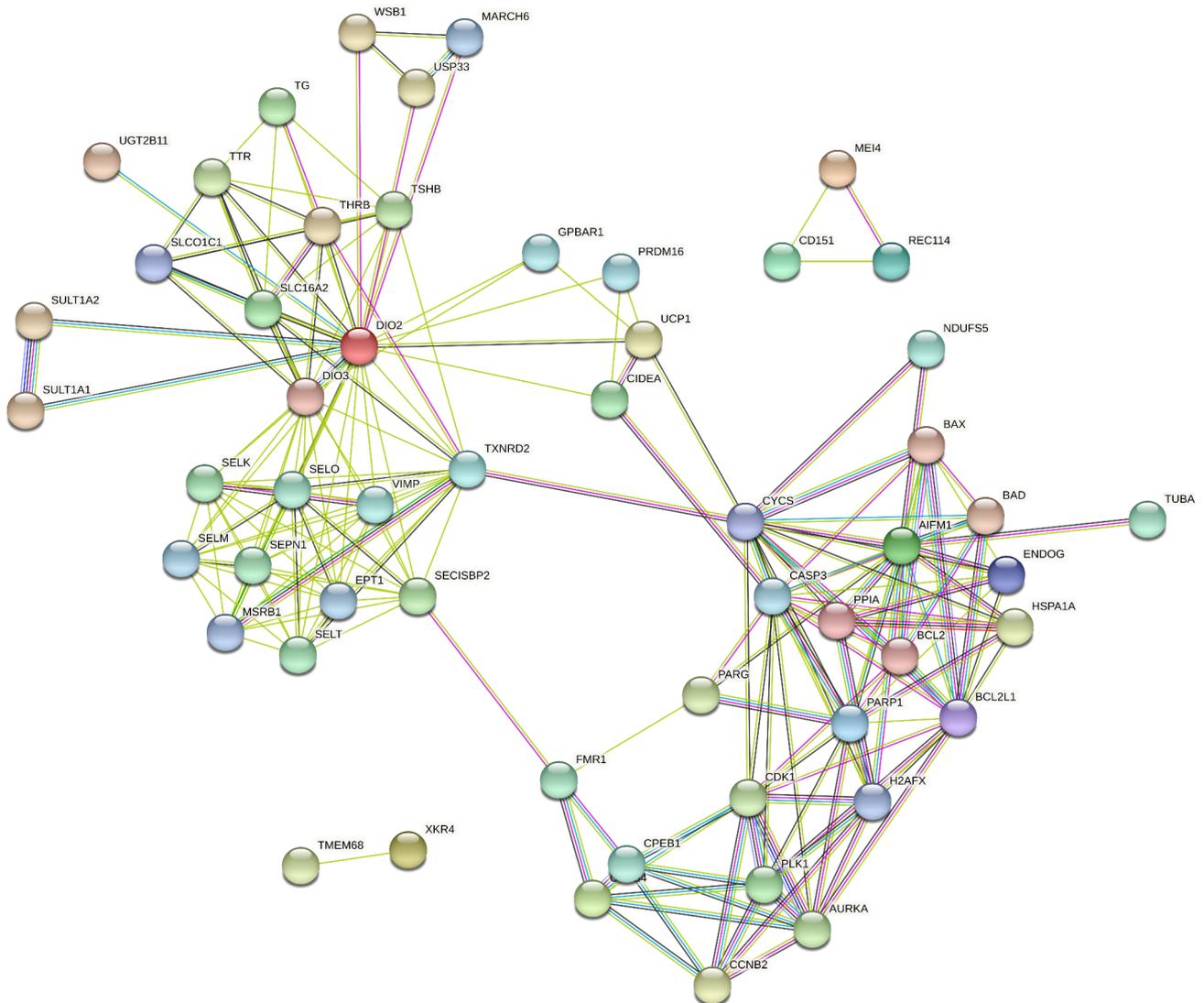


Fonte: os autores, 2022.

Na figura observamos quase nenhuma correlação entre as interações das vias moleculares dos genes-alvos, segundo os dados obtidos pelo *GeneMANIA*.

Em relação à análise de interações entre proteínas no *STRING*, não foram encontradas interações diretas entre as proteínas MEI4, XKR4, DIO2, AIFM1 e CPEB4 (**Figura 14**). As análises mostraram as proteínas MEI4 e XKR4 isoladas, sem quaisquer interações com as proteínas DIO2, AIFM1 e CPEB4.

Figura 14 - Rede de interação entre as 5 proteínas, constituída por 55 vértices construída pelo *STRING*.



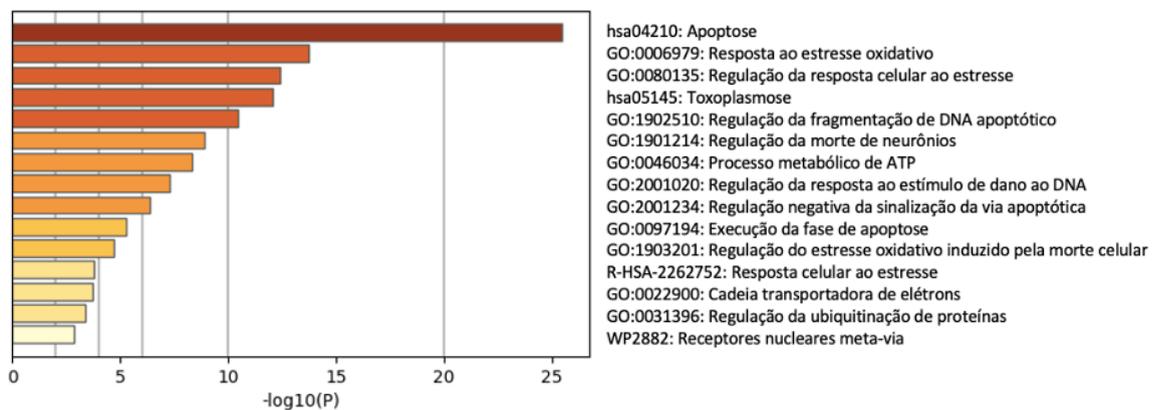
Fonte: os autores, 2022.

Na figura vemos a ausência de correlação de interação entre as proteínas provenientes da tradução dos genes-alvos de escolha do trabalho.

5.4 Análise de enriquecimento funcional e Ontologia gênica

A proteína citosólica AIFM1 está presente em sinalizações de resposta ao estresse oxidativo. Além disso, a AIFM1 está presente no transporte de elétrons na síntese de ATP e na apoptose por infecção viral. A proteína participa ativamente, e interage com moléculas em processos de programação de destruição celular e de resposta ao estresse oxidativo (**Figura 15**).

Figura 15 - Gráfico em barra de enriquecimento funcional da rede da AIFM1.

