

EMBARGO

Por solicitação da autora, o
texto completo dessa
dissertação está embargado
por

24 meses, com início após a
data da defesa **(16/01/2023)**
com disponibilização da obra
completa em **16/01/2025.**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

JULIANA DE SOUZA FELIX

**Identificação de RNAs longos não-codificadores em
pacientes pediátricos naturalmente infectados pelo vírus
*Chikungunya***

JULIANA DE SOUZA FELIX

**Identificação de RNAs longos não-codificadores em
pacientes pediátricos naturalmente infectados pelo vírus
*Chikungunya***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal)

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes

**Araçatuba
2023**

F316i

Felix, Juliana de Souza

Identificação de RNAs longos não-codificadores em
pacientes pediátricos naturalmente infectados pelo vírus
Chikungunya / Juliana de Souza Felix. -- Araçatuba, 2023
154 f.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Flávia Lombardi Lopes

1. Arboviroses. 2. Bioinformática. 3. Epigenética. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Identificação de RNAs longos não-codificadores em pacientes pediátricos naturalmente infectados pelo vírus Chikungunya

AUTORA: JULIANA DE SOUZA FELIX

ORIENTADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES

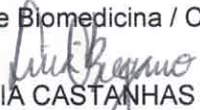
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal,
área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Presencial)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Profa. Dra. ELIANE PATRÍCIA CERVELATTI (Participação Presencial)

Curso de Biomedicina / Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium / UniSALESIANO - Araçatuba


Dra. LIVIA CASTANHAS BREGANÓ (Participação Presencial)

Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 16 de janeiro de 2023.

Aos meus pais, João Carlos e Rosimeire, com amor e gratidão por todo o apoio e carinho durante a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha família, em especial aos meus pais, a minha irmã Jéssica e a minha sobrinha Lia, por acreditarem no meu potencial e por ser o meu porto seguro ao longo dos anos. Obrigada por, mesmo distantes, estarem presentes e dividirem essa jornada comigo.

Ao meu companheiro de vida, Isaac, por me incentivar todos os dias a seguir em busca dos meus objetivos. Obrigada por todo apoio, paciência e carinho ao longo de minha jornada acadêmica.

A minha prima, Natalia Felix Negreiros, por ser minha inspiração e exemplo, além de seu papel essencial para a conclusão de minha graduação. Obrigada por todo apoio, incentivo e conselhos ao longo desses anos.

As grandes amigas que fiz ao longo dessa jornada: Amanda Furlan, Beatriz Trigo, Flávia Athayde, Jéssica Troiano, Mariana Cordeiro, Maria Fernanda e Natália Scaramele. Obrigada pelo companheirismo, conversas, alegrias e tristezas compartilhadas.

A minha orientadora, Dra. Flávia Lombardi Lopes, pela oportunidade de integrar o Laboratório de Epigenômica, por sua disponibilidade, suporte e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

A UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, pela oportunidade de realização do mestrado. A todos os professores, funcionários e colaboradores, sempre solícitos e dispostos.

As bancas, do meu Exame Geral de Qualificação, Dra. Ana Carolina Terzian e Dr. Leandro Garcia, e da minha defesa, Dra. Eliane Cervelatti e Dra. Livia Breganó, por serem profissionais exemplares de imensurável dedicação e comprometimento, obrigada pelas considerações que enriqueceram grandemente este trabalho.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de iniciação científica que deu início a este trabalho (Processo: 2019/13542-2).

“ Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

(Carl Sagan)

