

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIRURGIA**

**GABRIELLA PEQUENO COSTA GOMES DE AGUIAR**

**Evidência de alterações epigenéticas do hospedeiro decorrentes de  
infecções por arbovírus: uma revisão sistemática**

**FORTALEZA  
2018**

**GABRIELLA PEQUENO COSTA GOMES DE AGUIAR**

**Evidência de alterações epigenéticas do hospedeiro decorrentes de infecções por arbovírus: uma revisão sistemática**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes**

**FORTALEZA**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D1e DE AGUIAR, GABRIELLA PEQUENO COSTA GOMES.  
Evidência de alterações epigenéticas do hospedeiro decorrentes de infecções por arbovírus: uma revisão sistemática / GABRIELLA PEQUENO COSTA GOMES DE AGUIAR.  
– 2019.  
64 f.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2019.  
Orientação: Profa. Dra. Maria Elisabete Amaral de Moraes .
1. Arbovirus, . 2. Metilação do DNA. 3. Modificações de histonas. 4. MicroRNAs. 5. Biomarcadores do hospedeiro. I. Título.

CDD 617

---

**GABRIELLA PEQUENO COSTA GOMES DE AGUIAR**

**Evidência de alterações epigenéticas do hospedeiro decorrentes de infecções por arbovírus: uma revisão sistemática**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em 17 / 08 / 2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dra Maria Elisabete Amaral de Moraes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr Fábio Miyajima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr José Lima de Carvalho Rocha  
Centro Universitário Unichristus

Ao meu pai Domingos Gomes de Aguiar Filho,  
pelo contínuo estímulo durante toda a minha  
vida.

À minha mãe Patrícia Pequeno Costa Gomes  
de Aguiar, pela dedicação cotidiana.

Ao meu irmão Domingos Gomes de  
Aguiar Neto, grande incentivador do meu  
trabalho.

Ao meu esposo Cláudio Manuel Gonçalves da  
Silva Leite, pelo companheirismo  
incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Titular Lusmar Veras Rodrigues, Coordenador do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

A Professora Titular Maria Elisabete Amaral de Moraes, pelo incentivo e orientação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Cristiano Köhler pelos conselhos úteis durante a revisão e seu olhar crítico independente do manuscrito.

Ao Prof. Dr. Fabio Miyajima, pelo apoio, dedicação, incentivo, ensinamentos e disponibilidade e total colaboração no solucionar das dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo do trabalho.

Aos professores Beatriz Dias, Cristiano Kohler, Silvania Mendes Vasconcelos, Renata Amaral Moraes, Antônio Carlos Vallinoto, Danielle Silveira Macedo, e Luciano Pamplona Cavalcanti, obrigado pela cooperação e paciência.

Ao Prof. Dr. José Lima de Carvalho Rocha, Magnífico Reitor da UNICHISTUS, pela participação da minha formação educacional básica, na Graduação em Medicina e nesta Dissertação de Pós-Graduação.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação que muito contribuíram com seus ensinamentos.

À Sra. Maria Luciene Vieira de Oliveira e à Sra. Magda Fontenele de Sousa, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio irrestrito para o êxito deste trabalho.

## RESUMO

As infecções por arbovírus têm se tornado uma grande ameaça pandêmica. Este estudo teve como objetivo investigar a existência de marcadores epigenéticos hospedeiros decorrentes das principais infecções causadas por arbovírus, com impacto na saúde humana. Definimos revisar sistematicamente todas as evidências publicadas descrevendo quaisquer modificações epigenéticas associadas a infecções de arbovírus, incluindo, mas não limitado a, microRNAs, metilação de DNA e modificações de histonas.

**Métodos:** Uma pesquisa abrangente foi realizada utilizando as bases de dados eletrônicas PubMed, Science Direct e Cochrane Library. Foram pesquisadas referências disponíveis desde a criação destas bibliotecas eletrônicas até 4 de janeiro de 2018. Foram incluídos relatórios descrevendo estudos *in vivo* ou *in vitro* originais que investigavam alterações epigenéticas relacionadas a infecções por arbovírus em paciente ou linhas celulares humanas. Estudos que investigam modificações epigenéticas relacionadas ao vírus ou ao vetor artrópode foram excluídos. Foi realizada uma síntese narrativa dos achados, contextualizando evidências comparativas de estudos *in vitro* e *in vivo*.

**Resultados:** Um total de 1025 referências foram encontradas, restando 853 referências quando retiradas as duplicadas, sendo selecionadas por dois revisores independentes. Trinta e dois estudos preencheram os critérios de inclusão e foram revisados. A evidência foi centrada principalmente em assinaturas de microRNA e metilação do DNA implicadas na dengue secundária. Evidências de ameaças epidêmicas recentes, como as infecções por vírus Zika(ZIKV) ou Chikungunya(CHIKV) ainda são escassas.

**Conclusões:** As principais alterações epigenéticas encontradas nas infecções por arbovírus foram miR-146, miR-30e e o complexo de Dicer.

**Palavras-chave:** Epigenética, Metilação do DNA, Modificações de histonas, MicroRNAs, Arbovirus, Biomarcadores do hospedeiro.

## ABSTRACT

**Background:** Arbovirus infections have steadily become a major pandemic threat. This study aimed at investigating the existence of host epigenetic markers arising from the principal arboviruses infections impacting on human health. We set to systematically review all published evidence describing any epigenetic modifications associated with infections from arboviruses, including, but not limited to, microRNAs, DNA methylation, and histone modifications.

**Methods:** A comprehensive search was conducted using the electronic databases PubMed, Science Direct and Cochrane Library from inception to January 4<sup>th</sup>, 2018. We included reports describing original *in vivo* or *in vitro* studies investigating epigenetic changes related to arbovirus infections in either clinical subjects or human cell lines. Studies investigating epigenetic modifications related to the virus or the arthropod vector were excluded. A narrative synthesis of the findings was conducted, contextualizing comparative evidence from *in vitro* and *in vivo* studies.

**Results:** A total of 853 unique references were identified and screened by two independent reviewers. Thirty-two studies met the inclusion criteria and were reviewed. The evidence was centered mainly on microRNA and DNA methylation signatures implicated with secondary Dengue fever. Evidence for recent epidemic threats, such as the infections by Zika or Chikungunya viruses is still scant.

**Conclusions:** Major epigenetic alterations found on arboviruses infections were miR-146, miR-30e and the Dicer complex.

**Keywords:** Epigenetics, DNA Methylation, Histone Modifications, MicroRNAs, Arbovirus, Host Biomarkers.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1 Definição, distribuição global e famílias	
1.2 Febre e Mialgia	
1.3 Artrite e Exantema	
1.4 Encefalite	
1.5 Febre Hemorrágica	
1.6 Epigenética	
<b>2 OBJETIVO</b>	<b>23</b>
<b>3 MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1 Estratégia de busca	
3.2 Critérios de elegibilidade	
3.3 Seleção de estudos	
3.4 Extração de dados	
3.5 Síntese de evidências	
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>43</b>
4.1 Características dos estudos incluídos	
4.2 Virus da dengue	
4.3 Mecanismos epigenéticos associados à infecção por DENV investigados por estudos <i>in vitro</i> .	
4.4 Mecanismos epigenéticos associados à infecção por DENV investigados por estudos <i>in vivo</i>	
4.5 Virus Zika	
4.6 Vírus da encefalite japonesa	
4.7 Vírus do Nilo Ocidental	

4.8 Vírus Chikungunya

4.9 Vírus do Congo da Crimeia

**5 DISCUSSÃO 48**

**6 CONCLUSÃO 49**

**REFERÊNCIAS 51**

**ANEXOS 57**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição, distribuição global e famílias

Os arbovírus são transmitidos aos seres humanos por vetores de artrópodes (GOULD *et al.*, 2017). Segundo a OMS são definidos como: “vírus mantidos na natureza através da transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por artrópodes hematófagos, ou por transmissão transovariana e possivelmente venérea em artrópodes”. Eles estão agrupados em cinco famílias: *Flaviviridae*, *Togaviridae* e os menos comumente relatados *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae*. (VASCONCELOS E CALISHER, 2016).

Entre os *Flaviviridae* (Gênero ou grupo: Flavivirus) são vírus típicos: o da Febre amarela, Dengue, Zika vírus, Encefalite Japonesa, Encefalite de St. Louis, do Nilo Ocidental e do Vale Murray, vírus Rocio, Encefalite da Europa Central (transmitida por carrapato), encefalite da primavera-verão russa, vírus Powaassan, febre hemorrágica de Omsk e da doença causada pelo vírus da Floresta Kyasanur (VASCONCELOS E CALISHER, 2016).

Entre os *Togaviridae* (Gênero ou grupo: Alphavirus) são vírus típicos: Chikungya, vírus Sindbis, Mayaro, do Rio Ross, da Floresta Barmah, Encefalites Equinas do Leste, Oeste e Venezuelana (VASCONCELOS E CALISHER, 2016).

Entre os *Bunyaviridae* (Gênero ou grupo: Bunyavirus, Flebovírus, Nairovírus, Hantavírus) são vírus típicos: Vírus do subgrupo Califórnia (La Crosse, Canyon Jamestown, encefalite da Califórnia), Bunyamwer, vírus Oropouche, grupo C, vírus Tahyna, vírus Toscana, febre do flebótomo, vírus Punta Toror, Febre da Sandfly (mosquito pólvora), Febre do Vale Rift e vírus da Crimeia-Congo (VASCONCELOS E CALISHER, 2016).

Entre os *Reoviridae* (Gênero ou grupo: Orbivirus, Coltivirus) são vírus típicos: vírus Orungo, Kemerovo, vírus da febre causada pelo carrapato do Colorado (VASCONCELOS E CALISHER, 2016).

Entre os *Rhabdoviridae* (Gênero: Vesiculovirus) são vírus típicos: vírus da estomatite vesicular (Indiana, New Jersey), vírus Chandipura e Piry (VASCONCELOS E CALISHER, 2016).

A distribuição dos vírus transmitido por artrópodes é ligada diretamente às áreas cohabitadas pelos seus reservatórios e vetores, o que fornece uma distribuição global útil ao diagnóstico diferencial(CALISHER, 1994).

Na América do Norte, se destaca na Família *Bunyarividae*: Encefalite de La Crosse, do Canyon, Jamestown e Califórnia; na Família *Flaviviridae*: Encefalite de St Louis, do Nilo Ocidental, Dengue, Powasan; na Família *Rhabdoviridae*: Estomatite vesicular, *Togaviridae*: Encefalite equina do leste e do oeste. (CALISHER, 1994)

Na América do Sul, se destaca: Família *Bunyarividae*: virus Oropouche, grupo C, vírus Punta Toror; na Família *Flaviviridae*: febre amarela, dengue, zika, vírus Rocio; na Família *Rhabdoviridae*: Estomatite vesicular, infecção pelo vírus Piry; e na Família *Togaviridae*: Chikungunya, vírus Mayaro, encefalite equina venezuelana (CALISHER, 1994).

Na Europa, se destaca: Família *Bunyarividae*: Tahyna, Toscana, febre do flebótomo;na Família *Flaviviridae*: Encefalite do Nilo Ocidental, da Europa Central transmitido por carrapato, da primavera-verão russa; na Família *Togaviridae*: infecção pelo vírus Sindbis CALISHER, 1994).

No Oriente Médio, se destaca: Família *Bunyarividae*: Febre do flebótomo, febre hemorrágica da Criméia-Congo; na Família *Flaviviridae*: Encefalite do Nilo Ocidental, Dengue(CALISHER, 1994).

Na Ásia, se destaca: Família *Bunyarividae*: Febre do flebótomo; na Família *Flaviviridae*: Dengue, encefalite japonesa, da primavera verão russa, febre hemorrágica de Omsk; na Família *Rhabdoviridae*: Infecção pelo vírus Chandipura; Família *Togaviridae* (Sudeste e Sudoeste): Chikungunya. CALISHER, 1994)

Na África, se destaca: Família *Bunyarividae*: Infecção pelo vírus Bunyamwera, febre do Vale Rift; na Família *Flaviviridae*: Febre Amarela, Dengue; na Família *Togaviridae*: infecção pelo vírus Sindbis, Chikungunya (CALISHER, 1994).

Na Austrália, se destaca: Família *Flaviviridae*: Encefalite do Vale Murray, dengue;na Família *Togaviridae*: Infecção pelos vírus do Rio Ross, da Floresta Barmah(CALISHER, 1994).

Os vírus transmitidos por artópodes infectam seus vetores após estes se alimentarem de sangue de um vertebrado virêmico. Após a absorção intestinal e viremia, os vírus alcançam as glândulas salivares durante um período conhecido como incubação extrínseca e que dura tipicamente 1 a 3 semanas nos mosquitos. Nesse momento, o artrópode continua a cadeia de transmissão, infectando o próximo vertebrado quando se alimenta do seu sangue. Um mecanismo alternativo para a perpetuação do vírus no artropode é a transmissão transovariana, comum na família *Bunyaviridae*(KRAEMER *et al.*, 2015).

A distribuição global de arbovírus está diretamente ligada às áreas coabitadas por seus vetores e a maioria delas ocorre tipicamente em regiões tropicais e subtropicais (WEAVER, REISEN, 2010; MAYER *et al.*, 2017). Por exemplo, o Brasil foi recentemente atormentado por epidemias consecutivas, inicialmente com Dengue, Zika e mais recentemente Chikungunya, durante as quais mais de 300.000 casos foram registrados em todo o país (CHARREL *et al.*, 2007). De forma engenhosa, a infecção de vetores de arbovírus não parece afetar a sua aptidão física e são tipicamente não patológicas para estes vetores ao longo da vida. Em contraste, as infecções pelo hospedeiro humano com estes vírus, particularmente as famílias *Flaviviridae* e *Togaviridae*, são geralmente patogênicas e agudas na natureza(MELTZER, 2012). Isso contribui em grande parte para o sucesso da disseminação e persistência viral, representando considerável ônus médico e econômico para os sistemas de saúde das nações endêmicas.

O Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde de agosto de 2018 fez o monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a semana epidemiológica 28, indicando uma tendência à redução dos casos notificados das referidas doenças no Brasil, que teve seu auge em 2016.