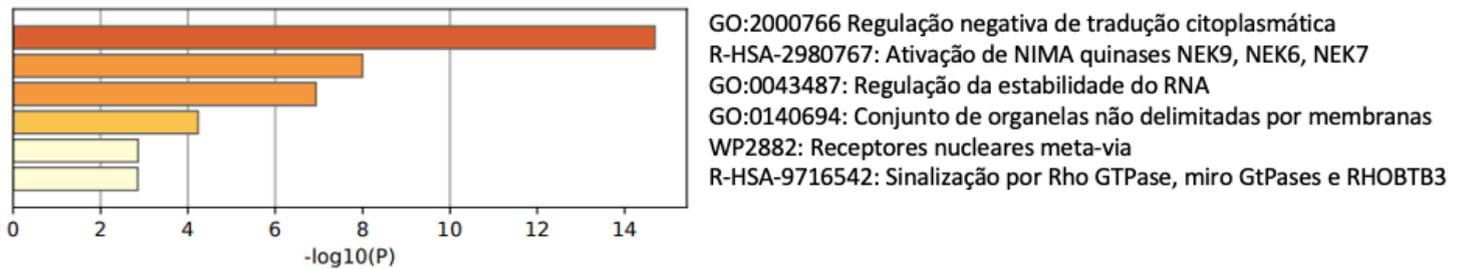


Fonte: os autores, 2022.

No gráfico observamos a alta atividade da proteína em processos apoptóticos e, em repetidas vezes, as respostas ao estresse oxidativo.

O principal papel da proteína citosólica CPEB4 e das proteínas que ela interage é atuar ativamente em processos de estabilização de enzimas citoplasmáticas (**Figura 16**). Além disso, a CPEB4 também participa do processo metabólico de hormônio peptídeo insulina, atuando em clivagem, tal qual sua classe de carboxipeptidase, e na liberação de grânulos secretores de membrana.

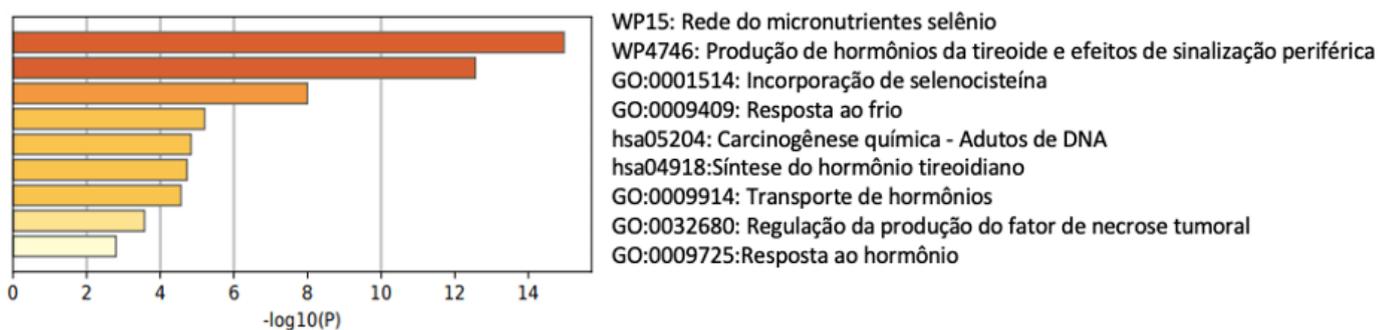
Figura 16 - Gráfico em barra de enriquecimento funcional da rede de CPEB4.



Fonte: os autores, 2022.

No caso da proteína intracelular citosólica, DIO2, tanto ela, quanto as suas interações proteína-proteína, participam ativamente do metabolismo de hormônios derivados de aminoácidos, especialmente os tireoidianos, na síntese, transporte e resposta hormonal periférica. Além desse processo, a DIO2 atua no metabolismo hepático do selênio e outros minerais (**Figura 17**).

Figura 17 - Gráfico em barra de enriquecimento funcional da rede do DIO2.



Fonte: os autores, 2022.

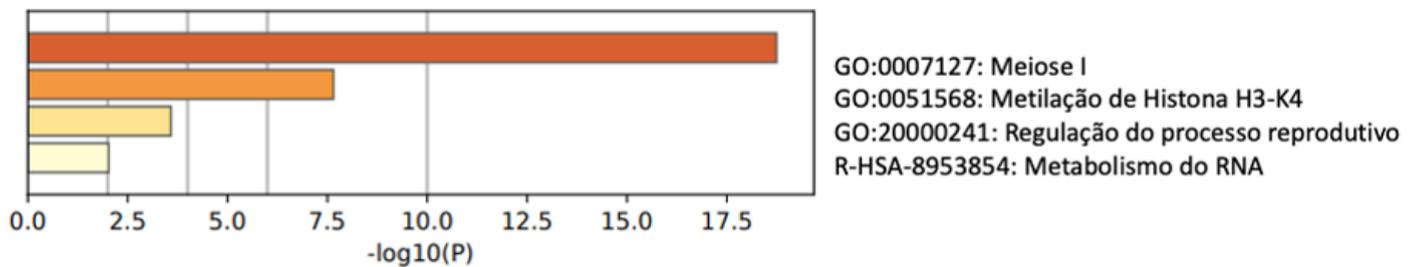
No gráfico vemos a massiva participação da proteína no metabolismo de hormônios tireoidianos e ligada ao metabolismo do selênio.

A análise da rede de interação da XKR4, proteína localizada na membrana plasmática, demonstrou sua presença em processos de proliferação celular,

contudo, não foram encontrados registros no *Reactome* dessa proteína e nem indicação de outras atuações funcionais no *Metascape*.

Assim como suas interações proteicas, a MEI4 é uma proteína de processos de divisão celular, altamente ativa em vias do processo reprodutivo (**Figura 18**). A MEI4 também tem uma porcentagem de atuação em metilação de outras proteínas e metabolismo transcrito, como também, nas vias de sinalização de Interleucinas e TNF.

Figura 18 - Gráfico em barra de enriquecimento funcional da rede da MEI4.



Fonte: os autores, 2022.

As interações das 5 proteínas remetem a eventos, em sua maioria, de metabolismo hepático, metabolismo de hormônios peptídeos, apoptose, resposta imunológica e mecanismos celulares de estresse oxidativo, como pode ser observado nas **Tabela 4**. A desregulação em cadeia dos processos listados, podem ser agravantes para um quadro infeccioso viral e uma evolução para doença reumática.

Tabela 4 - Tabela de enriquecimento funcional das 5 proteínas (continua).

GO	Categoria	Descrição	Contagem	%	Log ₁₀ (p)	Log ₁₀ (q)
WP15	WikiPathways	Rede de micronutriente selênio	11	20.00	-16.92	-12.57
WP4746	WikiPathways	Produção de hormônio tireoidiano e efeitos da sua sinalização periférica	10	18.18	-14.82	-10.77

Tabela 4 - Tabela de enriquecimento funcional das 5 proteínas (continua).