FELIX, J. S. **Identificação de RNAs longos não-codificadores em pacientes pediátricos naturalmente infectados pelo vírus *Chikungunya***. 2023. 154 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A febre chikungunya é uma doença tropical negligenciada, onde o vírus de mesmo nome é transmitido por mosquitos da espécie *Aedes* (*A. aegypti* e *A. albopictus*). Após a infecção, o primeiro sítio de replicação do vírus *Chikungunya* é a pele humana, principalmente nos fibroblastos da derme, e sua disseminação é através dos gânglios linfáticos e do sistema circulatório, atingindo compartimentos musculares e articulares. A fase aguda da doença dura aproximadamente 2 semanas, entretanto, alguns pacientes progridem para um estágio crônico, apresentando intensas artralgias que podem durar de meses a anos. Sabe-se que os interferons do tipo I são essenciais para a resposta imune antiviral, contudo, a persistência do vírus nas articulações foi associada à intensa expressão dessa citocina. As infecções virais são capazes de modificar o transcriptoma do hospedeiro. Além dos RNAs mensageiros (mRNAs), outra classe importante de transcritos são os RNAs longos não-codificadores (lncRNAs), que diferem dos mRNAs pois não são traduzidos em proteínas. Os lncRNAs podem regular a expressão gênica de maneira transcricional e pós-transcricional, podendo modular a resposta do hospedeiro frente a infecções. Visto que a infecção pelo vírus *Chikungunya* altera a expressão de genes do hospedeiro, o presente estudo visa elucidar se a expressão de lncRNAs está correlacionada com a alteração de expressão de possíveis mRNAs alvos, e o papel dessas interações durante a infecção por *Chikungunya* em sangue total de meninos adolescentes. Foram utilizados dados de RNA-Seq disponíveis publicamente (GeoDatasets, GSE99992), que dispõe de 34 amostras de sangue total de adolescentes do sexo masculino, com idade entre 11 e 15 anos, coletadas do mesmo paciente nas fases aguda e convalescente. Utilizando a plataforma *Galaxy*, alinhamos as amostras, contamos as *reads* e analisamos a expressão diferencial ($FDR < 0.05$; $\log_2(FC) \geq 1$). Identificamos os pares de lncRNA-mRNA coexpressos utilizando a correlação de Pearson ($|r| \geq 0.95$; $FDR < 0.01$), calculamos o potencial de ligação e identificamos a distância em pares de

base entre lncRNAs e mRNAs. Todos os mRNAs alvos de lncRNAs que atenderam aos critérios de coexpressão e potencial de ligação ou coexpressão e localização próxima (100kbps) foram utilizados para a análise de enriquecimento funcional, utilizando o *g:Profiler*. Dos transcritos diferencialmente expressos entre a fase aguda e a convalescença, 1975 foram classificados como mRNAs e 793 como lncRNAs, sendo que destes, 569 lncRNAs apresentaram expressão aumentada durante a fase aguda, enquanto 224 estavam menos expressos. O lncRNA BISPR está mais expresso na fase aguda e correlacionado com o mRNA OASL, em uma possível interação *trans*, e com o mRNA BST2 em uma possível interação *cis*. Ao regular o mRNA OASL, BISPR favorece o reconhecimento de RNA viral através dos receptores RIG-I, que induzem a expressão de IFN-I. BISPR também é capaz de regular a região promotora de seu gene vizinho BST2, promovendo sua transcrição. Sendo assim, nossos resultados sugerem que a infecção por *Chikungunya* altera a expressão de mRNAs e lncRNAs, e que esses mRNAs são potencialmente regulados a nível transcricional e pós-transcricional por lncRNAs, influenciando assim a resposta imune do indivíduo.

Palavras-chave: Arboviroses. Bioinformática. Epigenética.

FELIX, J. S. **Identification of long non-coding RNAs in pediatric patients naturally infected with the *Chikungunya* virus.** 2023. 154 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Chikungunya fever is a neglected tropical disease, in which the virus of the same name is transmitted by mosquitoes of the *Aedes* species (*A. aegypti* and *A. albopictus*). After infection, the first replication site of the *Chikungunya* virus is the human skin, mainly in dermal fibroblasts, and its dissemination is through the lymph nodes and the circulatory system, reaching muscle and joint compartments. The acute phase of the disease lasts approximately 2 weeks, however, some patients progress to a chronic stage, presenting intense arthralgias that can last from months to years. It is known that type I interferons are essential for the antiviral immune response, although, the persistence of the virus in the joints was associated with the intense expression of this cytokine. Viral infections are able to modify the host transcriptome. In addition to messenger RNAs (mRNAs), another important class of transcripts are the long non-coding RNAs (lncRNAs), which differ from mRNAs in their inability to be translated into proteins. lncRNAs can regulate gene expression in a transcriptional and post-transcriptional level, and can modulate the host's response to infections. Since *Chikungunya* virus infection alters host gene expression, the present study aims to elucidate whether the expression of lncRNAs is correlated with differentially expressed target mRNAs, and the role of these interactions during *Chikungunya* infection in whole blood from adolescent boys. Publicly available RNA-Seq data were used (GeoDatasets, GSE99992) containing 34 whole blood samples from male adolescents, aged between 11 and 15 years, collected from the same patient in the acute and convalescent phases. Using the Galaxy platform, we aligned the samples, counted the reads and analyzed the differential expression ($FDR < 0.05$; $\log_2(FC) \geq 1$). We identified co-expressed lncRNA-mRNA pairs using Pearson's correlation ($|r| \geq 0.95$; $FDR < 0.01$), calculated the binding potential, and identified the distance in base pairs between lncRNAs and mRNAs. All lncRNA target mRNAs that met the criteria for co-expression and binding potential or co-expression and close location (100kbps) were used for functional enrichment analysis using g:Profiler. Of the differentially expressed