### **Categorias clínicas**

A infecção humana por vírus transmitidos por artrópodes tem espectro clínico variável, desde subclínica a apresentações com desfecho fatal. As síndromes clínicas são classicamente agrupadas em quatro categorias: Febre e Mialgia, Artrite e Exantema, Encefalite, Febre hemorrágica, Febre e Mialgia (CLETON *et al.*, 2012).

### 1.1 Febre e Mialgia

Muitos dos numerosos vírus citados podem cursar com a síndrome acima caracterizada como febre e mialgia. A febre costuma ser de início abrupto e associada a calafrios e mal-estar. Artralgia pode estar presente, mas sem artrite. A cefaléia é comum, podendo ser intensa e habitualmente caracterizada como fotofobia e dor retroorbitária. Ao exame físico, os achados incluem hiperemia conjuntival, dor á palpação muscular e epigástrica. Os sintomas duram de dois a cinco dias. Quadros “gripais” desacompanhados de tosse e coriza, exceto em crianças(PATTERSON *et al.*, 2016).

Os arbovírus mais frequentes que se apresentam com febre e mialgia são:

- a. Bunyamwera: Mais comumente encontrado na África e transmitido por mosquitos, esses vírus são encontrados em todos os continentes, exceto Antártica e Australia;
- b. Vírus do grupo C: uma doença de florestas subtropicais, em especial selvas americanas, inclui onze agentes transmitidos por mosquitos;
- c. Vírus Tahyna: Um surto na República Tcheca e Eslovaca permitiu a caracterização da doença – proeminente quadro febril, por vezes associado à faringite e síndrome pulmonares. Raros casos de meningite asséptica. Originário de Califórnia, encontrado em praticamente toda a Europa;
- d. Oropuche: Transmitido pela picada de um ácaro – o *culoides paraensis* – é transmitidos nas Américas Central e do Sul. Meningite asséptica e exantema foram descritos em vários casos;
- e. Febre do flebótomo: conhecido como “febre de três dias” pelo breve período debilitante, é transmitido pelo mosquito-palha e distribuído ao redor do Mediterrâneo, leste dos Balcãs até a China, assim como para o Oriente Médio e Sudoeste asiático;

- f. Vírus Toscana: transmitida pelo mosquito-palha, como peculiaridade, apresenta quadro frequente de meningite asséptica. Visto em todo o mediterrâneo;
- g. Vírus Punta Toro: manifestando-se como uma enfermidade febril sem complicações, essa doença transmitida por mosquito-palha nas Floresta do Novo Mundo não causou epidemias até o momento;
- h. Febre causada pelo carrapato do Colorado: Transmitida em montanhas dessa região entre os meses de março e novembro através da picada do carrapato *Dermacentor andersoni* e apresentando como hospedeiros pequenos mamíferos; para além da síndrome febril, a meningoencefalite também não é rara e foram relatados casos com pericardite, orquite, miocardite e síndrome pulmonares;
- i. Orbivírus: Associados a doenças febris e neurológicas, são transmitidos por mosquitos na África tropical e por carrapatos na Rússia e Europa Central (PATTERSON *et al.*, 2016).

Os quatro diferentes vírus da dengue (dengue 1 ao 4) têm o *Aedes aegypti* como seu principal vetor. A infecção secundária por um sorotipo diferente da primeira infecção pode, em raras ocasiões, cursar com choque hemorrágico da dengue. Após um período de incubação de 2 a 7 dias, o quadro súbito tem como peculiaridade a magnitude de sua mialgia, conhecida como “febre quebra-ossos”. Um exantema maculoso no primeiro dia é um sintoma frequente, assim como adenopatia e vesículas palatais. Epistaxe e petéquias dispersas são achados da dengue não complicada. À despeito dessa classificação, a sobreposição de achados clínicos é comum. Por exemplo, a infecção pelo vírus da dengue é classificada como causadora de febre e mialgia, porém a evolução com febre hemorrágica também é frequente (PATTERSON *et al.*, 2016)

## 1.2 Artrite e Exantema

A artrite é uma manifestação comum de várias doenças virais. Entre as viroses transmitidas por arbovírus se destacam os vírus da família Togaviridae, gênero alphavirus (LWANDE *et al.*, 2015).

A infecção pelo vírus do Rio Ross é transmitida pelo *A.vigilax*, *A.polinesie*, *A.aegypti* e por outros mosquitos. Acredita-se que sua persistência envolva a transmissão transovariana. Várias espécies de mamíferos, como cangurus, foram sugeridas como hospedeiros, mas nenhum hospedeiro definitivo foi identificado. O período de incubação é de uma a duas semanas e o quadro súbito de artralgia de punhos, tornozelos, metacarpofalangianas, interfalangeanas e dos joelhos são as mais comumente envolvidas. O quadro de artrite costuma ser subagudo e o uso de anti-inflamatórios eficaz(LWANDE *et al.*, 2015).

A Febre Mayaro é transmitida por mosquitos do gênero *Haemagogus* e tendo como hospedeiros primatas não-humanos, se apresenta com artralgia de pequenas articulações endêmicas nas florestas das Américas(HALSEY *et al.*, 2013).

A infecção pelo vírus Sindbis é mais comum na região rural norte da Europa é transmitido entre pássaros por mosquitos. Com período de incubação curto, menor que uma semana, a doença que tem pouca manifestação sistêmica se evidencia com exantema macular centrífugo de início concomitante com a artrite poliarticular migratória sem tendência à cronificação (ADOUCHIEF *et al.*, 2016).

A infecção pelo vírus Chikungunya, provavelmente origina-se na África, aonde se perpetuou entre primatas não-humanos pelos mosquitos *Aedes* do subgênero *Stegomyia*, teve globalização para áreas urbanas de diversos continentes pelo *A.aegypti*. De início súbito, após um período de incubação de dois a três dias, um quadro exacerbado de poliartrite migratória de pequenas articulações associado a sintomas constitucionais caracteriza a doença, O desenvolvimento de exantema eritemato-descamativo centrífugo com frequência se associa com a desfervecência, em torno do terceiro dia de doença. A recuperação pode levar semanas, principalmente em pacientes idosos e com positividade do HLA-B27(WEAVER E LECUIT, 2015).

### **1.3 Encefalite**

Na encefalite a fisiopatogenia é semelhante em todos as arboviroses. Após a picada de um artrópode, a viremia presumidamente facilita a entrada multifocal no Sistema Nervoso Central. Outra hipótese é a passagem dos vírus através da lâmina cribiforme do neuroepitélio olfatório. Inicialmente, a doença se apresenta com



síndrome febril associada a adinofagia, vertigem e sintomas respiratórios. A cefaleia, sinais meníngeos, fotofobia e vômitos surgem rapidamente após, seguidos de letargia, sonolência e déficit intelectual, podendo evoluir para o coma. Convulsões e sinas focais podem ocorrer durante todo o decorrer da Encefalite, que pode de dura de três dias a três semanas com quadro de convalescença lento, acompanhado de astenia, tremores, dificuldade de concentração e alterações na personalidade (HOLLIDGE *et al.*, 2010).

Os arbovírus que mais frequentemente se apresentam com encefalite são: Encefalite da Califórnia que é encontrado habitualmente no centro-oeste dos Estados Unidos da América, o termo “Encefalite da Califórnia” inclui o vírus La Crosse e do Canyon Jamestown e outros 12 vírus que podem estar envolvidos com a doença em humanos. O vírus La Crosse é a principal causa de encefalite entre os vírus do subgrupo Califórnia. O mosquito vetor do La crosse é o *A. triseriatus* e os hospedeiros incluem esquilos e pequenos mamíferos, além da transmissão transovariana e venérea entre mosquitos. A doença acontece principalmente em crianças com menos de 15 anos de idade sem sinais prodrômicos, iniciando subitamente com febre, cefaleia e letargia acompanhada de náuseas, vômitos e em 50% dos casos convulsões e em 33% dos casos coma (HOLLIDGE *et al.*, 2010).

Infecção pelo vírus do Oeste do Nilo apresenta como principal vetor o *C. Pipens* e como hospedeiros intermediários gaios azuis e corvos. Inicialmente relatado nos EUA, é encontrado no Canadá, México, África, Oriente Médio, sul da Europa e Ásia. Habitualmente se manifesta apenas com febre, mas pela a proporção de acometimento de sistema nervoso central de 1:100 com alta letalidade habitualmente é classificado no grupo dos vírus causadores de encefalite (PETERSEN *et al.*, 2013).

São as principais encefalites conhecidas:

a. da Europa Central e Encefalite da primavera-verão russa transmitida por carrapato: constituem um espectro de flavivirus transmitidos pelos carrapatos, principalmente o *Ixodes ricinus*, é identificado em todo o continente eurasiático. Apresenta como amplicadores vertebrados os pequenos mamíferos. Tem período de incubação mais longo de uma a duas semanas e se caracteriza por apresentação

em dois tempos: febre e mialgia seguida de remissão de vários dias para então ter apresentação neurológica grave. Pode haver acometimento medular com paralisia respiratória. A mortalidade é alta e as sequelas importantes (VALARCHER *et al.*, 2015).

b. Equina Venezuelana: é causada seis tipos de vírus conhecidos desse complexo e são divididos em epizoóticos e enzoóticos. Os epizoóticos causam epidemias em equinos e seres humanos nas Américas, já os enzoóticos são encontrados nas florestas, tendo como Vetor mosquitos *Culex* e roedores como hospedeiros. A prevenção da encefalite equina epizoótica é feita com a vacinação de cavalos com TC 83 (VALARCHER *et al.*, 2015).

c. Equina do Oeste: é encontrada na costa oeste dos EUA apresenta o *C.tarsalis* como vetor e pardais e tentilhões como hospedeiros intermediários. Homens e cavalos são capazes de serem infectados porém não são amplificadores do vírus na natureza. A apresentação clínica é especialmente grave em crianças (STEELE E TWENHAFEL, 2010).

d. Equina do Leste: é encontrada principalmente em pântanos da costa leste dos EUA, entre junho a outubro o ciclo pássaro-mosquito *Culiseta* se expande com mosquitos *A.sollicitans* e *A.vexans*, mais propensos a picar mamíferos como cavalos. É uma das arboviroses com maior mortalidade e capacidade de lesões irreversíveis que terminam em sequelas (Steele e Twenhafel, 2010).

e. Powassan: apresenta-se como uma doença grave e comumente levam a sequelas, tem 20 casos reconhecidos transmitidos pelo carrapato *I.cookei* com pequenos mamíferos como reservatórios (PIANTADOSI *et al.*, 2016).

f. St Louis é endêmica de baixo nível nas regiões centro e oeste dos EUA nos meses de julho a outubro. O vírus é transmitido entre mosquitos do gênero *Culex* e pássaros. A gravidade da doença aumenta com a idade, estimando-se uma taxa de mortalidade de 20% em indivíduos com mais de 60 anos. Os pacientes frequentemente se queixam de disúria e nesses casos, o antígeno viral pode ser encontrado na urina (PIANTADOSI *et al.*, 2016).

g. Encefalite Japonesa: o vírus é encontrado em toda a Ásia, especialmente durante o verão e particularmente em campos irrigados, propícios para o encontro dos hospedeiros vertebrados aviários com os vetores *C. tritaeniorhynchus*. Os porcos e cavalos também foram descritos como hospedeiros intermediários. A doença é grave e muitas vezes fatal. Existe vacina eficaz disponível (GRIFFITHS *et al.*, 2014).

#### 1.4 Febre Hemorrágica

Com o nome de Febres Hemorrágicas são descritas as arboviroses que se manifestarem com instabilidade vascular e redução da integridade vascular. Os principais vírus relacionados são:

a. Dengue: São diversos os fatores associados com a indução da permeabilidade vascular e choque, como a presença de anticorpos acentuadores e não-neutralizantes, sexo feminino, raça branca, sorotipo 2, infecção secundária e sequência de infecção. A desnutrição é fator protetor. (MELTZER, 2012).

b. Vale Rift :Transmitidos por mosquitos do gênero *aedes* é também um patógeno de ovinos, bovinos e caprinos aonde o vírus é infeccioso também por aerossóis e contato com sangue. São encontrados na África Subsaariana e Península da Arábia. É uma doença incomum de apresentação variável. (MELTZER, 2012).

c. Criméia-Congo: Trata-se de uma febre hemorrágica grave, caracterizada por lesão hepática extensa transmitida por carrapatos do gênero *Hyalomma* com infecção assintomática de animais domésticos, com perigo de infecção na hora do abate (MELTZER, 2012).

d. Febre Amarela: É caracterizada por três a quatro dias de viremia seguida por um período de “intoxicação”, caracterizado por icterícia, hemorragias, em especial digestiva, anúria e alteração do nível de consciência. Alta mortalidade. Epidemias já foram registrada nas Américas, África e Europa. Seu vetor urbano é o *A. Aegypti* e no ciclo silvestre outros mosquitos *Aedes* e macacos como hospedeiros. Existe vacina segura e eficaz (MELTZER, 2012).

De um modo geral, nas fases iniciais da viremia, os testes da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RCP-TR) podem estabelecer o diagnóstico. O ensaio de imunoabsorção ligada a enzima (ELISA) IgM costuma ser

útil após o período de viremia, frequentemente, após o 7 dia de doença. O ELISA IgG é útil na avaliação de exposição anterior (KRAEMER *et al.*, 2015; NEGREDO ANTON *et al.*, 2015). Nenhum dos exames citados, no entanto, é capaz de sugerir prognóstico. Os vírus zoonóticos estão sofrendo evolução genética e desenvolvendo mecanismos de interação com o genoma humano. A identificação dessas interações e seu possível uso para previsão de prognóstico estão sendo estudados pela epigenética.

O papel dos estímulos ambientais sempre foi assumido, mas amplamente inexplorado até recentemente devido à indisponibilidade de abordagens experimentais (KRAEMER *et al.*, 2015). A epigenética é um campo de pesquisa promissora e representa uma mudança de paradigma, uma vez que leva em conta os estímulos ambientais que modificam a regulação gênica, sem necessariamente alterar as sequências de DNA centrais do hospedeiro.