GO	Categoria	Descrição	Contagem	%	Log10(p)	Log10(q)
hsa04210	KEGG Pathway	Apoptose	10	18.18	-13.22	-9.41
GO:0006979	GO Biological Processes	Resposta ao estresse oxidativo	13	23.64	-13.06	-9.41
GO:2001242	GO Biological Processes	Regulação da via de sinalização apoptótica intrínseca	8	14.55	-9.06	-5.97
GO:1902510	GO Biological Processes	Regulação da fragmentação de DNA apoptótico	4	7.27	-8.69	-5.64
GO:0010035	GO Biological Processes	Resposta a substâncias inorgânicas	11	20.00	-8.66	-5.63
WP707	WikiPathways	Resposta a danos no DNA	6	10.91	-8.52	-5.53
GO:0043200	GO Biological Processes	Resposta aos aminoácidos	6	10.91	-7.11	-4.46
GO:0001514	GO Biological Processes	Incorporação de selenocisteína	3	5.45	-6.70	-4.18
GO:0010821	GO Biological Processes	Regulação da organização das mitocôndrias	6	10.91	-6.49	-4.01
GO:0070059	GO Biological Processes	Via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta ao estresse do retículo endoplasmático	4	7.27	-6.41	-3.95
GO:0009914	GO Biological Processes	Transporte hormonal	5	9.09	-6.31	-3.87
GO:0009410	GO Biological Processes	Resposta a estimulação de xenobióticos	8	14.55	-6.20	-3.78
GO:2001020	GO Biological Processes	Regulação da resposta ao estímulo de dano ao DNA	7	12.73	-5.85	-3.48

Tabela 4 - Tabela de enriquecimento funcional das 5 proteínas (concluída).

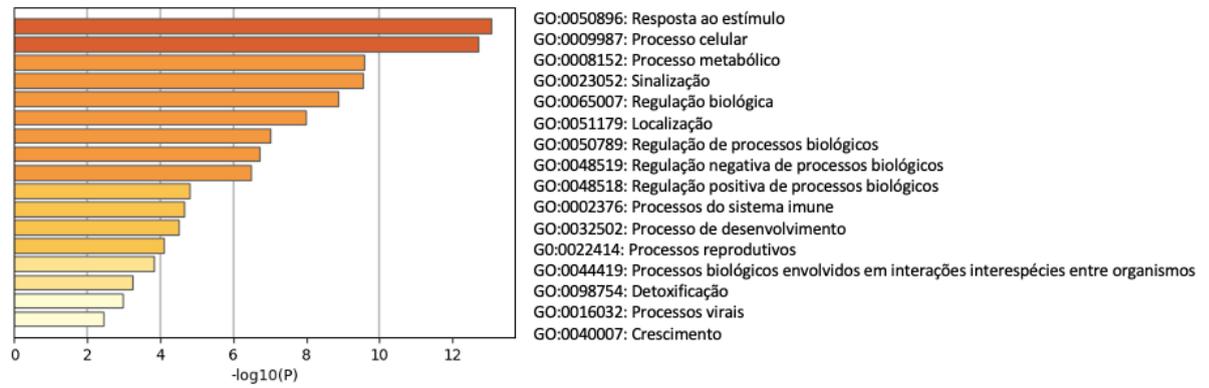
GO	Categoria	Descrição	Contagem	%	Log10(p)	Log10(q)
GO:0046034	GO Biological Processes	Processo metabólico do ATP	6	10.91	-5.66	-3.32
R-HSA-6804 114	Reactome Gene Sets	TP53 regula a transcrição de genes envolvidos na parada do ciclo celular G2	3	5.45	-5.34	-3.06
GO:0050873	GO Biological Processes	Diferenciação de células do tecido adiposo marrom	3	5.45	-4.65	-2.52
GO:0051098	GO Biological Processes	Regulação de binding	6	10.91	-4.27	-2.20
GO:0002931	GO Biological Processes	Resposta a isquemia	3	5.45	-3.88	-1.88

Fonte: os autores, 2022.

Os 20 principais clusters de análise com seus termos representativos enriquecidos (um por cluster). Contagem: é o número de genes nas listas de *input* com associação no termo de ontologia fornecido, além de acrescentadas a porcentagem de todos os genes do *input* que são encontrados nos termos de ontologia (somente genes de entrada com pelo menos uma anotação de termo de ontologia são incluídos no cálculo); Log10(P): é o valor p na base log 10; Log10(q): é o valor p ajustado multitestes na base log 10

Conforme mostra o gráfico de ontologia gênica gerado para as cinco proteínas (**Figura 19**), há envolvimento destas em regulação de processos biológicos, resposta ao estímulo, crescimento, sinalização, além de envolvimento em processos virais e do sistema imune. A soma desses eventos biológicos consiste em boa parte dos processos biológicos presentes num organismo vivo, destacando a abrangência da atuação das moléculas avaliadas neste estudo.

Figura 19 - Gráfico em barra de ontologia gênica da rede das 5 proteínas.



Fonte: os autores, 2022.

6 DISCUSSÃO

A determinação do papel dos miRNAs, genes-alvos, e vias metabólicas que atuam integradamente no desenvolvimento das fases aguda e crônica da febre chikungunya, ajuda na compreensão da doença e, conseqüentemente, a descoberta de potenciais alvos terapêuticos, para as fases da doença, onde em ambas, sua mais evidente característica é a forte artralgia, podendo evoluir para artrite crônica.

Alterações nas concentrações dos miRNAs hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-5581-3p e hsa-miR-382-3p em pacientes com febre chikungunya, pode levar a desequilíbrio bioquímico e interferir na resposta metabólica à doença. Os mRNA alvos desses fragmentos de RNA, são transcritos dos genes *AIFM1*, *CPEB4*, *DIO2*, *XKR4* e *MEI4*.

Estudos anteriores trazem o hsa-miR-487b-3p como um participante de processos ósseos (SHU *et al.*, 2021; YAYAMA *et al.*, 2018), com funções que podem variar desde processos de ossificação ectópica em algumas regiões da coluna vertebral a quadros de osteosarcomas (SHU *et al.*, 2021; YAYAMA *et al.*, 2018). Sua associação com alvos envolvidos com a via de sinalização WNT (receptores, inibidores, moléculas colaboradoras) é um forte indicativo do seu poder regulatório de proliferação celular (YAYAMA *et al.*, 2018). O desbalanço da proliferação de células ósseas e do metabolismo de osso é, também, uma das características observadas em pacientes com alguma artralgia ou artrite, além da inflamação articular propriamente dita (TATEIWA; YOSHIKAWA; KAITO, 2019).