transcripts between the acute and convalescent phases, 1975 were classified as mRNAs and 793 as lncRNAs and, of these, 569 lncRNAs showed increased expression during the acute phase, while 224 were less expressed. BISPR lncRNA is more expressed in the acute phase and is correlated with OASL mRNA, in a possible *trans* interaction, and with BST2 mRNA in a possible *cis* interaction. By regulating OASL mRNA, BISPR favors viral RNA recognition through RIG-I receptors, which induce IFN-I expression. BISPR is also capable of regulating the promoter region of its neighbor gene BST2, promoting its transcription. Therefore, our results suggest that *Chikungunya* infection alters the expression of mRNAs and lncRNAs, and these mRNAs are potentially regulated at the transcriptional and post-transcriptional level by lncRNAs, consequently influencing immune response.

Keywords: Arbovirosis. Bioinformatics. Epigenetics.

APÊNDICE A – Referências da Introdução Geral

BORGHERINI, G. et al. Persistent arthralgia associated with chikungunya virus: a study of 88 adult patients on reunion island. **Clinical Infectious Diseases**, Cary, v. 47, n. 4, p. 469–475, 15 ago. 2008. DOI: 10.1086/590003. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/47/4/469/302619>. Acesso em: 20 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 45 de 2022. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, DF, v. 53, n.43, 14 p., 18 nov. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos Não Transmissíveis e Promoção da Saúde. **Saúde Brasil 2015/2016: uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo *Aedes aegypti***. Brasília, DF, 386 p., 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_brasil_2015_2016_analise_zika.pdf. Acesso em: 20 nov. 2022.

CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with Interleukin-6 and granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 203, n. 2, p. 149-157, 15 jan. 2011. DOI: 10.1093/infdis/jiq042. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3071069/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

DUBRULLE, M. et al. Chikungunya Virus and Aedes mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 6, artigo e5895, 6 p., 12 jun. 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0005895. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0005895>. Acesso em: 20 nov. 2022.

DUPUIS-MAGUIRAGA, L. et al. Chikungunya disease: infection-associated markers from the acute to the chronic phase of arbovirus-induced arthralgia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 3, artigo e1446, 10 p., 27 mar. 2012. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001446. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001446>. Acesso em: 20 nov. 2022.

FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Chikungunya virus spreads in the Americas — Caribbean and South America, 2013–2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 63, n. 22, p. 500-501, 6 jun. 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5779358/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

FITZPATRICK, F. A.; STRINGFELLOW, D. A. Virus and interferon effects on cellular prostaglandin biosynthesis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 125, n. 1, p. 431–437, jul. 1980. DOI: 10.4049/jimmunol.125.1.431. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/125/1/431/12083/Virus-and-interferon-effects-on-cellular>. Acesso em: 20 nov. 2022.

FORTE, W. C. N. **Imunologia**: do básico ao aplicado. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2007.

GEDDES, V. E. V. et al. Common dysregulation of innate immunity pathways in human primary astrocytes infected with Chikungunya, Mayaro, Oropouche, and Zika Viruses. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 11, artigo 641261, 17 p., 15 mar. 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.641261. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.641261/full>. Acesso em: 20 nov. 2022.