## **Epigenética**

O termo epigenética é usado para se referir às modificações da regulação genética ocasionadas por estímulos ambientais. Essas mudanças não são secundárias às alterações no sequenciamento do DNA. Essas alterações podem persistir nas gerações seguintes de células, passando de célula mãe para filha durante a replicação, o que é conhecido como regulação genética transgeracional (DEANS E MAGGERT, 2015). O DNA “funcionante” nos eucariotas se apresenta em forma de cromatina disposta ao redor do núcleo de histonas. Assim sendo, os maiores contribuintes da regulação epigenética são o DNA e as histonas H2A, H2B, H3 E H4 (BALAKRISHNAN E MILAVETZ, 2017).

Paulatinamente esses mecanismos estão sendo melhor entendidos. São processos bem caracterizados na regulação epigenética: as modificações e variantes de histonas, além da metilação do DNA, a localização no nucleossoma e RNA regulatório (miRNA) segundo Balakrishnan e Milavetz (2017).

O DNA pode ser epigeneticamente regulado através da introdução de um grupo metil para citosina da sequência CpG. Esse processo é conhecido como metilação do DNA e mediado através de enzimas metiltransferases. A metilação do DNA é usualmente associada com o silenciamento da expressão genética ou

repressão da transcrição. Existem três metiltransferases reconhecidas no DNA mamífero: Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b. A Dnmt1 pode ser a responsável pela manutenção do estado de metilação durante a replicação. As outras duas metiltransferases Dnmt3a e Dnmt3b, parecem atuar no silenciamento do DNA através da metilação dita “de novo” da citosina (TAJIMA *et al.*, 2016).

As histonas também são reconhecidas pela sua regulação epigenética feita através das suas variantes ou através das modificações pós-tradução de seus aminoácidos. Geralmente as alterações nos aminoácidos consistem na substituição de valina por alanina nas regiões não-terminais. As variantes de histonas bem descritas são: variantes H3: H3.1, H3.2, H3.3 e a CenH3 humana, a CENP-A e variantes H2: H2A.Z, H2A.X e macroH2A (HUANG *et al.*, 2014). As variantes H3.1 e H3.2 estão associadas com nova replicação de cromatina. Já a H3.3 está associada com transcrição ativa de cromatina. A interação entre o DNA e as histonas é usualmente desregulada na replicação e transcrição, sendo regenerada após a finalização desse processo. A regeneração nucleossomal envolve histonas, chaperona e proteínas. Por exemplo, a H3.3 interage com HIRA durante a transcrição e CENP-A com HJURP que reconhece a região centromérica. As variantes H2, a H2A.X parece estar diretamente relacionada com a reparação do DNA, já a macroH2A está associada com regiões reprimidas (BALAKRISHNAN E MILAVETZ, 2017).

As modificações pós-tradução de histonas incluem acetilação, metilação, fosforilação, ribolisação de ADP e ubiquitilação. A acetilação do H3 (lisinas 9 e 14) e H4 (lisinas 5, 8, 12, 16 e 20) são associadas à ativação de cromatina pós-tradução (LIU E XU, 2015).

A patogenicidade e a gravidade das manifestações clínicas causadas por arbovírus provavelmente envolvem mecanismos de regulação epigenética, presentes na interface hospedeiro-patógeno. Um exemplo é o RNA de interferência (RNAi) como um mecanismo hospedeiro que age como uma resposta imune contra moléculas exógenas, incluindo vírus. Em resposta, os vírus são capazes de neutralizar as defesas das células do hospedeiro produzindo fatores conhecidos como supressores de RNAi (OLSON; BLAIR, 2015). Além disso, foram propostos outros eventos epigenéticos que incluem a neutralização seletiva dos RNAs

mensageiros (mRNAs) utilizados na tradução de proteínas pelo RNA de interferência (RNAi), como micro RNA (miRNA) e pequeno RNA de interferência (siRNA)(MILAVETZ E BALAKRISHNAN, 2015).

Alterações epigenéticas podem ser desencadeadas por vários fatores extrínsecos e são relevantes para a homeostase do hospedeiro e funções corporais. Assim, a identificação de alterações epigenéticas decorrentes de infecções por arbovírus e conectadas à ativação imunológica é importante para compreender os mecanismos fisiopatológicos que determinam o curso e a gravidade das doenças causadas por arbovírus e para apontar novas perspectivas diagnósticas, prognósticas e alvos terapêuticos.

Até onde sabemos, nenhuma revisão anterior sintetizou as alterações epigenéticas do hospedeiro de infecções por arbovírus. Assim, torna-se importante uma revisão sistemática de estudos originais in vivo e in vitro, que investigue marcadores epigenéticos humanos decorrentes de infecções por arbovírus em pacientes e em linhas celulares humanas.

## **2. OBJETIVO**

Fazer uma revisão sistemática dos marcadores epigenéticos decorrentes de infecções por arbovírus em pacientes e em linhas celulares humanas para detectar as principais alterações epigenéticas.

### **3.MÉTODOS**

#### **3.1 Estratégias de busca**

As bases de dados eletrônicas PubMed / MEDLINE, Science Direct e Cochrane Library foram pesquisadas desde o início das bases até 4 de janeiro de 2018. Foram definidas como palavras-chaves de busca: epigenetic\* or dna methylation or micro-RNA or histone AND arbovirus\* or flavivirus\* or dengue or zika or chikungunya, além da intercessão dos termos. Seguimos a declaração Preferred Reporting Items for Systematic Reviews e Meta-Analyzes (PRISMA) segundo Moher *et al*( 2009).

#### **3.2 Critérios de elegibilidade**

Critérios de inclusão: estudos originais, *in vitro* ou *in vivo*, referentes a marcadores epigenéticos relacionados à infecção humana por arbovírus. Estudos in

vitro ou in vivo compreendiam linhagem de células humanas ou pacientes. Os marcadores epigenéticos consistiam, mas não se limitavam a, alterações na metilação do DNA, modificações pós-transcricionais de histonas que afetavam a expressão gênica, os mecanismos de supressão de iRNA. Nenhuma restrição de idioma foi aplicada e relatórios de qualquer país foram incluídos para evitar viés de publicação. Publicações não originais, como revisões, cartas ou comentários, foram excluídas. Estudos utilizando linhas celulares animais, estudos pré-clínicos em animais, pesquisas in silico, bem como investigações limitadas a modificações epigenéticas no arbovírus ou no vetor artrópode foram também excluídos.

### **3.3 Seleção de estudos**

Dois investigadores (GA e BD) selecionaram de forma independente os títulos e resumos das referências. Após essa triagem primária, os textos completos dos relatórios selecionados foram obtidos, e os mesmos autores revisaram independentemente cada artigo para determinar sua inclusão final na revisão. Sempre que não se chegou a um consenso, um terceiro autor (CL ou FM) tomou a decisão final sobre a inclusão.

### **3.4 Extração de dados**

Dois autores (GA e BD) extraíram independentemente os dados das referências incluídas usando um formulário padronizado. As discrepâncias foram resolvidas por consenso. As seguintes informações foram registradas para cada estudo: autor, ano, vírus, sorotipo, doença, marcador epigenético e principais resultados. Para estudos in vitro, também notamos a linhagem celular investigada. Para estudos in vivo, as características clínicas da amostra foram registradas.

### **3.5 Síntese de evidências**

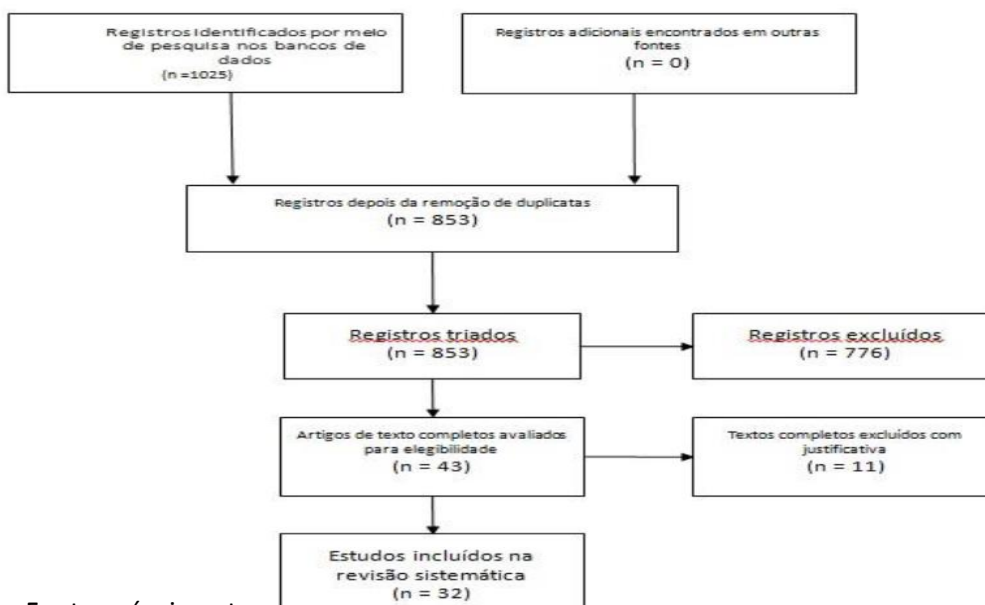
Devido à heterogeneidade do desenho do estudo, participantes e desfechos, realizamos uma síntese narrativa dos estudos incluídos, resumindo os achados em relação a cada arbovírus.



#### 4.RESULTADOS

A busca nas referidas bases de dados eletrônicas gerou 1.025 referências. Nenhuma referência adicional foi encontrada na busca manual das listas de referência dos artigos incluídos. Após a exclusão de duplicatas, 853 referências foram selecionadas para triagem de título / resumo, das quais 43 eram elegíveis para revisão de texto completo. Onze artigos de

Figura 1: Fluxograma PRISMA



Fonte: próprio autor

textos completos foram excluídos e os motivos justificados no anexo 1. Por fim, 32 artigos foram incluídos nesta revisão sistemática (Colpitts *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2012; Kakumani *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2013; Bogerd *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Selvamani *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Escalera-Cueto *et al.*, 2015; Kakumani *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015; Slonchak *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Casseb *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2016; Kakumani *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2016; Lichinchi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Ouyang *et al.*, 2016; Tambyah *et al.*, 2016; Demir *et al.*, 2017; Devhare *et al.*, 2017; Diossa-Toro *et al.*, 2017; Kanokudom *et al.*, 2017; Kozak *et al.*, 2017; Pu *et al.*, 2017; Rastogi *et al.*, 2017; Bayer *et al.*, 2018). O fluxograma PRISMA de seleção do estudo para esta revisão sistemática encontra-se sintetizado na figura 1.

#### **4.1 Características dos estudos incluídos**

Esta revisão sistemática incluiu sete estudos *in vivo*:(Qi *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Ouyang *et al.*, 2016; Tambyah *et al.*, 2016; Demir *et al.*, 2017) e 25 estudos *in vitro*:(Colpitts *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2012; Kakumani *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Bogerd *et al.*, 2014; Selvamani *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Escalera-Cueto *et al.*, 2015; Kakumani *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015; Slonchak *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Casseb *et al.*, 2016; Kakumani *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2016; Lichinchi *et al.*, 2016; Devhare *et al.*, 2017; Diossa-Toro *et al.*, 2017; Kanokudom *et al.*, 2017; Kozak *et al.*, 2017; Pu *et al.*, 2017; Rastogi *et al.*, 2017; Bayer *et al.*, 2018). Os estudos *in vitro* usaram diferentes linhas celulares humanas, incluindo três com linhas celulares de monócitos humanos:(Wu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Pu *et al.*, 2017); seis com linhas celulares de fígado humano:(Colpitts *et al.*, 2011; Kakumani *et al.*, 2013; Bogerd *et al.*, 2014; Escalera-Cueto *et al.*, 2015; Kakumani *et al.*, 2016; Kanokudom *et al.*, 2017); seis estudaram células neuronais:(Sharma *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2016; Devhare *et al.*, 2017; Kozak *et al.*, 2017; Rastogi *et al.*, 2017); cinco utilizaram linhas celulares renais derivadas de humanos:(Kakumani *et al.*, 2013; Saxena *et al.*, 2013; Kakumani *et al.*, 2015; Slonchak *et al.*, 2015; Lichinchi

*et al.*, 2016). Dois estudos foram baseados em fibroblastos humanos:(Pham *et al.*, 2012; Selvamani *et al.*, 2014); estudos isolados foram realizados com células natural killer(Liu *et al.*, 2016), células epiteliais(Casseb *et al.*, 2016), trofoblastos humanos(Bayer *et al.*, 2018) e células endoteliais vasculares humanas (Wu *et al.*, 2014).

Os estudos *in vivo* incluíram um total de 171 casos e 102 controles. Os tamanhos das amostras variaram de 6 a 89 participantes. Todos esses estudos foram publicados em inglês. A descrição e as características dos estudos incluídos nesta revisão sistemática são fornecidas no anexo 2.

Marcadores epigenéticos associados a respostas do hospedeiro a infecções arbovirais foram relatados principalmente para dengue perfazendo no total 20 estudos:(Colpitts *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2012; Kakumani *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Bogerd *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Escalera-Cueto *et al.*, 2015; Kakumani *et al.*, 2015; Casseb *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2016; Kakumani *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Ouyang *et al.*, 2016; Tambyah *et al.*, 2016; Diosa-Toro *et al.*, 2017; Kanokudom *et al.*, 2017; Kozak *et al.*, 2017; Pu *et al.*, 2017). Em seguida temos Zika com quatro estudos: (Lichinchi *et al.*, 2016; Devhare *et al.*, 2017; Kozak *et al.*, 2017; Bayer *et al.*, 2018) e encefalite japonesa com quatro trabalhos: (Sharma *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2016; Rastogi *et al.*, 2017). Chikungunya apresentou dois estudos: (Saxena *et al.*, 2013; Selvamani *et al.*, 2014). A doença do Oeste do Nilo apresentou um estudo Bogerd *et al.*(2014) e a febre hemorrágica da Criméia-Congo um outro de Demir *et al.*(2017).