Evidências também trazem os miRNAs encontrados nesse estudo para quadros de artrite reumatoide (AR). O papel do hsa-miR-5581-3p, apesar de ser pouco estudado até então, já demonstra participação na AR (YANG *et al.*, 2022). O *ITGB2* possui alguns eixos de interação com mRNA-miRNA-lncRNA, incluindo o miR-5581-3p. Esses “eixos regulatórios” atuam em vias de sinalização de quimiocinas, cruciais no desenvolvimento da artrite (YANG *et al.*, 2022). Na osteoartrite (OA), o miR-382-3p regula parte do estado inflamatório, por importantes vias de sinalização de TLR4, MyD88 e NF-κB, além de suprimir a expressão de PGE2, iNOS e NO, podendo diminuir, como efeito, o estresse oxidativo de condrócitos (LEI *et al.*, 2019).

Além das análises de bioinformática do presente estudo, foi relatada na literatura alta concentração e expressão dos miRNAs hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-5581-3p e hsa-miR-382-3p, em tecido sinovial humano durante a Febre Chikungunya (AGRAWAL *et al.*, 2020). O enriquecimento das vias metabólicas afetadas pela desregulação trouxe um padrão de vias diretamente ligadas com a resposta imunológica inata, como no caso da sinalização do TNF, do receptor Toll like e interleucinas 1 e 6 (AGRAWAL *et al.*, 2020).

Até o presente momento, não foram encontrados estudos sobre os genes *AIFM1*, *CPEB4*, *DIO2*, *XKR4* e *MEI4* na infecção por Chikungunya. Entretanto, esses genes estão envolvidos, de diferentes formas, em processos que podem contribuir para a inflamação aguda e crônica na Febre Chikungunya, e com isso, também poderiam contribuir para a fisiopatologia e sintomatologia da doença.

O *AIFM1* possui local de destaque no eixo NADPH oxidase/NAMPT/PARP, envolvido no controle de processos inflamatórios na pele (MARTÍNEZ-MORCILLO *et al.*, 2021). Outras funções do gene também podem corroborar com o processo inflamatório de diferentes doenças, como psoríase e osteoartrite, por diferentes eixos de sinalização intracelular (MARTÍNEZ-MORCILLO *et al.*, 2021; LI; CHENG; & LIU, 2020). A atuação já conhecida nesses processos pode sugerir que o *AIFM1* detenha uma funcionalidade ativa em processos auto inflamatórios e reumáticos, sendo sugestiva uma investigação para seu papel na artrite crônica por CHIKV.

Os estímulos para um quadro inflamatório na chikungunya podem persistir por meses ou anos, dando forma a fase de inflamação crônica (SILVA; DERMODY, 2017). Para desenvolvimento e manutenção do estado de cronicidade é necessária a mobilização de algumas células (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). O macrófago é a principal célula de ligação e transição entre a resposta inata e adaptativa em processos inflamatórios e antimicrobianos (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Os macrófagos são as células imunes que apresentam a maior expressão do *CPEB4*, fator importante para a estabilização do mRNA dessas células durante a inflamação (SUÑER *et al.*, 2022). Dessa forma, a maior ou menor expressão de *CPEB4*, pela desregulação dos miRNAs avaliados neste estudo, pode favorecer um estado inflamatório mais atenuado na infecção por CHIKV.

A fagocitose é uma das funções mais importantes dos macrófagos,

principal célula ativadora do processo inflamatório. A XKR4, juntamente com moléculas da família, possui a capacidade de facilitar a exposição da fosfatidilserina em células apoptóticas (SUZUKI; IMANISHI; & NAGATA, 2014), demonstrando sua possível importância na eficiência de resposta imune na febre chikungunya.

Alguns mecanismos epigenéticos, podem deixar o indivíduo mais suscetível a uma progressão mais rápida ou um agravamento do quadro de uma doença reumática. Estudos anteriores apontaram que a metilação em locais de CpG do *DIO2* podem levar ao seu silenciamento, à regulação positiva da expressão de enzimas de degradação da cartilagem e mineralização de matriz em quadros de OA, também à alteração de expressão de genes de outras selenoproteínas desses pacientes (BONER *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2021). Foi observado que durante a supressão do *DIO2* em condrócitos, a expressão e circulação de mediadores pró-inflamatórios está aumentada (CHENG; BOLOGNESI; KRAUS, 2012), contribuindo para a manutenção do *status* inflamatório. Desta forma, a regulação da *DIO2* pelos miRNAs mais expressos na febre chikungunya pode exercer um efeito nos processo inflamatório da doença aguda ou crônica.

Não foram encontradas referências do gene *MEI4* que estivesse relacionado diretamente com os achados de sintomatologia e patogênese da infecção por CHIKV. No entanto, há evidências de alterações na oogênese decorrente da osteoartrite em modelo animal (KOLAROV *et al.*, 2021). Dessa forma, alterações no gene *MEI4* podem contribuir com a patogênese e no quadro de outras formas de artrite, além da OA, como no caso da artrite crônica por chikungunya.

De acordo com os resultados encontrados sobre a análise de enriquecimento funcional e ontologia gênica, as interações das 5 proteínas analisadas estão relacionadas a mecanismos celulares de estresse oxidativo, metabolismo hepático e de hormônios derivados de amins, apoptose e resposta imunológica. A desregulação em cadeia desses processos, a partir da desregulação das proteínas estudadas, poderia contribuir negativamente com o quadro infeccioso viral e com a evolução para doença reumática.

Conhecido como estresse oxidativo, o distúrbio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e fatores antioxidantes é apontado como possibilitador de agravamentos no quadro clínico de inúmeras doenças

(BETTERIDGE, 2000; CHEN; ZHONG, 2014; KATTOOR *et al.*, 2017). A todo instante, processos bioquímicos ocorrem nos organismos e com eles, são liberadas moléculas de hidroxilas (OH), óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO⁻), ânion superóxido (Oz⁻) e metais de transição como ferro e cobre (BETTERIDGE, 2000). Essas e outras ROS são liberadas causando dano às células (JONES, 2018).

Em situação homeostática, os radicais livres também são produzidos por células do sistema imunológico, neutrófilos e macrófagos, como um dos mecanismos de detenção de um agente infeccioso e de outras substâncias agressoras do processo inflamatório (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Um dos componentes do sistema REDOX, a superóxido dismutase 2 está regulada negativamente em condrócitos de OA, levando a danos oxidativos, disfunções mitocondriais e adaptação da cadeia transportadora de elétrons frente ao aumento das ROS. Adicionalmente, o aumento de ROS levam a ativação do inflamassoma pelo NLRP3, formando mais um mecanismo de manutenção da inflamação (GAVRIILIDIS *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2019).