HALSTEAD, S. B. Reappearance of Chikungunya, formerly called Dengue, in the Americas. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 21, n. 4, p. 557-561, abr. 2015. DOI: 10.3201/eid2104.141723. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378492/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

HOARAU, J.-J. et al. Persistent Chronic inflammation and infection by Chikungunya arthritogenic alphavirus in spite of a robust host immune response. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 184, n. 10, p. 5914–5927, 15 maio 2010. DOI: 10.4049/jimmunol.0900255. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/184/10/5914/38673/Persistent-Chronic-Inflammation-and-Infection-by>. Acesso em: 20 nov. 2022.

HUA, C.; COMBE, B. Chikungunya virus-associated disease. **Current Rheumatology Reports**, Philadelphia, v. 19, n. 11, artigo 69, 7 p., 1 nov. 2017. DOI: 10.1007/s11926-017-0694-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11926-017-0694-0>. Acesso em: 20 nov. 2022.

KOPP, F.; MENDELL, J. T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. **Cell**, Cambridge, v. 172, n. 3, p. 393-407, 25 jan. 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.01.011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5978744/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

LABADIE, K. et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 120, n. 3, p. 894-906, 1 mar. 2010. DOI: 10.1172/JCI40104. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2827953/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MALFAIT, A.; SCHNITZER, T. J. Towards a mechanism-based approach to pain management in osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, New York, v. 9, n. 11, p. 654–664, nov. 2013. DOI: 10.1038/nrrheum.2013.138. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrrheum.2013.138>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MANIMUNDA, S. P. et al. Clinical progression of Chikungunya fever during acute and chronic arthritic stages and the changes in joint morphology as revealed by imaging. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 104, n. 6, p. 392–399, jun. 2010. DOI: 10.1016/j.trstmh.2010.01.011. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/article/104/6/392/1941200?login=true>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MASON, P. J.; HADDOW, A. J. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 51, n. 3, p. 238–240, 1957. DOI: 10.1016/0035-9203(57)90022-6. Disponível em: <https://academic.oup.com/trstmh/issue/51/3>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MICHLMAYR, D. et al. Comprehensive innate immune profiling of Chikungunya virus

infection in pediatric cases. **Molecular Systems Biology**, London, v. 14, n. 8, artigo e7862, 25 p., 27 ago. 2018. DOI: 10.15252/msb.20177862. Disponível em: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/msb.20177862>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MICHLMAYR, D. et al. Comprehensive immunoprofiling of pediatric Zika reveals key role for monocytes in the acute phase and no effect of prior Dengue Virus infection. **Cell reports**, Cambridge, v. 31, n. 4, artigo 107569, 41 p., 28 abr. 2020. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107569. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7308490/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

PONTING, C. P.; OLIVER, P. L.; REIK, W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 629–641, 20 fev. 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.006. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092-8674\(09\)00142-1](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092-8674(09)00142-1). Acesso em: 20 nov. 2022.

POONPANICHAKUL, T. et al. Innate lymphoid cells activation and transcriptomic changes in response to human Dengue infection. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, artigo 599805, 14 p., 17 maio 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.599805. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.599805/full>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SCHMITZ, S. U.; GROTE, P.; HERRMANN, B. G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 73, n. 13, p. 2491-2509, 1 jul. 2016. DOI: 10.1007/s00018-016-2174-5. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-016-2174-5>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SILVA, L. A.; DERMODY, T. S. Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 127, n. 3, p. 737–749, 1 mar. 2017. DOI: 10.1172/JCI84417. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5330729/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SINGH, S. K.; UNNI, S. K. Chikungunya virus: host pathogen interaction. **Reviews in Medical Virology**, Chichester, v. 21, n. 2, p. 78–88, 15 mar. 2011. DOI: 10.1002/rmv.681. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.681>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SISSOKO, D. et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 3, n. 3, artigo e389, 6 p., 10 mar. 2009. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000389. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647734/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

SOLIGNAT, M. et al. Replication cycle of Chikungunya: a re-emerging arbovirus. **Virology**, New York, v. 393, n. 2, p. 183-197, 25 out. 2009. DOI: 10.1016/j.virol.2009.07.024. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042-6822\(09\)00456-5](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042-6822(09)00456-5). Acesso em: 20 nov. 2022.