No geral, os estudos investigaram uma série de modificações epigenéticas, principalmente miRNAs / siRNAs sendo o total de 25 estudos: (Colpitts *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Bogerd *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Escalera-Cueto *et al.*, 2015; Kakumani *et al.*, 2015; Casseb *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2016; Kakumani *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Ouyang *et al.*, 2016; Tambyah *et al.*, 2016; Diosa-Toro *et al.*, 2017; Kanokudom *et al.*, 2017; Pu *et al.*, 2017); supressão de RNAi em 3 estudos (Kakumani *et al.*, 2013; Kakumani *et al.*, 2015; Kumari *et al.*, 2016). As modificações

de reguladores de RNAi apresentaram dois estudos :(Bogerd *et al.*, 2014; Bayer *et al.*, 2018); um estudo sobre metilação do DNA (Colpitts *et al.*, 2011). Apenas o estudo de Colpitts *et al.*(2011) descreveu as interações de proteínas virais com histonas.

#### **4.2 Virus da dengue(DENV)**

A maioria dos estudos incluídos nesta revisão investigou o DENV, no entanto, esses estudos analisaram diferentes sorotipos e tipos de células. No total, 20 estudos investigaram marcadores epigenéticos associados à infecção por DENV: (Colpitts *et al.*, 2011; Pham *et al.*, 2012; Kakumani *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2013; Bogerd *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Escalera-Cueto *et al.*, 2015; Kakumani *et al.*, 2015; Casseb *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2016; Kakumani *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016; Ouyang *et al.*, 2016; Tambyah *et al.*, 2016; Diosa-Toro *et al.*, 2017; Kanokudom *et al.*, 2017; Kozak *et al.*, 2017; Pu *et al.*, 2017). Catorze deles conduziram estudos *in vitro*, utilizando uma variedade de linhas celulares humanas (incluindo macrófagos / monócitos, células hematopoiéticas, células de hepatocarcinoma Huh7, células endoteliais EAhy926, células de câncer de fígado HepG2 e células de câncer de pulmão A-549). Seis estudos investigaram marcadores no sangue de amostras clínicas. A maioria dos estudos se concentrou em um sorotipo específico para DENV, ou seja, DENV-2 (10 estudos), DENV-4 (2 estudos), DENV-1 (1 estudo). Os outros sete estudos não informaram o sorotipo do DENV. Uma descrição dos estudos *in vitro* e *in vivo* incluídos é resumida separadamente nas seções abaixo.

#### **4.3 Mecanismos epigenéticos associados à infecção por DENV investigados por estudos *in vitro*.**

A maioria dos estudos *in vitro* de DENV se concentrava em investigar a interação de sorotipos específicos de DENV com linhagens de células humanas e as alterações epigenéticas desencadeadas associadas à replicação viral ou à resposta imune do hospedeiro. Estes estudos concentraram-se principalmente em mecanismos baseados em RNAi, com oito deles investigando a expressão de miRNA / siRNA. Destes, dois usaram ferramentas de alto rendimento para

determinar os perfis de expressão epigênica, enquanto os seis outros miRNAs examinados eram associados à infecção por DENV *a priori*. (DIOSA-TORO *et al.*, 2017) utilizaram *small RNA-Seq analysis* para investigar o miRNAome e seu papel na infecção de macrófagos humanos por DENV. Eles descobriram que apenas o miR-3614-5p foi regulado positivamente em células DENV negativas e sua superexpressão reduziu a infectividade do DENV. Em contraste, o miR-3614-5p modificou a expressão de adenosina desaminase que atuam no RNA (ADAR1), uma enzima de edição de RNA que se esperava ter um papel antiviral, mas que, ao contrário, foi relatada como facilitadora da replicação viral. Suas descobertas confirmam o papel do miR-3614 como regulador da infecção pelo DENV. O outro estudo (ESCALERA-CUETO *et al.*, 2015) utilizaram *microarrays* e PCR quantitativo para estudar a expressão de miRNAs em células de hepatoma humano (Huh-7) infectadas com DENV-2. Ao investigar os perfis de expressão longitudinal de miRNAs, os autores observaram que apenas Let-7c foi superexpresso em diferentes momentos após a infecção com DENV-2, com um pico às 12h pós-infecção. A superexpressão de Let-7c aparentemente correlacionou-se com a redução da replicação de DENV através do direcionamento do fator de transcrição BACH-1, cujo principal alvo infra regulado é a enzima HO-1, um marcador associado ao estresse oxidativo celular. Como tal, a regulação negativa de BACH-1 está implicada na regulação positiva de HO-1 e estes resultados corroboram com o fato de Let-7c ter um efeito antiviral através da modulação de BACH-1 e HO-1, aumentando o stress oxidativo celular. No geral, os dois estudos acima fornecem evidências de parâmetros epigenéticos associados à replicação viral, seja por alvos infra-regulados ou supra-regulação de miRNA, embora isto possa ser devido a eventos específicos decorrentes da utilização de linhas celulares distintas e / ou serótipos de DENV.

O papel do miR-223 na regulação da replicação do DENV-2 foi estudado por (WU *et al.*, 2014) que usaram três pacotes de software (miRanda, PicTar e Target Scan) para prever os genes-alvo do miR-223. A análise sugeriu que o miR-223 tinha como alvo o gene desestabilizador dos microtúbulos STMN1, e experimentos subsequentes demonstraram altos níveis de STMN1 durante a replicação viral. O estudo sugere que o miR-223 controla a replicação do DENV-2, regulando negativamente o STMN1. O mesmo grupo também analisou o papel do miR-146a na

replicação de DENV usando células monocíticas humanas infectadas com os sorotipos DENV-1, 2 ou 3 (WU *et al.*, 2013). Os níveis de expressão de miR-146a medidos por PCR quantitativa foram significativamente aumentados após a infecção por qualquer um dos sorotipos de DENV. Essas alterações se correlacionam com níveis diminuídos da proteína do fator 6 associado ao TNFR (TRAF6) e do interferon secretado (IFN)  $\beta$ . O estudo sugere que o miR-146a facilita a replicação do DENV, visando o TRAF6 e conseqüentemente reduzindo os níveis de IFN- $\beta$ .

O estudo do papel das células hematopoiéticas na modulação da replicação de DENV, visando o miR-142, um dos miRNAs específicos mais hematopoiéticos, foi feito por (PHAM *et al.*, 2012). Após a infecção com DENV-2, eles mostraram que a incorporação de miR-142 nos 3'UTR dos locais alvos dos genes induziu uma atenuação endógena do vírus em células hematopoiéticas, mas não em células não hematopoiéticas.

Um trabalho recente de (KANOKUDOM *et al.*, 2017) examinou a expressão de 7 miRNAs escolhidos a partir do miRbase. Após a infecção da linha celular HepG2 de câncer do fígado humano com DENV-2, apenas o miR-21 foi expresso de forma diferente, em que se verificou que a sua regulação positiva promove a replicação do DENV.

O possível papel do miR-30e na modulação da imunidade inata associada à infecção por DENV foi analisado por (ZHU *et al.*, 2014). As linhas celulares de monócitos humanos foram infectadas com os sorotipos DENV-1, DENV-2 ou DENV-3, e a expressão do miR-30e foi medida por PCR quantitativa. Os resultados mostraram que a infecção com os três sorotipos induziu significativamente a expressão de miR-30e. Além disso, o silenciamento do miR-30e foi associado a um aumento na replicação do DENV, independentemente do sorotipo testado. Uma investigação adicional em alvos infra regulados mostrou que o miR-30e induziu significativamente a expressão da proteína IFN- $\beta$ . Finalmente, a superexpressão simultânea da proteína I $\kappa$ B $\alpha$  ORF (sem 3'-UTR) em células superexpressas com miR-30e restaurou os níveis de proteína celular I $\kappa$ B $\alpha$ . Em conjunto, isso sugere que

o miR-30e ataca diretamente as sequências 3'-UTR de I $\kappa$ B $\alpha$ , aumentando assim a produção de IFN- $\beta$  e conseqüentemente suprimindo a replicação de DENV.

Trabalho recente de Pu *et al.*(2017) sobre o papel do miR-146a na via da autofagia induzida pela infecção pelo DENV-2 em células epiteliais de carcinoma de pulmão humano (A-549) confirmaram que a superexpressão de miR-146a estava associada a níveis reduzidos de TRAF6. Essa proteína suprime a formação do autofagossoma e reduz a cadeia leve da proteína 3 associada ao microtúbulo (LC3), constituindo-se em um marcador para autofagia. Estes resultados sugerem que o miR-146a é um regulador negativo da autofagia induzida por DENV, e o TRAF6 é um dos principais alvos deste microRNA mediando este processo. Em conjunto, a modulação dos alvos associados a DENV pode potencialmente suprimir a inflamação excessiva nas células hospedeiras, diminuindo assim o dano patológico causado pela infecção por DENV.

A resposta do RNAi do hospedeiro é regulada por ribonucleases que controlam o processamento de miRNAs e siRNAs, como os complexos Dicer, Drosha, Ago1 e Ago2 (AGRAWAL *et al.*, 2003). Estas enzimas podem ser alvo de componentes virais para regular mecanismos de iRNA do hospedeiro. No geral, cinco estudos investigaram a associação da infecção por DENV e a função dessas enzimas críticas.

Há cinco anos Kakumani *et al.*(2013) demonstraram que a infecção das células Huh7 do hepatoma humano pelo DENV reduz a expressão dos reguladores de resposta do RNAi, incluindo Dicer, Drosha, Ago1 e Ago2. Além disso, eles mostraram que a replicação de DENV aumentou após a supressão desses reguladores de RNAi. Os autores demonstraram que a proteína viral não-estrutural 4B (dvNS4B) age como um supressor de iRNA. De fato, a NS4B medeia a supressão de RNAi através dos domínios transmembranares 3 e 5 (TMD3 e TMD5), independentemente das suas propriedades antagonistas do interferon, uma vez que o NS4B pode inibir diretamente o processo de corte. Um estudo de acompanhamento do mesmo grupo (KAKUMANI *et al.*, 2015) mostrou que a proteína não-estrutural 3 do DENV (dvNS3) é outro componente do DENV que potencialmente atua como um supressor de iRNA em linhas celulares humanas. Esses achados dão suporte ao papel da dvNS3 em favorecer a replicação viral, seja

protegendo o genoma viral da degradação, seja operando os níveis de transcrição do hospedeiro através da regulação do miRNA. Em resumo, ambos os estudos sugerem que o DENV codifica proteínas supressoras para regular sua replicação em linhas celulares de mamíferos. Finalmente, outro estudo de acompanhamento identificou que a proteína de choque térmico mitocondrial GRP75 (que também faz parte do complexo Dicer humano) está envolvida no processamento da hsa-miR-126, que restringe a replicação DENV em linhas celulares humanas (KAKUMANI *et al.*, 2016).

Os níveis de expressão dos genes que codificam Drosha, DGCR8 e Dicer após a infecção de células humanas A-549 com DENV-4 foi o objeto de estudo de (CASSEB *et al.*, 2016). DGCR8 é uma proteína de ligação de RNA de cadeia dupla que interage com Drosha e facilita a maturação de miRNA. Os níveis de mRNA de Dicer, Drosha e DGCR8 foram todos significativamente regulados negativamente após a infecção, atingindo o menor nível aos três dias após a infecção e coincidindo com um aumento na replicação viral. Dadas que estas alterações mediadas por DENV-4, espelham os eventos descritos *in vivo* e em tempo real e que implicam nas vias de sinalização de receptores Toll-like (TLR) e interleucina (IL-1), os autores concluíram que as mudanças no padrão de expressão gênica dos reguladores de RNAi estavam influenciando diretamente o sistema imune inato do hospedeiro.

Em 2014 Bogerd *et al.* (2014) empregaram linhas de células humanas que não possuíam a função Dicer para fornecer melhores informações sobre os efeitos dos miRNAs na replicação de DENV. O estudo teve dois princípios racionais. Primeiro, se um vírus é dependente de um miRNA específico, as células deficientes em Dicer devem ser parcial ou totalmente não-permissivas com a replicação do vírus. Da mesma forma, se um miRNA endógeno ou siRNA prejudicasse a replicação viral, o processo de replicação seria acelerado em células deficientes em Dicer. Por outro lado, suas descobertas parecem sugerir que, em geral, a replicação viral em humanos não é inibida nem aumentada pela perda completa de miRNAs humanos endógenos, o que, por sua vez, sustenta o fato de que vírus do tipo selvagem desenvolveram mecanismos para escapar da supressão mediada do miRNA hospedeiro da expressão do gene viral durante os ciclos de replicação. Como a replicação do DENV pode não depender necessariamente da presença /



ausência de miRNAs endógenos, seu estudo inferiu que a manipulação dos níveis de miRNA pode não ser tão eficaz para lidar com a replicação do DENV como se pensava anteriormente.

Por fim, um único estudo investigou a associação da função das histonas com a infecção por DENV e a resposta do hospedeiro. Utilizando a linha celular de fígado humano Huh7 infectada com o sorotipo DENV-2, (COLPITTS *et al.*, 2011) usaram um ensaio de purificação por afinidade em tandem (TAP) para avaliar quais proteínas nucleares da célula hospedeira estavam ligadas à proteína DENV-capsídeo (C). Eles descobriram que as proteínas histonas nucleares H2A, H2B, H3 e H4 eram de fato alvos específicos do DENV C. A colocalização de proteínas virais com todas as quatro histonas no citoplasma de células infectadas demonstrou a formação de dímeros, que curiosamente eram resistentes a calor e desnaturação. Portanto, o DENV C pode se ligar às histonas antes de entrar no núcleo, ou puxá-las para o citoplasma depois de ser translocado para o núcleo e se ligar às histonas.

Além disso, o DENV C liga-se ao DNA celular, diretamente ou formando um complexo com histonas centrais. Isso leva à ruptura da dimerização das histonas e à formação de nucleossomos, resultando em alterações na expressão gênica, comprometimento da transcrição do DNA, aumento do dano ao DNA e, supostamente, uma mudança que favorece a tradução do mRNA viral sobre o celular. Os autores também relataram que os níveis das quatro proteínas histonas examinadas aumentaram após a infecção e que a presença do vírus DENV-2 foi associada a mudanças na fosforilação da H2A ao longo do tempo. Às 24 h após a infecção, a fosforilação da H2A foi significativamente maior do que nas células não infectadas. Em contraste os dados revelaram diminuição da fosforilação em 48 horas após a infecção, enquanto os níveis aumentaram novamente tanto em 72 h e 96 h após a infecção. Em conclusão, este estudo sugere que a proteína capsidial do vírus DENV-2 pode ter como alvo as histonas para interromper o mecanismo genético da célula hospedeira em favor da replicação viral e a perpetuação de seu ciclo de vida.