A inflamação aguda é um processo natural de combate a lesões de infarto, infecções bacterianas, virais, toxinas e traumas (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013). Como em todos os processos de transdução de sinal, os receptores são o início de uma via de sinalização, como os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), sendo eles receptor do tipo Toll (TLR), receptor de lectina do tipo C (CLR), receptor do tipo NOD (NLR) e receptor do tipo RIG (RLR) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010). Após cessar o estímulo nocivo, a inflamação dará continuidade para o processo de cicatrização da região lesionada (AHMED, 2011; WARD, 2003). Caso não haja cicatrização, a inflamação aguda evolui para inflamação crônica. A cronicidade é vista como um problema pelo recrutamento constante de células do sistema imune, que continuam liberando mediadores químicos, perpetuando o estado de inflamação e podendo lesar outros locais saudáveis do organismo (LEE; WALSER; DUBINETT, 2009).

O CHIKV induz o estresse do retículo endoplasmático, assim como a produção de ROS, sendo este último o principal indutor do processo de autofagia durante a infecção. De forma simultânea, o vírus consegue inibir a via de sinalização mTOR e ativar a MAPK, ações mediadas pela ROS, e tendo como colaborador a

diminuição de enzimas REDOX, igual a catalase (DHANWANI *et al.*, 2011; JOUBERT *et al.*, 2012). A presença contínua desses radicais livres na infecção, perpetua a ativação de cascatas oxidativas e danos celulares que corroboraram com a clínica de pacientes com poliartralgia crônica, já que a produção exacerbada dentro de condrócitos e osteoblastos induzem a osteoclastogênese e danificam as articulações (BANERJEE; & MUKHOPADHYAY, 2018). Ademais, as citocinas pró inflamatórias IL-6, IFN- γ , CXCL9 correlacionam-se positivamente com as ROS, enquanto a IL-10, uma anti inflamatória, correlaciona-se negativamente (BANERJEE; & MUKHOPADHYAY, 2018).

O envolvimento das proteínas analisadas com o metabolismo de hormônios derivados de aminas na Chikungunya poderia ser demonstrado pela hipótese de participação deles nos processos inflamatórios. A tri-iodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4) são derivados de tirosina e nativos da tireoide. Em relação ao papel deles em doenças autoinflamatórias, ainda há controvérsias. Em Andonopoulos *et al.* (1996), não foram encontradas correlações entre os níveis de T3 e T4 e o curso clínico de pacientes com AR. Em contrapartida, o T3 pode agir diretamente em processos de estresse oxidativo, regulando-o positivamente, o que por conseguinte, agrava o quadro inflamatório (VENDITTI *et al.*, 1997).

Uma das 5 proteínas encontradas no presente estudo foi a DIO2. Tanto ela como a DIO3 são selenoproteínas constantemente correlacionadas com a patogênese da OA (LU; HOLMGREN, 2009; RASMUSSEN *et al.*, 2011). Por outro lado, a deficiência de selenoproteínas leva a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e HIF-1 α , elevando a liberação das citocinas pró inflamatórias IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-17, TNF- α , aumenta a expressão de outros fatores inflamatórios como a COX2 e iNOS, além da indução de apoptose por vias mitocondriais e regulação positiva dos genes apoptóticos *CASP3* e *CASP8*. Simultaneamente, ocorre a diminuição de expressão de citocinas anti-inflamatórias e genes anti-apoptóticos (LI *et al.*, 2021). Essa classe de enzimas abrangem diversas funções, desde componentes do sistema REDOX (glutathiona peroxidase 1, 2, 3 e 4), síntese, ativação e resposta sistemática a hormônios tireoidianos (iodotironina desionidases), como atividade antioxidante e redução de Tiorredoxina (tiorredoxina redutases) (REEVES; HOFFMANN, 2009; FLORIAN *et al.*, 2010; SCHMUTZLER *et al.*, 2007;

PAPP; HOLMGREN; KHANNA, 2010; TINGGI, 2008; LU; HOLMGREN, 2009).

A depleção dos níveis de selênio pode causar um déficit da resposta imunológica e elevar a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas intestinais e a cânceres associados à inflamação, além de que a suplementação dietética dele apresenta função imunoestimulante com proliferação de células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo linfócitos T e NK (BARRETT *et al.*, 2015; HAMID *et al.*, 2018; HUANG; ROSE; HOFFMANN, 2018). Além disso, a ausência do mineral selênio poderia desencadear uma reação em cadeia, no qual as selenoproteínas não poderão completar sua composição química e deixarão de atuar em mecanismos bioquímicos. Além disso, por estarem presentes em diversos e distintos locais, uma gama de processos poderiam ser afetados, sendo um deles o sistema REDOX. O aumento dos radicais livres, eleva as lesões celulares, além de desencadear a ativação de vias intracelulares pró inflamatórias, retro alimentando o estado da inflamação. Dessa forma, a ausência das enzimas sintetizantes dos hormônios tireoidianos, poderia afetar a regulação endócrina mediada por T3 e T4.

No caso de um paciente possuir alterações epigenéticas conjuntas nos hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-5581-3p e hsa-miR-382-3p, a expressão dos genes *AIFM1*, *CPEB4*, *DIO2*, *XKR4* e *MEI4* poderão ser afetadas, impactando no estresse oxidativo e na inflamação. O *network* formado pelos 5 respectivos produtos desses genes, e as análises de enriquecimento e ontologia, demonstram as atividades moleculares e fisiológicas diretamente afetadas. Essa imensa reação em cadeia somada à patogênese do CHIKV, pode ser uma das causas das artralguas intensas com possibilidades de evoluir para a artrite crônica por Chikungunya.

Os achados deste trabalho necessitam de validação experimental para validar os altos *scores* de interação encontrados. Além disso, os bancos de dados do estudo não apresentaram informações específicas sobre a Febre Chikungunya, confirmando, mais uma vez, o estado de negligência desta arbovirose endêmica das Américas e Ásia.

7 CONCLUSÃO

Com base na utilização da biologia de sistemas para determinar o papel dos miRNAs, seus genes-alvos, e vias metabólicas que atuam integradamente no desenvolvimento das fases aguda e crônica da Febre Chikungunya, concluímos que alterações nos miRNAs hsa-miR-3074-3p, hsa-miR-487b-3p, hsa-miR-5581-3p e hsa-miR-382-3p poderiam levar a modificação de expressão genes-alvos *AIFM1*, *CPEB4*, *DIO2*, *XKR4* e *MEI4*.

As interações observadas em redes e análises de enriquecimento funcional e ontologia, trouxeram a demonstração da presença desses produtos do *AIFM1* e *DIO2* interagindo e participando da regulação e resposta ao estresse oxidativo e metabolismo do selênio, fortes interferentes do processo inflamatório desenvolvido na Febre Chikungunya. Essas alterações epigenéticas do hospedeiro podem interferir diretamente no curso da Febre Chikungunya, sendo um potencial responsável pelo avanço para a fase crônica.

Esperamos que tais processos e alvos possam ser estudados de forma mais aprofundada, tal como sua aptidão para ser um novo alvo farmacológico voltado às doenças auto inflamatórias articulares, sobretudo, para a artralgia e artrite crônica por Chikungunya.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, Meghna *et al.* Chikungunya virus modulates the miRNA expression patterns in human synovial fibroblasts. **Journal of Medicine Virology**, v. 92, n. 2, p. 139–148, Feb, 2020.
- AHMED, Afsar U. An overview of inflammation: mechanism and consequences. **Frontiers in Biology**, v. 6, n. 4, p. 274–81, Jul, 2011.
- ALBERTS, Bruce. *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 23-16.
- ALBERTS *et al.* Proteínas. *In:* ALBERTS *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 109-166.
- AMARAL, J. Kennedy; BINGHAM, Clifton O.; SCHOEN, Robert T. Successful Methotrexate Treatment of Chronic Chikungunya Arthritis. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 26, n. 3, p. 119-124, Apr, 2020.
- ANDONOPOULOS, A. P., *et al.* Thyroid function and immune profile in rheumatoid arthritis. A controlled study. **Clinical Rheumatology**, v. 15, n. 6, p. 599–603, Nov, 1996.
- AREAS at Risk for Chikungunya | Chikungunya virus | **Centers for Disease Control Prevention**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/>. Acesso em: 25 May. 2022.
- BANERJEE, Nilotpal; & MUKHOPADHYAY, Sumi. Oxidative damage markers and inflammatory cytokines are altered in patients suffering with post-chikungunya persisting polyarthralgia. **Free Radical Research**, v. 52, n. 8, p. 887–895, Aug, 2018.
- BARRETT, Caitlyn W., *et al.* Selenoprotein P influences colitis-induced tumorigenesis by mediating stemness and oxidative damage. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 7, p. 646–2660, Jul, 2015.
- BETTERIDGE, John D. What is oxidative stress? **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 49, n. 2 SUPPL. 1, p. 3–8, Feb, 2000.
- BONER, Nils *et al.* Underlying molecular mechanisms of DIO2 susceptibility in symptomatic osteoarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 74, n. 8, p. 1571–1579, Aug, 2015.
- BRANDÃO, Igor Augusto. **Abordagens da biologia de sistemas na investigação dos pontos de articulação nas rotas metabólicas do KEGG**. 2020. 63 p. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) — Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2020.
- BRASIL, **Boletim Epidemiológico Monitoramento dos casos de Arboviroses urbanas transmitidas pelo Aedes (dengue, chikungunya e Zika)**, Ministério da

Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. v. 52, n. 44, p. 1–10. 1º à 47º semanas epidemiológicas 1 a 49, Jan/Nov. 2021.

BUSHATI, Natascha; COHEN, Stephen M. microRNA Functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 23, n. 1, p. 175-205, Nov, 2007.

CHEN, Zhuming *et al.* Inhibition of Nrf2/HO-1 signaling leads to increased activation of the NLRP3 inflammasome in osteoarthritis. **Arthritis Research and Therapy**, v. 21, n. 1, p. 1–13, Dec, 2019.

CHEN, Zhichun; ZHONG, Chunjiu. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neuroscience Bulletin**, v. 30, n. 2, p. 271-281, Mar, 2014.

CHENG, Anthony W. M.; BOLOGNESI, Michael; KRAUS, Virginia B. DIO2 Modifies Inflammatory Responses in Chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 20, n. 5, p. 440-445, May, 2012.

CHIRATHAWORN, Chintana *et al.* Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, n. 8, p. 631-634, Aug, 2013.

CLETON, Natalie *et al.* Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 3, p. 191-203, Nov, 2012.

COUDERC, Thérèse *et al.* A Mouse Model for Chikungunya: Young Age and Inefficient Type-I Interferon Signaling Are Risk Factors for Severe Disease. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. e29, Feb, 2008.

DIALLO, Mawlouth. *et al.* Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 2, p. 281-286, Feb, 1999.

DIALLO, Diawo *et al.* Landscape Ecology of Sylvatic Chikungunya Virus and Mosquito Vectors in Southeastern Senegal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1649, 12 Jun, 2012.

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

FELSENFELD, Gary. A Brief History of Epigenetics. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 1, p. a018200, Jan, 2014.

FLORIAN, Simone *et al.* Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1694–1702, Dec, 2010.

GAVRIILIDIS, Christo *et al.* Mitochondrial dysfunction in osteoarthritis is associated with down-regulation of superoxide dismutase 2. **Arthritis and Rheumatism**, v. 65, n. 2, p. 378–387, Feb, 2013.

GAYON, Jean. From Mendel to epigenetics: History of genetics. **Comptes Rendus Biologies**, v. 339, n. 7-8, p. 225-230, Jul, 2016.

GÉRARDIN, Patrick *et al.* Perceived morbidity and community burden after a Chikungunya outbreak: the TELECHIK survey, a population-based cohort study. **BMC Medicine**, v. 9, n. 1, Jan, 2011.

GOUPIL, Brad A. *et al.* Novel Lesions of Bones and Joints Associated with Chikungunya Virus Infection in Two Mouse Models of Disease: New Insights into Disease Pathogenesis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155243, May, 2016.

GRIFFITHS-JONES, Sam *et al.* MicroRNA evolution by arm switching. **EMBO reports**, v. 12, n. 2, p. 172-177, Jan, 2011.

GRISS, Johannes *et al.* ReactomeGSA - Efficient Multi-Omics Comparative Pathway Analysis. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 19, n. 12, p. 2115-2124, Sep 2020.

GUBLER, DUANE J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13-24, Jan, 2006.

HAMID, Mohammed *et al.* The Hepatoprotective Effect of Selenium-Enriched Yeast and Gum Arabic Combination on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Injury in Rats. **Journal of Food Science**. v. 83, n. 2, p. 525–534, Feb, 2018.

HOARAU, Jean-Jacques *et al.* Persistent Chronic Inflammation and Infection by Chikungunya Arthritogenic Alphavirus in Spite of a Robust Host Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 10, p. 5914-5927, Apr, 2010.

HUANG, Zhi; ROSE, Aaron H.; HOFFMANN, Peter R. The role of selenium in inflammation and immunity: From molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 7, p. 705–743, Apr, 2012.

HUTVAGNER, Gyorgy. Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. **FEBS Letters**, v. 579, n. 26, p. 5850-5857, Sep 2005.

IDEKER, Trey; GALITSKI, Timothy; HOOD, Leroy. A NEWAPPROACH TO DECODING LIFE: Systems Biology. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 2, n. 1, p. 343-372, Set, 2001.