#### **4.4 Mecanismos epigenéticos associados à infecção por DENV investigados por estudos *in vivo***

Vários estudos investigaram amostras de sangue de pacientes infectados com DENV para prospectar indicadores epigenéticos com potencial diagnóstico e / ou terapêutico. (OUYANG *et al.*, 2016) coletaram um total de 72 amostras de soro (ou seja, 40 pacientes com replicação ativa de DENV-1 e 32 controles saudáveis). Inicialmente, foram feitos perfis seis amostras de soro (3 pacientes e 3 controles) usando arranjos de PCR miRNA no sangue. Em comparação com controles saudáveis, 41 miRNAs foram encontrados aumentados e mais 12 miRNAs foram reprimidos no soro de pacientes com DENV-1. A análise de validação foi realizada com as amostras restantes usando PCR quantitativo e confirmou que apenas miR-21-5p, miR-590-5p, miR-188-5p e miR-152-3p foram suprarregulados, enquanto apenas miR-146-5p foi infraregulado em pacientes infectados com DENV-1. Curvas de características de operação do receptor (ROC) e análise de correlação foram realizadas para avaliar o potencial desses miRNAs para o diagnóstico de infecção por DENV. A curva ROC sugeriu que apenas o miR-21-5p e o miR-146a-5p séricos poderiam razoavelmente discriminar pacientes infectados com DENV de controles saudáveis.

Amostras de sangue de pacientes infectados com DENV foram investigadas para selecionar miRNAs que poderiam estar associados aos mecanismos fisiopatológicos. Os pacientes infectados pelo vírus influenza foram usados como um grupo controle para determinar a especificidade dos miRNAs diferencialmente expressos para a infecção por DENV. Os resultados mostraram que 12 miRNAs (miR-450b-5p, miR-491-5p, miR-499a-3p, miR-512-5p, miR-615-5p, miR-624-5p, miR-892b, miR-1204, miR-1225-5p, miR-3121-3p, miR-4259 e miR-4327) foram especificamente relacionados com casos de dengue aguda (TAMBYAH *et al.*, 2016).

O perfil de expressão de citocinas e miRNA foi objeto de estudo de (Qi *et al.*, 2013) que relataram resultados de miRNA e perfis de citocinas inflamatórias das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de 24 pacientes infectados com DENV-2. As mudanças na expressão de citocinas foram investigadas usando matrizes multiplex com níveis do ligante 5 da quimiocina (motivo CC) (CCL5), IL-6 e IL-8 aumentados em PBMCs infectados com DENV-2 em comparação com PBMCs não infectados, enquanto os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-10, MCP-1 e CCL4 estavam diminuídos em comparação com as PBMC não infectadas. A análise inicial dos

arranjos miRNA identificou 11 miRNAs supra-regulados e 4 infra-regulados com análise de replicação usando análises quantitativas de PCR, confirmando que miR-106b, miR-20a e miR-30b estavam regulados negativamente em PMBCs infectados com DENV-2, enquanto miR-4290, miR-let-7e, miR-1290 e miR-33a foram encontrados para ser sobre-regulados. Enquanto análises de acompanhamento *in silico* sugeriram que o miR-106b pode ter como alvo mRNA de CCL5, o miR-let-7e inibiu a expressão de mRNA de CCL3 e IL-6. Em conjunto, isso apoia o papel dos miRNAs na modulação da ativação imunológica de PMBCs infectados com DENV-2, destacando que os miRNAs específicos visam mediadores inflamatórios específicos.

O papel dos miRNAs na regulação do supressor da sinalização de citocinas 1 (SOCS1) e sua associação com a febre hemorrágica da dengue (FHD) foi estudado por Chen *et al.*(2014). O SOCS1 é um regulador negativo da sinalização de citocinas e pode estar envolvido no desenvolvimento de DH durante a infecção por DENV. Utilizou-se PCR quantitativo para medir o mRNA de SOCS1 e sua influência reguladora nos níveis de miRNA em PBMCs obtidos de sangue de pacientes com dengue não-hemorrágica (DF) versus FHD. Pacientes com DF, mas não com FHD, apresentaram níveis mais altos de SOCS1, assim como aumento da produção de IFN- $\gamma$ . Por outro lado, pacientes com FHD tiveram aumento da produção de IL-10. Os níveis de miR-221 e miR-572 foram maiores em pacientes com DF quando comparados a ICD. Por outro lado, os pacientes com DF apresentaram níveis reduzidos de miR-150 em comparação com a FHD. No que diz respeito à expressão de mRNA de SOCS1, isto foi inversamente correlacionado com a expressão de miR-150 nos PMBCs de pacientes com FHD, com uma experiência *in vitro* replicando esta associação usando PMBC infectados com DENV-2. Em conjunto, estes resultados confirmam que a expressão de SOCS1 é reduzida em PBMC derivadas de pacientes com FHD, que por sua vez foi significativamente associada com a regulação positiva dos níveis de miR-150 de uma maneira dependente da dose.

O papel dos miRNAs na regulação da granzima B (GrzB), uma serina protease encontrada nos grânulos de linfócitos citotóxicos (CTLs), células natural killer (células NK) e células T citotóxicas foi estudado por Liu *et al.*(2016). Os pacotes de software miRanda e TargetScan foram usados para prever sequências de miRNAs que potencialmente se ligam às regiões 3-UTR das seqüências de

RNA<sub>m</sub> de perforina (PRF1) e GrzB e, como resultado, regulam a expressão dessas moléculas citotóxicas em humanos. Eles mediram os níveis de expressão dos miRNAs selecionados por análise *in silico* (ou seja, miR-27a \*, miR-30e e miR-378) usando ensaios quantitativos de PCR. Todos os três miRNAs foram relatados como *infra* regulados, mas miR-378 exibiram potencial de ligação notavelmente maior para a 3'UTR de GrzB em comparação com a seqüência análoga de mRNA PRF1. Portanto, este estudo sugere que o miR-378 é um elemento chave na resposta imune do hospedeiro, modulando a produção de GrzB de células NK durante a infecção aguda por DENV.

Um único estudo examinou o status de metilação de genes que codificam proteínas que modulam a resposta imune inata (GOMES *et al.*, 2016). Estes autores utilizaram ensaios de PCR específicos para metilação para identificar o status de metilação dos promotores dos genes IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  no DNA extraído do sangue periférico de indivíduos infectados com DENV. Sua análise comparativa mostrou que esses pacientes apresentavam desmetilação significativa no TNF- $\alpha$ , mas não nas regiões promotoras do IFN- $\gamma$ .

#### **4.5 Virus Zika (ZIKV)**

No total, quatro estudos *in vitro* investigaram modificações epigenéticas associadas à infecção por ZIKV: Bayer *et al.*(2018) investigaram a hipótese de que o cluster de miRNA do cromossomo 19 trofoblástico (C19MC) expresso em trofoblastos humanos primários (PHTs) poderia reduzir a infecção pelo ZIKV em células não trofoblásticas. Os PHTs são relativamente resistentes à infecção por vários vírus. O fato de que a resistência ao ZIKV é perdida em células-tronco embrionárias quando elas são diferenciadas em uma linhagem de trofoblasto precoce sugere que os trofoblastos de termo utilizam um conjunto diversificado de vias antivirais para proteger a placenta e, conseqüentemente, o feto, da infecção pelo ZIKV. No entanto, nos estágios iniciais da gravidez, quando as linhagens embrionárias estão sendo diferenciadas, há um provável período de vulnerabilidade de trofoblasto que aparentemente termina quando a placenta vilosa subsequente emerge e começa a amadurecer. Portanto, o C19MC pode regular a suscetibilidade de células não trofoblásticas ao ZIKV. Em seu trabalho, células de osteossarcoma humano U2OS foram transfectadas com os membros mais expressos de C19MC

(miR-512-3p, miR-516b, miR-517a e miR-525-5p) e infectados com ZIKV. O miRNA C19MC reduziu a infecção por ZIKV, como denotado por uma queda de 50% na produção de RNA viral. Como as células PHT também podem regular IFNs tipo III como uma via secundária para alcançar resistência à infecção, foi demonstrado que C19MC não exerce nenhum efeito sobre genes estimulados por interferon, e que IFNs tipo III não afetam os níveis de expressão de miRNAs em U2OS células. Juntos, esses achados fornecem evidências de que os miRNAs estimulam a resistência à doença por meio de uma via independente do IFN tipo III.

Os mecanismos associados ao comprometimento mediado pelo ZIKV da diferenciação de células-tronco neurais humanas (hNSC) e do crescimento de células progenitoras, e sua relação com diferentes conjuntos de cepas de ZIKV foi investigado por Devhare *et al.*(2017). Os hNSCs foram infectados com as cepas africanas, asiáticas do ZIKV ou ambas. As células infectadas com ambas as estirpes exibiram uma localização distinta da glicoproteína E e um padrão de crescimento. Seus resultados mostraram uma regulação positiva de vários genes após a infecção viral e um crescimento mais efetivo do ZIKV africano em hNSCs (embora os autores tenham mencionado que isso pode ser em parte devido a essa variante ser utilizada para várias passagens em cultura celular), mas não do ZIKV asiático. Para o qual menos estudos também foram documentados. Além disso, a expressão de genes associados à parada do ciclo celular foi aumentada em hNSCs infectados por vírus, consequentemente induzindo respostas de danos ao DNA, embora isso possa ser dependente de mecanismos específicos da cepa do vírus. Eles também demonstraram um aumento modesto na fosforilação do p53 Ser15, um marcador de ativação funcional do p53, em hNSCs asiáticos infectados pelo vírus Zika. No entanto, as células infectadas pelo vírus zika africano exibiram reduzida fosforilação da p53. Por fim, foram analisados os níveis de expressão dos alvos p53 p21 e PUMA e, curiosamente, a p21 foi detectada apenas em hNSCs asiáticos infectados pelo ZIKV, potencialmente promovendo a parada do ciclo celular e a capacidade de limitar o dano ao DNA. Por outro lado, a cepa africana levou a um aspecto de morte celular mais apoptótico.

O perfil e as alterações temporais dos miRNAs hospedeiros e do transcriptoma associado ao ZIKV foi estudado (KOZAK *et al.*, 2017). Segundo os

autores, os astrócitos embrionários humanos foram infectados com a estirpe PRVABC59 do ZIKV, e as alterações na expressão dos miRNAs foram medidas 24, 48 ou 72 horas após a infecção, utilizando várias técnicas, incluindo imunofluorescência, PCR quantitativo e microarrays. Seus achados sugerem que houve uma tendência a uma diminuição geral na expressão de miRNA nas células durante o curso da infecção pelo ZIKV. Um subconjunto de miRNAs foi encontrado para ser regulada durante a infecção, incluindo miR-30e-3p, miR-30e-5p e miR-17-5p.

Alterações no perfil de expressão de genes alvos sugerem que a via de resposta proteica é um alvo importante para a regulação mediada por ZIKV, uma vez que observaram, às 48 h após a infecção, uma indução de vias genéticas relacionadas à autofagia, incluindo CHOP e GADD34.

O estado de metilação de ZIKV RNA e o papel dessas alterações epigenéticas no hospedeiro foi investigado (LICHINCHI *et al.*, 2016). Os autores relataram que a metiltransferases e desmetilases do hospedeiro controlam a modificação N6-metiladenosina (m<sup>6</sup>A) no RNA ZIKV. A análise metagenética do hospedeiro mostrou que a infecção ZIKV aumentou os níveis de m<sup>6</sup>A em o 5' UTR mas comparativamente diminuiu em 3'UTR posições alvo do transcriptoma humano. A análise genética ontológica mostrou que esses genes estavam correlacionados com o pico de mediadores imunes no hospedeiro.

#### **4.6 Vírus da encefalite japonesa (JEV)**

Dois estudos *in vitro* usaram ferramentas de triagem de alto rendimento (high-throughput screening tools) para avaliar os perfis de expressão de miRNA em células microgлияis humanas infectadas com JEV.

Kumari *et al.* (2016) empregaram *microarrays* para investigar níveis de miRNAs às 6, 24 ou 48 horas pós - infecção, com o objetivo de identificar padrões de sobreposição de marcadores diferencialmente expressos associado com JEV. Inicialmente, só 36% de miARNs foram supra-regulados às 6 h pós-infecção, com pico em 24 h com uma proporção de 71% dos miRNAs investigados e permaneceram com níveis altos em 48 h pós-infecção (64%). Uma supra regularização consistente ao longo do tempo foi observada para um grupo específico

de miRNAs, incluindo miR-3648, miR-129-5p, miR-3687 e miR-572. O mesmo estudo também encontrou infra-regulação de miRNAs após infecção de células microgлияis com JEV. Às 48h pós-infecção miR-128, miR-132, O miR-222 e o miR-130b foram considerados negativamente regulados.

Os autores também investigaram o papel dos miRNAs na regulação da expressão genética associada à resposta imune do hospedeiro. Uma vez que a ativação da via Notch durante a infecção por JEV é modulada por miR-34c-5p que provavelmente se liga 3'UTR do gene Notch, na supra expressão de miR-34c-5p é esperada uma atenuação na produção de TNF e IL-6 JEV -induzida. Eles não observaram o impacto sobre a replicação viral uma vez que não houveram mudanças significativas na expressão da proteína JEVNS1.

Em 2017 Rastogi *et al.* usaram *microarrays* para investigar mudanças na expressão de 526 miRNA em células microgлияis humanas infectadas por JEV. Eles descobriram que 48 miARNs se expressaram diferentemente: 34 foram regulados positivamente, enquanto 14 que foram regulados negativamente. Ferramentas de bioinformática foram utilizadas para identificar os alvos do miRNA expressos diferentemente. Os miRNAs supra-regulados foram envolvidos em vias associadas com vários processos, incluindo a manutenção da barreira endotelial e junções de adesão, sinalização mediada por ubiquitina e processamento de proteína no retículo endoplasmático e apoptose. Os miRNAs regulados negativamente foram associados a vias mediadoras das respostas pró- inflamatórias, citocinas e quimiocinas expressão e via de sinalização neuropeptídica. Embora os alvos de interação dos miARNs não tenham sido especificamente investigados, os autores especulam sobre quatro mecanismos possíveis associados com a susceptibilidade das células microgлияis para infecção por JEV que seriam relacionadas com as alterações nos perfis de miARN. O miR-32-5p pareceu ser regulado positivamente e o gene Kruppel-like-factor 4 (KLF4 ) foi predito como um dos seus alvos . Este gene tem sido relatado como encarregado de regular a função de barreira do endotélio em células de glioma, através da supressão da atividade do promotor de proteínas de junções. Assim, a regulação da barreira hematoencefálica pode ser um mecanismo patológico associado à infecção por JEV. Além disso, o miR-29b-3p foi encontrado para ser regulado positivamente, e o fator 4 associado ao receptor do fator de

necrose tumoral (TRAF4) foi identificado como seu alvo suprimido. Uma vez que as células microgлияis são ativadas, mas nunca sofrem apoptose durante a infecção JEV, especula-se que este pode ser o resultado da supressão TRAF4, que inibem apoptose e promove a sobrevivência celular. A expressão de miR-205-5p foi suprimida após infecção por JEV, e seu alvo previsto foi o gene NFAT5, que está associado à neuroinflamação. Por isso, a regulação deste caminho depois da encefalite japonesa pode resultar em inflamação e alterações de barreira encefálica. Finalmente, o miR-432-5p foi regulado negativamente, e o seu potencial alvo genético, chamado *Neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like* (NEDD4L), está envolvido na via de proteólise mediada por ubiquitina e tem sido relatado como supressor da liberação de vírus de células infectadas. Portanto, o miR-432-5p pode desempenhar um papel crítico na regulação da liberação de vírus das células da microglia durante a infecção por JEV.

Outros dois estudos *in vitro* investigaram miRNAs específicos associados à infecção por JEV. No primeiro teve seu foco na linhagem celular de astrocitoma humano U251 para avaliar o papel do miR-15b como um regulador da inflamação induzida por JEV através de direcionamento da proteína de dedo de anel 125 (RNF125), que pode regular a via de sinalização do receptor de células T. Este estudo mostrou que a indução de miR-15b mediada por vírus aumenta a expressão de RIG-I por supressão direta do gene alvo RNF125, resultando no agravamento da produção de mediadores inflamatórios induzida por JEV. miR-15b está também envolvido na regulação de precursores inflamatórios, incluindo o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL5, IL-12p70 e CCL2. Por conseguinte, os autores demonstraram que esses mediadores inflamatórios foram significativamente supra regulados durante infecção por JEV e a inibição de miR-15b endógeno reduziu significativamente a produção de citocinas induzida pela infecção por JEV (ZHU *et al.*, 2015). O segundo estudo abordou o papel anti-inflamatório do miR-146a durante a infecção com a cepa JEV JaOArS982. Eles usaram PCR quantitativa e ensaios de luciferase para determinar a influência de miR-146a sobre a expressão *in vitro* de genes estimuláveis pelo interferon em células microgлияis humanas. A infecção por JEV supregulou o miR-146a, o que foi associado com a infra regulação da expressão gênica de TRAF6, IRAK1, IRAK2 e STAT1. A supra expressão do miR-146 associada à infecção por JEV suprimiu a ativação da via NF- $\kappa$ B e reduziu a atividade da via Jak-STAT o que



leva a uma redução da expressão dos genes estimuláveis por interferon (IFIT-1 e IFIT-2) facilitando à replicação viral (SHARMA et al., 2015).

#### 4.7 Vírus do Nilo Ocidental (WNV)

Dois estudos *in vitro* investigaram o papel das modificações epigenéticas na resposta humana à infecção pelo WNV. Ambos os estudos usaram técnicas de alto rendimento para investigar mecanismos baseados em RNA- i.

O papel do miRNA hospedeiro durante a infecção humana pelo WNV foi estudado por Slonchak *et al.* (2015). Os autores empregaram análise RNA-Seq para determinar as alterações na expressão de miARNs em células renais embrionárias humanas 293 (HEK293E). Em comparação com os controles não-infectados, múltiplos miARNs foram diferentemente expressos no grupo de células infectadas ao fim de 24 e 48 horas pós - infecção. Apenas três miRNAs foram significativamente supra regulados: miR-1271-5p, miR-532-5p, e miR-1307-3p. Para compreender as suas funções, as células HEK293 foram transfectadas com miRNA-específicos ou com mimetizadores de miRNA não específicos ou inibitórios, e, em seguida, infectadas com o WNV. Os níveis de WNV pareciam similares aos controles nas células foram transfectadas com mimetizações de miR-1271-5p e miR-1307-3p ou inibidores deles, assim indicando que estes miRNAs não influenciaram a replicação viral. Em contraste, os níveis de WNV reduziram significativamente em células transfectadas com a mimetização de miR-532-5p e aumentaram em células transfectadas com o inibidor de miR-532-5p. Um programa computacional preditor de genoma listou 10 alvos potenciais de miR-532-5p. Na investigação de acompanhamento, apenas o para Tab3 e SESTD1 mRNAs foram relatados como reduzidos após infecção WNV. Portanto a supra regulação de miR-532-5p e subsequente supressão de genes SESTD1 e Tab3 representam uma resposta antiviral hospedeiro durante Infecção por WNV.

O papel do miRNA hospedeiro durante a infecção humana pelo WNV foi estudado por Bogerd *et al.*(2014). Em um primeiro experimento, células Huh7 humanas foram infectadas com WNV e a expressão de miRNAs / siRNAs foi examinada usando sequenciamento genético. Células infectadas não expressavam níveis detectáveis de miRNAs e / ou siRNAs. Em um segundo experimento, os autores usaram uma linhagem de células humanas que não expressam Dicer e, portanto, não foram capazes de produzir miRNAs ou siRNAs . Não foram observadas diferenças significativas na replicação viral em células infectadas com NV em relação aos controles com atividade de Dicer inalterada. Em conjunto, os resultados mostram que a expressão do gene em células infectadas por WNV, semelhante aos achados descritos acima para o DENV, não é suprimida pelos miRNAs endógenos, o que aponta para o fato de que os vírus podem ter evoluído mecanismos em uma tentativa contornar as defesas baseadas em miRNA humano .

#### **4.8 Vírus Chikungunya (CHIKV)**

Apenas dois estudos *in vitro* investigaram modificações epigenéticas associados com a infecção por CHIKV. Um utilizou ferramentas de alto rendimento para triagem de potenciais marcadores de diagnóstico ou alvos terapêuticos (SAXENA *et al.*, 2013) enquanto o outro investigou especificamente o miR-146a (SELVAMANI *et al.*, 2014).

O primeiro estudo descreveu assinaturas de miARN associadas com a infecção por CHIKV de linhas celulares T humanas diferentes: linhagem celular de rim embrionário humano HEK293T, linhagem celular de rim embrionário de macaco VERO-76 e linhagem células humanas de fibroblastos dérmicos. Um total de 59 miARNs foram encontrados supra regulados, enquanto um 33 foram infra regulados em 12 e 24 horas após a infecção CHIKV. Aproximadamente 53% e 45% dos miRNAs regulados e sub- regulados, respectivamente, foram implicados com outras infecções virais, particularmente HCV, HBV, HPV e HIV1. Estes autores também investigaram alterações na expressão RNAs (snoRNA), um mecanismo epigenico que guia modificações químicas de outros RNAs, principalmente RNAs ribossomais (BACHELLERIE *et al.*, 2002). Os resultados mostraram que 48 snoRNAs foram supra regulados. Destes, 16 eram do tipo C / D, conhecidos por estarem relacionados à acetilação de RNA ribossomal. Por outro lado, o segundo estudo

investigou o papel do miR-146a na regulação de respostas inflamatórias associadas com infecção CHIKV em fibroblastos sinoviais humanos. A infecção pelo CHIKV foi associada ao aumento da expressão celular do miR- 146a e subsequente regulação negativa da expressão gênica de TRAF6 , IRAK1 , e IRAK , bem como aumento da replicação viral . Eles concluíram que CHIKV reduziu a resposta imune anti - viral em fibroblastos humanos através da supra expressão de mi R-146a.

#### **4.9 Vírus do Congo da Crimeia (CCV)**

Um único estudo in vivo investigou fatores epigenéticos associados ao CCV. (DEMIR *et al.*, 2017) fizeram um perfil de expressão miRNA de amostras de plasma de oito indivíduos com diagnóstico confirmado de febre hemorrágica da Criméia-Congo (CCHF). Seus resultados identificaram 106 miRNA expressos diferencialmente em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com diagnóstico de CCV. As principais assinaturas epigenéticas encontradas como supra reguladas foram miR-144, miR-451, miR-486-5p, miR-608, miR-363, miR-31, miR-32, miR-575, miR-632 e -miR-541 em pacientes com CCHF. Entre esses, vários estão implicados na ativação de células imunes, na aderência de sinais e na transdução de sinais. Os autores ressaltam que um desequilíbrio de citocinas semelhante ocorre durante as febres hemorrágicas virais, independentemente do agente etiológico patológico, e que poderia ser o resultado de processos de doença mediados por alterações epigenéticas compartilhadas. Além disso, os principais miRNA supra-regulados reguladas foram miR-493, miR-889, miR-655, miR-656, miR-26a-1, miR-154, miR-335, miR-1197 e miR-146a . Eles propuseram que pelo menos alguns desses candidatos estavam relacionados a alterações induzidas por citocinas pró- inflamatórias no endotélio, levando a disfunções vasculares e ao desenvolvimento de danos hemorrágicos observados em pacientes com CCHF. Em conjunto, suas descobertas sugerem um papel fundamental para os miRNAs na regulação da resposta imune humana ao CCV e na modulação do progresso da doença e das manifestações clínicas da CCHF.

## 5. DISCUSSÃO

Em termos gerais são cinco os processos bem caracterizados que parecem mediar a regulação epigenética: a metilação do DNA, o posicionamento do nucleossoma, variantes de histona, modificações de histona, e RNA reguladores. Embora exista uma grande evidência sugerindo que os fatores epigenéticos desempenham um papel crítico na regulação das infecções por vírus, em muitos casos os mecanismos detalhados não foram elucidados. No entanto vários fatores limitantes contribuem para nossa relativa falta de compreensão da regulação epigenética viral, a complexidade inerente da regulação epigenética constitui o obstáculo principal. Para nosso conhecimento, esta é a primeira revisão que objetivou sintetizar mudanças epigenéticas associadas a infecções por arbovírus no hospedeiro humano.

Nossos resultados revelaram uma significativa heterogeneidade destes estudos, com hipóteses variadas e conjuntos de marcadores distintos, o que, sem dúvida, restringe nossa capacidade de desenhar comparações diretas e realizar uma meta-análise fundamentada. Nossa revisão mostrou que eventos epigenéticos mais frequentemente expressos durante infecções por arbovírus foram relacionados a modificações nos perfis de miRNA. Além disso, alterações no complexo de Dicer e enzimas Dicer-like foram também relatadas por dois independentes estudos (BOGERD *et al.*, 2014; CASSEB *et al.*, 2016). Apenas um único estudo encontrou associação com modificações de histona (COLPITTS *et al.*, 2011) , e outro fez investigação descrevendo alterações na metilação de DNA (GOMES *et al.*, 2016) . Outro estudo relatou alterações na fosforilação da p53 utilizando um modelo de infecção do ZIKV (DEVHARE *et al.*, 2017).

A alteração mais frequente de miRNA implicada com infecções por arbovírus foi o miR - 146. Este miARN foi supra-regulado durante infecções com JEV, CHKV e DENV (WU *et al.*, 2013; SELVAMANI *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2015) e, surpreendentemente , infra-regulado na Febre do Congo da Crimeia (DEMIR *et al.*, 2017). Nem todos os achados foram concordantes já que num estudo recente o miR

- 146 foi infra-regulado durante a infecção por DENV (OUYANG *et al.*, 2016). Acredita-se que o miR - 146 é um mediador inflamatório que estimula a liberação de citocinas durante a resposta imune inata (CORRIDONI *et al.*, 2018). Tem também sido proposta a hipótese de ser um marcador de septicemia, assim como um alvo para reduzir a hiperativação imune durante a infecção (SABA *et al.*, 2014). No entanto, dois dos estudos revisados encontraram níveis de miR - 146 no sentido oposto com perceptível infra-regulação após a infecção por arbovirus, sugerindo que a sua redução após a infecção CCF levou à secreção de marcadores pró-inflamatórios. (DEMIR *et al.*, 2017)

Em menor grau, outros marcadores de miRNA foram implicados pela literatura. Por exemplo, o miR - 30e tem geralmente sido correlacionado com a ativação da via NF- kB , e, por conseguinte, possivelmente ativa a imunidade inata (JIANG *et al.*, 2012) . Enquanto Kozak *et al.*(2017) mostraram que o miR-30e está envolvido na via da autofagia em pacientes infectados com ZIKV, outro trabalho propôs que o real papel do miR-30e é na regulação da expressão de granzima B em células NK durante a infecção DENV (LIU *et al.*, 2016), uma importante molécula citotóxica para controlar a replicação viral. Apesar de níveis alterados relatados para miR- 30e, um consenso sobre o que está realmente modulando o sistema imunológico humano após a infecção viral ainda não foi atingido. Da mesma forma, Dicer, uma endoribonuclease, cliva dsRNA em siRNA e miRNA que facilitam a ativação do complexo de silenciamento (RISC) induzido por RNA (BALAKRISHNAN E MILAVETZ, 2017).