JAVELLE, Emilie *et al.* Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003603, Mar, 2015.

JONES, Dean P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 295, n. 4, Oct, 2008.

JOUBERT, Pierre-Emmanuel *et al.* Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. **Journal of Experimental Medicine**, v. 209, n. 5, p. 1029–1047, May, 2012.

JUPP, P. G., MCINTOSH, B. M., DOS SANTOS, I. Laboratory vector studies on six mosquito and one tick species with chikungunya virus. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 1, p. 15-19, Jan, 1981.

JUPP P. G., MCINTOSH B. M. *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. **Journal of the American Mosquito Control Association**. v. 6, n. 3, p. 415–420, Sep, 1990.

KARAGKOUNI, Dimitra *et al.* DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA–gene interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D239—D245, Nov, 2017.

KATTOOR, Ajoy J., *et al.* Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 11, Set, 2017.

KELVIN, Alyson A. *et al.* Inflammatory Cytokine Expression Is Associated with Chikungunya Virus Resolution and Symptom Severity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1279, Aug, 2011.

KERN, Fabian *et al.* miRTargetLink 2.0—interactive miRNA target gene and target pathway networks. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W409—W416, May, 2021.

KHAN, Afjal Hossain *et al.* Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 12, p. 3075-3084, Dec, 2002.

KITANO, Hiroaki. Systems Biology: A Brief Overview. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1662-1664, Mar, 2002a.

KITANO, Hiroaki. Computational systems biology. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 206-210, Nov. 2002b.

KLEIN, Christopher. J.; BENARROCH, Eduardo. E. Epigenetic regulation: Basic concepts and relevance to neurologic disease. **Neurology**, v. 82, n. 20, p. 1833–1840, Apr, 2014.

KOLAROV, Anton I. *et al.* Osteoarthritis Affects Mammalian Oogenesis: Effects of Collagenase-Induced Osteoarthritis on Oocyte Cytoskeleton in a Mouse Model. **International Journal of Inflammation**, v. 2021, p. 1-12, Nov, 2021.

KOZOMARA, Ana; BIRGAOANU, Maria; GRIFFITHS-JONES, Sam. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D155—D162, Nov, 2018.

- KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, John C. Inflamação e Reparo. *In*: KUMAR, ABBAS, ASTER. **Robins Patologia Básica**. 9. ed. Elsevier, 2013. p. 30-72.
- LABADIE, Karine *et al.* Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 3, p. 894-906, Mar, 2010.
- LAWRENCE, Moyra; DAUJAT, Sylvain; SCHNEIDER, Robert. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 1, p. 42-56, Jan, 2016.
- LEE, Daniel Y. *et al.* A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. **Cell**, v. 72, n. 1, p. 73-84, Jan, 1993.
- LEE, Gina; WALSER, Tonya C.; DUBINETT, Steven M. Chronic inflammation, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 15, n. 4, p. 303–7, Jul, 2009.
- LEI, Jinlai *et al.* miR-382-3p suppressed IL-1 β induced inflammatory response of chondrocytes via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway by directly targeting CX43. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 12, p. 23160–23168, Dec, 2019.
- LI, Shuang *et al.* Selenium deficiency induces spleen pathological changes in pigs by decreasing selenoprotein expression, evoking oxidative stress, and activating inflammation and apoptosis. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1–13, May, 2021.
- LI, Zhi; CHENG, Jiangqi; & LIU, Jiuxiang. Baicalin protects human OA chondrocytes against il-1 β -induced apoptosis and ECM degradation by activating autophagy via mir-766-3p/AIFM1 axis. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 2645–2655, Jul, 2020.
- LI, Zhihui *et al.* The worldwide seroprevalence of DENV, CHIKV and ZIKV infection: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 4, p. e0009337, Apr, 2021.
- LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; & LINHARES, Rosa. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55–64. 2014.
- LU, Jun; HOLMGREN, Arne. Selenoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 723–727, Jan, 2009.
- LUM, Fok-Moon; NG, Lisa F. P. Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. **Antiviral Research**, v. 120, p. 165-174, Aug, 2015.
- LUMSDEN, W. H. R. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953 II. General description and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 33-57, Jan, 1955.

MANIMUNDA, Sathya Prakash *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**, v. 104, n. 6, p. 392-399, Jun, 2010.

MARTÍNEZ-MORCILLO, Francisco J., *et al.* NAMPT-derived NAD⁺fuels PARP1 to promote skin inflammation through parthanatos cell death. **PLoS Biology**, v. 19, n. 11, p. 1–27, Nov, 2021.

MEJÍA, Carla-Ruth; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Alfavirus tropicales artritogénicos. **Reumatología Clínica**, v. 14, n. 2, p. 97-105, Mar, 2018.

MOORE, Lisa D.; LE, Thuc; FAN, Guoping. DNA Methylation and Its Basic Function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23-38, Jul, 2012.

MOHR, Ashley M.; & MOTT, Justin L. Overview of microRNA biology. **Seminars in Liver Disease**, v. 35, n. 1, p. 3–11. Jan, 2015

NELSON, David L.; COX, Michael M. Estrutura Tridimensional de Proteínas. *In*: NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014. p. 115-156.

OZDEN, Simona *et al.* Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 6, p. e527, Jun, 2007.

PAPP, Laura V.; HOLMGREN, Arne; KHANNA, Kum K. Selenium and selenoproteins in health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7. p. 793–795, Aug, 2010.

PETERSON, Craig L.; LANIEL, Marc-André. Histones and histone modifications. **Current Biology**, v. 14, n. 14, p. R546—R551, Jul, 2004.

POLONI, Joice de Faria *et al.* Biologia de Sistemas. *In*: VERLI, Hugo (org.). **Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014. p. 116-146.

POWERS, Ann M. *et al.* Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. **Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 471-479, Feb, 2000.

PRAMANIK, Dibyajyoti *et al.* CRISPR-Mediated Engineering across the Central Dogma in Plant Biology for Basic Research and Crop Improvement. **Molecular Plant**, Nov, 2020.

RASMUSSEN, Lone B., *et al.* Selenium status, thyroid volume, and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency. **European Journal of Endocrinology**, v. 164, n. 4, p. 585–590. Apr, 2011.

RAVICHANDRAN, Rajan; MANIAN, Manju. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 02, Apr, 2008.

REEVES, M. A., HOFFMANN, P. R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 15, p. 2457–2478, Apr, 2009.

REZZA, Giovanni *et al.* Co-circulation of Dengue and Chikungunya Viruses, Al Hudaydah, Yemen, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 8, p. 1351-1354, Aug, 2014.

ROBINSON, Marion C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 1, p. 28-32, Jan, 1955.

RODRIGUEZ, Patricia A. *et al.* Systems Biology of Plant-Microbiome Interactions. **Molecular Plant**, v. 12, n. 6, p. 804–821. Jun, 2019.