Ao todo, nossa avaliação sugere que mecanismos epigenéticos que acompanham infecções por arbovirus podem ser bastante específicos e distintos dos que estão associados à outras doenças virais comuns, tais como vírus tumorais de DNA. Nesses as alterações na miARN padrões de expressão não são tão frequentes. Estes vírus foram predominantemente associados a eventos de metilação do DNA nas posições dos promotores de genes-chaves associados a doenças. Do mesmo modo, a metilação do DNA faz parte do silenciamento genético típico do processo que ocorre durante a infecção latente pelo vírus do herpes simplex(HSV).Por outro lado, o polyomavirus e o adenovírus frequentemente têm seu genoma integrado no genoma do hospedeiro com alguns estudos mostrando

que estes vírus podem também empregar mecanismos de metilação do DNA durante o curso da infecção. Uma modificação epigenética mediada por vírus amplamente descrita é a associada ao papilomavírus que implica modificações nas histonas (MILAVETZ E BALAKRISHNAN, 2015). Comparativamente na Hepatite B o vírus possui um mini-cromossoma com modificações de nucleossomas e histonas, que aparece para desregular vias celulares, em parte por ligação a DNA genômico, por alteração dos padrões de expressão miARNs , ou por ligar-se ao gene da sirtuina 1 ( SIRT1 ), uma proteína reguladora intracelular conhecida por regular e suprimir a recombinação de DNAr . Em geral, isso confirma que os vírus podem usar mecanismos epigenéticos diferentes e que o miRNA pode ser funcionalmente mais relevante para infecções por arbovírus em humanos. Apesar disso, o significado dos miRNAs para o desenvolvimento e progressão de infecções arbovirais e para a resposta da doença hospedeira permanecem em grande parte incertos.

Encontramos um único estudo de alterações epigenética específicos associados com diferentes gravidade de uma mesma arbovirose, mostrando padrões diferentes de assinatura de miRNA para dengue leve comparado ao da febre hemorrágica do dengue (TAMBYAH *et al.*, 2016). Uma limitação para a produção de afirmações baseada na literatura existente é o reduzido número de estudos *in vivo* disponíveis. Apenas seis estudos foram encontrados nesta revisão, e cinco deles a pesquisa se restringia a DENV com infecção única. Nesses estudos os autores estavam interessados em definir padrões de assinatura de miRNA(QI *et al.*, 2013; OUYANG *et al.*, 2016), ou procuravam evidências para a da ativação epigenética de genes que regulam e o sistema imune inato , como o TNF- alfa (GOMES *et al.*, 2016) . Tem sido especulado que os miARNs associados com a ativação de citocina predispõem à doença mais grave, porém novas investigações são necessárias.

Uma questão clinicamente relevante que nossa revisão foi incapaz de responder diz respeito à persistência de marcadores de resposta precoce, tais como IgM anti - Chikungunya anticorpos, em pacientes crônicos. Estes foram documentados, mesmo após vários meses desde o início da doença , sugerindo que infecções por arbovírus de RNA são raramente auto-resolvidas e certamente não são de curta duração como era anteriormente especulado(SCHILTE *et al.*, 2013;

PIERRO *et al.*, 2015). Outra limitação importante de nossa revisão é a falta de literatura significativa em relação a eventos epigenéticos específicos e biomarcadores com potencial para discriminar a miríade de infecções causadas por arbovírus circulantes no mundo. No Brasil, por exemplo, mais de 210 espécies de arbovirus já foram isoladas , a grande maioria da floresta amazônica , com pelo menos 110 novos para comunidade científica e 34 destes com comprovação de capacidade de causar infecções humanas(STAPLEFORD *et al.*, 2014). Ademais, arbovirus são entidades compostas de RNA, muito mutagênicos e capazes de causar ameaças à saúde pública na forma de surtos e pandemias. Além do surgimento altamente divulgado de ZIKV e CHKV, a última década é testemunha da expansão de arbovírus com localização previa endêmica, tais como Oropouche (VORO), Mayaro (MAYV), Rocio (VN), Encefalite de Saint Louis (SLEV), Ross River (RRV), e Encefalite Equinaoriental e ocidental (EEEV e WEEV) de vírus es dos Flaviviridae ,Togaviridae e famílias Bunyaviridae.

Para agravar estes fatos, a saliva de mosquitos que se alimentam de sangue é enriquecida com moléculas ativas que exibem uma variedade de funções que levam à modulação do sistema imune do hospedeiro , facilitando a evasão de arbovírus e o estabelecimento da doença (ANDRADE *et al.*, 2005).

Dependendo do vetor em questão e dos fatores humanos intrínsecos, isso por si só pode resultar em respostas imunes e epigenéticas específicas mediadas pelo hospedeiro , adicionando maior complexidade para a efetiva integração de análises moleculares *in vitro* e *in vivo* .

Claramente, as infecções por arbovírus são responsáveis por uma enorme carga de doenças nos sistemas de saúde e na produtividade do trabalho, especialmente em países tropicais e em desenvolvimento (CAVALCANTI *et al.*, 2018). Estudos que se encaixaram nos nossos critérios de inclusão foram de natureza altamente heterogênea, apresentando variados desenhos metodológicos e testes para conjuntos distintos de hipóteses. Mais pesquisas são certamente necessárias para aprimorar o modo como as descobertas epigenéticas poderiam ser utilizadas como ferramentas para o diagnóstico, estadiamento e prognóstico das arbovirose em seres humanos. Trabalhos focados nos mecanismos de regulamentos

epigenéticos específicos provavelmente ajudaria a desenvolver estratégias de prevenção e terapêutica.

Estudos epigenéticos mais detalhados sobre as interações de infecções arbovirais com doenças crônicas comuns em humanos, bem como o papel das coinfeções, seriam extremamente oportunos para um progresso significativo nesse campo. Por exemplo, um grande surto impulsionado por variantes emergentes de CHKV no Brasil entre 2016 e 2017, lembrou os cientistas e autoridades de saúde pública dos impactos devastadores de infecções arbovirais e cronificação de doenças sobre a produtividade do trabalho e os resultados de doenças subjacentes, especialmente Diabetes tipo II (CAVALCANTI *et al.*, 2018).

Esta revisão sistemática mostra que as principais alterações epigenéticas associadas com arbovírus infecções foram microRNAs , particularmente miR - 146 e miR - 30e , e o complexo dicer. Devido a heterogeneidade dos estudos, os achados não são definitivos e mais estudos focados na regulação epigenética do sistema imune são necessários. Desta forma o potencial inexplorado dos marcadores epigenéticos pode constituir o elo perdido para reforçar a compreensão da patogênese e dos mecanismos de respostas compartilhados entre as espécies causadoras de arbovirose.



## **6.CONCLUSAO**

As principais alterações epigenéticas encontradas nas infecções por arbovírus foram miR-146, miR-30e e o complexo de Dicer.

## REFERÊNCIAS

ADOUCHIEF, S. et al. Sindbis virus as a human pathogen-epidemiology, clinical picture and pathogenesis. **Rev Med Virol**, v. 26, n. 4, p. 221-41, Jul 2016. ISSN 1052-9276.

AGRAWAL, N. et al. RNA interference: biology, mechanism, and applications. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 4, p. 657-85, Dec 2003. ISSN 1092-2172 (Print)

1092-2172.

ANDRADE, B. B. et al. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **An Acad Bras Cienc**, v. 77, n. 4, p. 665-93, Dec 2005. ISSN 0001-3765 (Print)

0001-3765.

BACHELLERIE, J. P.; CAVAILLE, J.; HUTTENHOFER, A. The expanding snoRNA world. **Biochimie**, v. 84, n. 8, p. 775-90, Aug 2002. ISSN 0300-9084 (Print)

0300-9084.

BALAKRISHNAN, L.; MILAVETZ, B. Epigenetic Regulation of Viral Biological Processes. **Viruses**, v. 9, n. 11, Nov 17 2017. ISSN 1999-4915.

BAYER, A. et al. Chromosome 19 microRNAs exert antiviral activity independent from type III interferon signaling. **PLoS Pathog**, v. 14, p. 33-38, Jan 2018. ISSN 0143-4004.

BOGERD, H. P. et al. Replication of many human viruses is refractory to inhibition by endogenous cellular microRNAs. **J Virol**, v. 88, n. 14, p. 8065-76, Jul 2014. ISSN 0022-538x.

CALISHER, C. H. Medically important arboviruses of the United States and Canada. **Clin Microbiol Rev**, v. 7, n. 1, p. 89-116, Jan 1994. ISSN 0893-8512 (Print)

0893-8512.

CASSEB, S. M. et al. Droscha, DGCR8, and Dicer mRNAs are down-regulated in human cells infected with dengue virus 4, and play a role in viral pathogenesis. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 2, May 9 2016. ISSN 1676-5680.

CAVALCANTI, L. P. G. et al. Is the recent increment in attributable deaths to type-2 diabetes (T2D) associated with the latest chikungunya outbreak in a major epidemic area in Brazil? **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 51, n. 1, p. 63-65, Jan-Feb 2018. ISSN 0037-8682.

CHARREL, R. N.; DE LAMBALLERIE, X.; RAOULT, D. Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases. **N Engl J Med**, v. 356, n. 8, p. 769-71, Feb 22 2007. ISSN 0028-4793.

CHEN, R. F. et al. Augmented miR-150 expression associated with depressed SOCS1 expression involved in dengue haemorrhagic fever. **J Infect**, v. 69, n. 4, p. 366-74, Oct 2014. ISSN 0163-4453.

CLETON, N. et al. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. **J Clin Virol**, v. 55, n. 3, p. 191-203, Nov 2012. ISSN 1386-6532.

COLPITTS, T. M. et al. Dengue virus capsid protein binds core histones and inhibits nucleosome formation in human liver cells. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24365, 2011. ISSN 1932-6203.

CORRIDONI, D. et al. Emerging Mechanisms of Innate Immunity and Their Translational Potential in Inflammatory Bowel Disease. **Front Med (Lausanne)**, v. 5, 2018.

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, "epigenetic"? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887-96, Apr 2015. ISSN 0016-6731.

DEMIR, Z. C. et al. MicroRNA expression profiles in patients with acute Crimean Congo hemorrhagic fever reveal possible adjustments to cellular pathways. **J Med Virol**, v. 89, n. 3, p. 417-422, Mar 2017. ISSN 0146-6615.

DEVHARE, P. et al. Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. **Cell Death Dis**, v. 8, n. 10, p. e3106, Oct 12 2017.

DIOSA-TORO, M. et al. MicroRNA profiling of human primary macrophages exposed to dengue virus identifies miRNA-3614-5p as antiviral and regulator of ADAR1 expression. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 10, p. e0005981, Oct 2017. ISSN 1935-2727.

ESCALERA-CUETO, M. et al. Let-7c overexpression inhibits dengue virus replication in human hepatoma Huh-7 cells. **Virus Res**, v. 196, p. 105-12, Jan 22 2015. ISSN 0168-1702.

GOMES, A. V. et al. Demethylation profile of the TNF-alpha promoter gene is associated with high expression of this cytokine in Dengue virus patients. **J Med Virol**, v. 88, n. 8, p. 1297-302, Aug 2016. ISSN 0146-6615.

GOULD, E. et al. Emerging arboviruses: Why today? **One Health**, v. 4, p. 1-13, Dec 2017. ISSN 2352-7714 (Print)

2352-7714.

GRIFFITHS, M. J.; TURTLE, L.; SOLOMON, T. Japanese encephalitis virus infection. **Handb Clin Neurol**, v. 123, p. 561-76, 2014. ISSN 0072-9752 (Print)

0072-9752.

HALSEY, E. S. et al. Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 11, p. 1839-42, Nov 2013. ISSN 1080-6040.

HOLLIDGE, B. S.; GONZALEZ-SCARANO, F.; SOLDAN, S. S. Arboviral encephalitides: transmission, emergence, and pathogenesis. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 5, n. 3, p. 428-42, Sep 2010. ISSN 1557-1890.

JIANG, L. et al. MicroRNA-30e\* promotes human glioma cell invasiveness in an orthotopic xenotransplantation model by disrupting the NF-kappaB/IkappaBalpha negative feedback loop. **J Clin Invest**, v. 122, n. 1, p. 33-47, Jan 2012. ISSN 0021-9738.

KAKUMANI, P. K. et al. Role of human GRP75 in miRNA mediated regulation of dengue virus replication. **Gene**, v. 586, n. 1, p. 7-11, Jul 15 2016. ISSN 0378-1119.

KAKUMANI, P. K. et al. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. **J Virol**, v. 87, n. 16, p. 8870-83, Aug 2013. ISSN 0022-538x.

KAKUMANI, P. K. et al. Dengue NS3, an RNAi suppressor, modulates the human miRNA pathways through its interacting partner. **Biochem J**, v. 471, n. 1, p. 89-99, Oct 1 2015. ISSN 0264-6021.

KANOKUDOM, S. et al. miR-21 promotes dengue virus serotype 2 replication in HepG2 cells. **Antiviral Res**, v. 142, p. 169-177, Jun 2017. ISSN 0166-3542.

KOZAK, R. A. et al. MicroRNA and mRNA Dysregulation in Astrocytes Infected with Zika Virus. **Viruses**, v. 9, n. 10, Oct 14 2017. ISSN 1999-4915.

KRAEMER, M. U. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. v. 4, p. e08347, Jun 30 2015. ISSN 2050-084x.

KUMARI, B. et al. Dynamic changes in global microRNAome and transcriptome reveal complex miRNA-mRNA regulated host response to Japanese Encephalitis Virus in microglial cells. **Sci Rep**, v. 6, p. 20263, Feb 3 2016. ISSN 2045-2322.

LICHINCHI, G. et al. Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 5, p. 666-673, 11/9/ 2016. ISSN 1931-3128. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1931312816303985> >.

LIU, S. et al. Suppressed expression of miR-378 targeting *gzmb* in NK cells is required to control dengue virus infection. **Cell Mol Immunol**, v. 13, n. 5, p. 700-8, Sep 2016. ISSN 1672-7681.

LIU, X. Y.; XU, J. F. Reduced Histone H3 Acetylation in CD4(+) T Lymphocytes: Potential Mechanism of Latent Autoimmune Diabetes in Adults. **Dis Markers**, v. 2015, p. 285125, 2015. ISSN 0278-0240.

LWANDE, O. W. et al. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. **Infect Ecol Epidemiol**, v. 5, p. 29853, 2015. ISSN 2000-8686 (Print)

2000-8686.

MAYER, S. V.; TESH, R. B.; VASILAKIS, N. The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. **Acta Trop**, v. 166, p. 155-163, Feb 2017. ISSN 0001-706x.

MELTZER, E. Arboviruses and viral hemorrhagic fevers (VHF). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 479-96, Jun 2012. ISSN 0891-5520.

MILAVETZ, B. I.; BALAKRISHNAN, L. Viral epigenetics. **Methods Mol Biol**, v. 1238, p. 569-96, 2015. ISSN 1064-3745.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. **J Clin Epidemiol**, v. 62, n. 10, p. 1006-12, Oct 2009. ISSN 0895-4356.

NEGREDO ANTON, A. I. et al. [Microbiological diagnosis of emerging arboviral and rodent borne diseases]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 33, n. 3, p. 197-205, Mar 2015. ISSN 0213-005x.

OUYANG, X. et al. Dysregulated Serum MiRNA Profile and Promising Biomarkers in Dengue-infected Patients. **Int J Med Sci**, v. 13, n. 3, p. 195-205, 2016. ISSN 1449-1907.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **West J Emerg Med**, v. 17, n. 6, p. 671-679, Nov 2016. ISSN 1936-900x.

PETERSEN, L. R.; BRAULT, A. C.; NASCI, R. S. West Nile virus: review of the literature. **Jama**, v. 310, n. 3, p. 308-15, Jul 17 2013. ISSN 0098-7484.

PHAM, A. M.; LANGLOIS, R. A.; TENOEVER, B. R. Replication in cells of hematopoietic origin is necessary for Dengue virus dissemination. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 1, p. e1002465, Jan 2012. ISSN 1553-7366.

PIANTADOSI, A. et al. Emerging Cases of Powassan Virus Encephalitis in New England: Clinical Presentation, Imaging, and Review of the Literature. **Clin Infect Dis**, v. 62, n. 6, p. 707-713, Mar 15 2016. ISSN 1058-4838.

PIERRO, A. et al. Persistence of anti-chikungunya virus-specific antibodies in a cohort of patients followed from the acute phase of infection after the 2007 outbreak in Italy. **New Microbes New Infect**, v. 7, p. 23-5, Sep 2015. ISSN 2052-2975 (Print)

2052-2975.

PU, J. et al. miR-146a Inhibits dengue-virus-induced autophagy by targeting TRAF6. **Arch Virol**, v. 162, n. 12, p. 3645-3659, Dec 2017. ISSN 0304-8608.

QI, Y. et al. microRNA expression profiling and bioinformatic analysis of dengue virusinfected peripheral blood mononuclear cells. **Mol Med Rep**, v. 7, n. 3, p. 791-8, Mar 2013. ISSN 1791-2997.

RASTOGI, M.; SRIVASTAVA, N.; SINGH, S. K. Exploitation of microRNAs by Japanese Encephalitis virus in human microglial cells. **mSphere**, Nov 17 2017. ISSN 0146-6615.

SABA, R.; SORENSEN, D. L.; BOOTH, S. A. MicroRNA-146a: A Dominant, Negative Regulator of the Innate Immune Response. **Front Immunol**, v. 5, p. 578, 2014. ISSN 1664-3224 (Print)

1664-3224.

SAXENA, T. et al. Combined miRNA and mRNA signature identifies key molecular players and pathways involved in chikungunya virus infection in human cells. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79886, 2013. ISSN 1932-6203.

SCHILTE, C. et al. Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 3, p. e2137, 2013. ISSN 1935-2727.

SELVAMANI, S. P.; MISHRA, R.; SINGH, S. K. Chikungunya virus exploits miR-146a to regulate NF-kappaB pathway in human synovial fibroblasts. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e103624, 2014. ISSN 1932-6203.

SHARMA, N. et al. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells. **J Neuroinflammation**, v. 12, p. 30, Feb 18 2015. ISSN 1742-2094.

SLONCHAK, A. et al. Human MicroRNA miR-532-5p Exhibits Antiviral Activity against West Nile Virus via Suppression of Host Genes SESTD1 and TAB3 Required for Virus Replication. **J Virol**, v. 90, n. 5, p. 2388-402, Dec 16 2015. ISSN 0022-538x.

STAPLEFORD, K. A. et al. Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. **Cell Host Microbe**, v. 15, n. 6, p. 706-16, Jun 11 2014. ISSN 1931-3128.

STEELE, K. E.; TWENHAFEL, N. A. REVIEW PAPER: pathology of animal models of alphavirus encephalitis. **Vet Pathol**, v. 47, n. 5, p. 790-805, Sep 2010. ISSN 0300-9858.

TAJIMA, S. et al. Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. **Adv Exp Med Biol**, v. 945, p. 63-86, 2016. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598.

TAMBYAH, P. A. et al. microRNA expression in blood of dengue patients. **Ann Clin Biochem**, v. 53, n. Pt 4, p. 466-76, Jul 2016. ISSN 0004-5632.

VALARCHER, J. F. et al. Tick-borne encephalitis. **Rev Sci Tech**, v. 34, n. 2, p. 453-66, Aug 2015. ISSN 0253-1933 (Print)

0253-1933.

VASCONCELOS, P. F.; CALISHER, C. H. Emergence of Human Arboviral Diseases in the Americas, 2000-2016. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 16, n. 5, p. 295-301, May 2016. ISSN 1530-3667.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **N Engl J Med**, v. 372, n. 13, p. 1231-9, Mar 26 2015. ISSN 0028-4793.

WU, N. et al. miR-223 inhibits dengue virus replication by negatively regulating the microtubule-destabilizing protein STMN1 in EAhy926 cells. **Microbes Infect**, v. 16, n. 11, p. 911-22, Nov 2014. ISSN 1286-4579.

WU, S. et al. miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6. **J Infect**, v. 67, n. 4, p. 329-41, Oct 2013. ISSN 0163-4453.

ZHU, B. et al. MicroRNA-15b Modulates Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation via Targeting RNF125. **J Immunol**, v. 195, n. 5, p. 2251-62, Sep 1 2015. ISSN 0022-1767.

ZHU, X. et al. MicroRNA-30e\* suppresses dengue virus replication by promoting NF-kappaB-dependent IFN production. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e3088, Aug 2014. ISSN 1935-2727.

## ANEXOS

Anexo 1: Artigos de textos completos excluídos e razão para exclusão

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Razão para exclusão</b>
Avilla-Bonilla	2017	células de Ae. Albopictus
Castilo	2016	células de macacos
Castrillon	2017	células de mosquito
Chang	2016	células de hamster
Chen	2016	células de hamster
McLean	2017	estudo in silico
Pylro	2016	estudo in silico
Sharma	2015	células de camundongos
Shind	2015	estudo in silico
Thounaujon	2014	células de porco
Thounaujon	2014	células de porco



**Anexo2:Tabela**

<b>Autor</b>	<b>Ano</b>	<b>Vírus</b>	<b>In Vitro ou In Vivo</b>	<b>Alteração epigenética</b>	<b>Resultados</b>	<b>Linha celular</b>
Bayer, A.	2018	Vírus Zika	em vitro	superexpressão de cluster de microRNA do cromossomo 19	MiRNAs C19MC limitam a infecção pelo ZIKV	trofoblastos humanos
Bogerd, HP	2014	Vírus do Nilo Ocidental e Dengue	em vitro	Dicer mRNA	O DENV e o WNV não expressam miRNAs virais em células humanas; o DENV e o WNV induzem a produção de siRNAs virais em células somáticas humanas infectadas	Células Huh7, um tipo de linha celular do fígado humano
Casseb, SM	2016	Vírus dengue	em vitro	Drosha, DGCR8 e Dicer mRNAs	Os mRNAs de Drosha, DGCR8 e Dicer são regulados negativamente em células humanas infectadas pelo vírus da dengue 4	células epiteliais
Chen, RF	2014	Vírus dengue	em Vivo	Superexpressão do miR-150	expressão reduzida de SOCS1 foi significativamente associada com níveis de miR-150	células monocleares de sangue periférico
Colpitts, TM	2011	Vírus dengue	em vitro	proteínas histonas nucleares H2A, H2B, H3 e H4 como alvo da proteína capsidial do vírus	Protéina capsidial do DENV2 pode ter histonas como alvo. DENV-2 alterou a fosforilação no H2A	Células Huh7, um tipo de linha celular do fígado humano
Demir, ZC	2017	Vírus da febre hemorrágica da Criméia do Congo	em Vivo	infraregulação de hsa-miR-146a e regulação positiva de hsa-miR-451 e hsa-miR-31	a regulação negativa do miR-146a e a regulação positiva de hsa-miR-451 e hsa-miR-31 levam ao aumento de citocinas pró-inflamatórias	células monocleares de sangue periférico

Devhare, P.	2017	Vírus Zika	em vitro	redução fosforilação p53	da do	As cepas do vírus Zika induzem o crescimento de células-tronco neurais humanas (hNSC)	células-tronco neurais humanas
Diosa-Toro, M.	2017	Vírus dengue	da em vitro	Superexpressão do miR-3614-5p		alteração na localização da glicoproteína E miR-3614-5p regulou a expressão de macrófagos ADAR1, uma proteína que facilita a replicação viral	macrófagos primários
Escalera-Cueto, M.	2015	Vírus dengue	da em vitro	Superexpressão do miRNA Let-7		Let-7c tem um efeito antiviral através da modulação de BACH1 e HO-1	Células Huh7, um tipo de linha celular do fígado humano
Gomes, AV	2016	Vírus dengue	da em Vivo	metilação citocinas	de	freqüência significativa de desmetilação na região do promotor do TNF- $\alpha$ em pacientes infectados pelo DENV	RNA total foi isolado de sangue total
Kakumani, PK	2016	Vírus dengue	da em vitro	microRNA humano mir-126		A chaperona e o miRNA, hsa-mir-126-5p, restringem a replicação do vírus da dengue em linhas celulares humanas	Células Huh7, um tipo de linha celular do fígado humano
Kakumani, PK	2013	Vírus dengue	da em vitro	Supressão RNAi	de	Infraregulação de fatores RNAi como Dicer, Drosha, Ago1 e Ago2. Além disso, NS4B, uma proteína viiral, como um supressor de RNAi.	Huh 7 e HEK293T (células renais embrionárias humanas)
Kakumani, PK	2015	Vírus dengue	da em vitro	Supressão RNAi	de	Proteína não estrutural 3 do vírus da dengue suprime a maquinaria miRNA humana	rim embrionário humano (HEK)

							Células HEK293T
Kanokudom, S.	2017	Vírus dengue	da em vitro	superexpressão de microRNA 21		O miR-21 é significativamente aumentado após a infecção pelo DENV 2 e a expressão desse miRNA promove a replicação do DENV	Células HepG2, uma linha celular de câncer de fígado humano
Kozak, RA	2017	Vírus Zika	em vitro	miR-30e-3p, miR-30e-5p, miR-17-5p		indução de via genética de autofagia incluindo CHOP e GADD34	astrócitos
Kumari, B.	2016	Vírus encefalite japonesa	da em vitro	supressão miR-34c-5p		miR-34c-5p é suprimido durante a infecção por JEV e a superexpressão deste miRNA modula a produção de citocinas pró-inflamatórias induzida por JEV	células microgliais humanas
Lichinchi	2016	Vírus Zika	Em vitro	RNA humano	m6A	A metilação do RNA m6A modula o ciclo de vida do ZIKV	Células HEK293T
Liu	2016	DENV	Em Vivo	miR-27a *, miR-30e e miR-378 foram reprimidos		miR-378, mas não miR-27a * ou miR-30e, suprimem a expressão GrzB em células NK	Células NK
Ouyang	2016	DENV	Em Vivo	supreregulação hsa-miR-21-5p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-188-5p e hsa-miR-152-3p e infraregulação de hsa-miR-146a-5p		hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146a-5p podem distinguir pacientes infectados por dengue	RNA total foi isolado de sangue total

Pu	2017	DENV	Em vitro	Superexpressão do miR-146a	miR-146a bloqueou significativamente a indução de autofagia	Células A549 ) e THP-1
				Supraexpressão de CCL5 e miR-Let-7	CCL5 como alvo de miR-106b e CCL3 e IL-6 como alvo de miR-Let-7 e / Modulação na ativação biológica	
Rastogi	2018	JEV	Em vitro	miR-432-5p foi regulado negativamente	infraregulação do miR-432-5p pode facilitar liberação de vírus das células da microglia pois	células microgliais humanas
Saxena	2013	CHIKV	Em vitro	miR-744, miR-638, miR-503	Perfil de expressão de miRNA revelou regulação de 152 miRNAs pós infecção por CHIKV	Células HEK293T
Selvamani	2014	CHIKV	Em vitro	Superexpressão do miR-146a	o aumento do miR-146a resultou na regulação negativa de TRAF6, IRAK1 com consequente redução da ativação da via NFKb	Fibroblastos Sinoviais Humanos
Sharma	2015	JEV	Em vitro	Superexpressão de miR146-a	supressão sa ativação da via NF-KB e redução da atividade da via Jak-STAT o que leva a uma queda da expressão dos genes estimuláveis por interferon (IFIT-1 e IFIT-2) -> replicação viral	células microgliais humanas

Slonchak	2015	WNV	Em vitro	Superexpressão do miR-532-5p	miR-532-5p exibe atividade antiviral através da supressão de genes SESTD1 e TAB3 necessários para replicação de vírus	Células renais embrionárias humanas (HEK293)
Tambyah	2016	DENV	Em Vivo	Superexpressão de um grupo de 12 miRna (miR-450b-5p, -491-5p, -499a-3p, -512-5p, -615-5p, -624-5p, -892b, -1204, -1225-5p, -3121-3p, -4259 e -4327)		RNA total foi isolado de sangue total
					12 miRNAs foram especificamente relacionados com casos de dengue aguda	
Wu	2014	DENV	Em vitro	Superexpressão do miR-223	A superexpressão de miR-223 controla a replicação de DENV-2, regulando negativamente o gene desestabilizador de microtúbulos STMN1	Células EAhy926, uma linha endotelial vascular humana
Wu	2013	DENV	Em vitro	Superexpressão do miR-146a	O miR-146a facilita a replicação de DENV, visando o TRAF6 e, consequentemente, reduzindo os níveis de IFN-B	célula monocítica humana THP-1, um modelo para monócitos humanos
Zhu	2015	JEV	Em vitro	Superexpressão de microRNA-15b	MicroRNA-15b modula inflamação	astrocitoma humano e HeLa

Zhu	2014 DENV	Em vitro	indução de MicroRNA-30e *	MicroRNA-30e * suprime a replicação do vírus da dengue por promover a produção de IFN dependente de NF- kB	linha celular de monócitos humanos U937
-----	-----------	-------------	---------------------------------	---	--