RUST, Robert S. Human Arboviral Encephalitis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 19, n. 3, p. 130-151, Sep, 2012.

SÁNCHEZ, Juan S.; CAÑÓN, Ana María; LOMBO, Jadith C. Síntomas subagudos y crónicos de la fiebre de chikungunya en un grupo de personas adultas en Ibagué, Colombia. **Biomédica**, v. 39, n. 3, p. 587-594, Sep, 2019.

SCHAEFFER, G. Bradley; THOMPSON, James N. Fluxo de Informação e níveis de regulação. *In*: SCHAEFFER, G. Bradley; THOMPSON, James N. **Genética Médica**. Porto Alegre: AMGH, 2015. p. 17-47.

SCHMUTZLER, Cornelia *et al.* Selenoproteins of the thyroid gland: expression, localization and possible function of glutathione peroxidase 3. **Biological Chemistry**, v. 388, n. 10, p. 1053–1059, Oct, 2007.

SHU, Xiong *et al.* Analysis of microRNA expression in CD133 positive cancer stem-like cells of human osteosarcoma cell line MG-63. **PeerJ**, v. 9, p. 1–19, Sep, 2021.

SHUZHAO, Li *et al.* Molecular signatures of antibody responses derived from a systems biological study of 5 human vaccines. **Nature Immunology**, v. 15, n. 2, p. 195–204. Feb, 2014.

SILVA, Laurie A.; DERMODY, Terence S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 3, p. 737-749, Mar, 2017.

SIMON, F. *et al.* French guidelines for the management of chikungunya (acute and persistent presentations). November 2014. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 7, p. 243-263, Jul, 2015.

SKALINSKI, Lacita Menezes *et al.* The triple epidemics of arboviruses in Feira de Santana, Brazilian Northeast: Epidemiological characteristics and diffusion patterns. **Epidemics**, v. 38, p. 100541, Mar, 2022.

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. Transcrição e Processamento do RNA. *In*: SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. **Fundamentos da Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 261-284.

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. Replicação do DNA e dos Cromossomos. *In*: SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. **Fundamentos da Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 261-284.

SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. Tradução e Código Genético. *In*: SNUSTAD, D. Peter; SIMMONS, Michael J. **Fundamentos da Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 261-284.

SOLIGNAT, Maxime *et al.* Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 393, n. 2, p. 183-197, Oct, 2009.

SOSINSKY, A. Target Explorer: an automated tool for the identification of new target genes for a specified set of transcription factors. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3589-3592, Jul, 2003.

SOURISSEAU, Marion *et al.* Characterization of Reemerging Chikungunya Virus. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. e89, Jun, 2007.

SUÑER, Clara *et al.* Macrophage inflammation resolution requires CPEB4-directed offsetting of mRNA degradation. **ELife**, v. 11, p. 1–23, Apr, 2022.

SUZUKI, Jun; IMANISHI, Eiichi; & NAGATA, Shigekazu. Exposure of phosphatidylserine by Xkrelated protein family members during apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 44, p. 30257–30267, Oct, 2014.

SZKLARCZYK, Damian *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein–protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. D1, p. D605—D612, Nov, 2020.

TAKEUCHI, Osamo; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 40, n. 6, p. 805–20, Mar, 2010.

TATEIWA, Daisuke; YOSHIKAWA, Hideki; KAITO, Takashi. Cartilage and Bone Destruction in Arthritis: Pathogenesis and Treatment Strategy: A Literature Review. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 818, Aug, 2019.

TENG, Terk-Shin *et al.* A Systematic Meta-analysis of Immune Signatures in Patients With Acute Chikungunya Virus Infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 12, p. 1925-1935, Jan, 2015.

TEO, Teck-Hui *et al.* Mouse models for Chikungunya virus: deciphering immune mechanisms responsible for disease and pathology. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1-3, p. 136-147, Mar, 2012.

TINGGI, Ujang. Selenium: its role as antioxidant in human health. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 13, n. 2, p. 102–108, 2008.

VAIRO, Francesco., *et al.* Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 4, p. 1003–1025, Dec, 2019.

VAN DUIJL-RICHTER, Mareike *et al.* Early Events in Chikungunya Virus Infection—From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3647-3674, Jul, 2015.

VENDITTI P., *et al.* Effect of thyroid state on lipid peroxidation, antioxidant defences, and susceptibility to oxidative stress in rat tissues. **Journal of Endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 151–157, Oct, 1997.

WAHID, Fazli *et al.* MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 11, p. 1231-1243, Nov, 2010..

WARD P. Acute lung injury: how the lung inflammatory response works. **European Respiratory Journal**, v. 22, n. 44, p. 22s–23s, Sep, 2003.

WARDE-FARLEY, David *et al.* The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. suppl_2, p. W214—W220, Jun, 2010.

WAUQUIER, Nadia *et al.* The Acute Phase of Chikungunya Virus Infection in Humans Is Associated With Strong Innate Immunity and T CD8 Cell Activation. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 1, p. 115-123, Dec, 2010.

WEAVER S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 299: p. 285–314, 2006.

WOODRUFF, A. W.; BOWEN, E. T.; PLATT, G. S. Viral infections in travellers from tropical Africa. **BMJ**, v. 1, n. 6118, p. 956-958, Apr, 1978.

YANG, Mingyi *et al.* Bioinformatics Analysis Identified the Hub GenemRNA–miRNA–lncRNA Axis, and Signaling Pathways Involved in Rheumatoid Arthritis Pathogenesis. **International Journal of General Medicine**, v. 15, p. 3879–3893, Mar, 2022.

YAYAMA, Takafumi *et al.* Wnt signaling pathway correlates with ossification of the spinal ligament: A microRNA array and immunohistochemical study. **Journal of Orthopaedic Science**, v. 23, n. 1, p. 26–31, Jan, 2018.

YOON, In-Kyu *et al.* High Rate of Subclinical Chikungunya Virus Infection and Association of Neutralizing Antibody with Protection in a Prospective Cohort in The Philippines. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003764, May, 2015.

ZHANG, Rongqiang *et al.* Patients with Osteoarthritis and Kashin-Beck Disease Display Distinct CpG Methylation Profiles in the *DIO2*, *GPX3*, and *TXRND1* Promoter Regions. **Cartilage**, v. 13, n. 1_suppl, p. 797S-808S, Jan, 2021.

ZHANG, Xiaomin *et al.* Differences in genome characters and cell tropisms between two chikungunya isolates of Asian lineage and Indian Ocean lineage. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, Ago, 2018.

ZHOU, Yingyao *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, Apr, 2019.

ZOU, Yawen; LAUBICHLER, Manfred D. From systems to biology: A computational analysis of the research articles on systems biology from 1992 to 2013. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200929, Jul, 2018.