



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**Perfil de microRNAs Hepáticos pode Regular Apoptose, Lesões Vasculares  
e Inflamação na Dengue Hemorrágica**

**LAYANNA FREITAS DE OLIVEIRA**

**BELÉM - PA  
JUNHO, 2016**

**LAYANNA FREITAS DE OLIVEIRA**

**Perfil de microRNAs Hepáticos pode Regular Apoptose, Lesões Vasculares  
e Inflamação na Dengue Hemorrágica**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular da UFPA  
como requisito para obtenção do Doutorado em  
Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mário Rodriguez Burbano

**BELÉM - PA  
JUNHO, 2016**

**INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS**

Instituto Evandro Chagas (IEC), Ananindeua –PA

Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém – PA

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

*Para meus pais Ivanete e Alberto, com amor e gratidão.*

## AGRADECIMENTO

Agradeço ao Dr. Márcio Nunes, por ter me incluído com tanta receptividade e generosidade no seu grupo do Centro de Inovações Tecnológicas (CIT) e ter me apoiado incondicionalmente na execução desse projeto, sempre apoiando minhas decisões.

Aos Profs. Dr. Eduardo Santos e Rommel Burbano, que me inspiraram e motivaram ao longo desses quatro anos de dificuldades e aprendizado.

Gratidão a todos integrantes do CIT, por serem excelentes no trabalho em equipe, pela honestidade e amizade, que torna o laboratório não só produtivo como divertido. Meu agradecimento especial ao João Vianez, Rodrigo, Daisy e Jedson, pela contribuição neste trabalho, seja diretamente em experimentos e análises ou me substituindo em minhas tarefas quando eu já não era capaz de cumpri-las sozinha. Obrigada a todos amigos do CIT, em especial Eduardo Lana, Luciano, Poliana, Rafael, Tibério e Gabriela.

Agradeço imensamente às minhas amigas, orientadoras e conselheiras Janaína e Maria Helena, por toda paciência, ajuda, companheirismo nos momentos difíceis e felizes; a parceria de vocês faz com que eu tenha o triplo da capacidade que teria sozinha, obrigada minhas irmãs.

À minha família, obrigada por entender todas ausências nos aniversários e reuniões ao longo desses anos e continuar me incentivando e se orgulhando de cada passo avançado. Agradeço especialmente meus pais Alberto e Ivanete e minha irmã Laenna por serem meu alicerce e nunca me deixarem hesitar.

Gratidão em todos aspectos ao meu esposo João, pelas valiosas planilhas que me pouparam semanas de trabalho manual, por me dar força e entender de forma tão carinhosa minha excessiva dedicação ao doutorado nesses anos. Se eu já tive a soma direta dos amigos no trabalho, com minha família e marido, tive a força de sete, oito, nove pessoas para enfrentar todas dificuldades que apareceram neste trabalho, só posso dizer no plural, que conseguimos finalizar o nosso desafio!

Obrigada a todos não nomeados, que sabem que são importantes na minha vida e estiveram de alguma forma presentes nessa jornada, cada um de vocês é e sempre será muito importante.

*"Não existe triunfo sem perda,  
não há vitória sem sofrimento,  
não há liberdade sem sacrifício."*

(O Senhor dos Anéis, J.R.R. Tolkien)

## RESUMO

A dengue é a arbovirose mais prevalente no mundo, causada pelo vírus dengue (DENV) está presente em todos continentes. Por mais de três décadas tem sido um constante problema de saúde pública frequentemente fatal nos casos de dengue hemorrágica (DHF). A patogenia da dengue é intimamente relacionada à resposta imune do hospedeiro, atingindo quadros de inflamação exacerbada e autoimunidade transitória onde todos tecidos são atingidos, sendo o fígado um dos mais importantes no contexto de evolução dos quadros graves devido a intensa replicação viral nesse órgão e sua função significativa no metabolismo. O estudo de microRNAs (miRNA) como elementos regulatórios do metabolismo e da resposta imune durante a infecção é crucial para o entendimento dos mecanismos de regulação da expressão gênica durante a infecção pelo DENV, e pode auxiliar no desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapias anti-virais. Utilizamos a abordagem de miRA-Seq, utilizando a plataforma MySeq (Illumina) para identificar o perfil de miRNAs expressos no tecido hepático parafinizado de dez casos de óbito por DHF, comparando com cinco amostras de tecido sem infecção por DENV. Oito miRNAs apresentaram expressão diferencial no fígado de pacientes com DHF, sendo o miR-126-5p (molécula de regulação da proliferação de células endoteliais), e miR-133a-3p, regulados positivamente na DHF e miR-122-5p (um miRNA hepato-específico), miR-146a-5p (regulador de Interferon), miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-148a-5p, e miR-423-5p regulados negativamente. A análise funcional de vias KEGG e GO, a partir dos genes alvo preditos dos miRNAs superexpressos, identificou a maioria de vias de regulação da apoptose e da resposta imune com envolvimento de genes MAPK, RAS, CDK e FAS e da resposta imune com destaque para NF- $\kappa$ B, famílias CC e CX, Il e TLR. A mesma análise dos genes alvo dos miRNAs sub-expressos também identificou na maioria vias de apoptose e biossintéticas. No nosso conhecimento, essa é a primeira descrição *in vivo* do perfil de miRNAs no tecido hepático de pacientes com DHF. Os resultados em conjunto mostram uma provável relação dos miRNAs: miR-126-5p, miR-122-5p e miR-146a-5p com a patogenia do DENV no fígado no quadro de DHF através da regulação do reparo endotelial e permeabilidade vascular, controle da homeostase do fígado e regulação da expressão de citocinas inflamatórias.

## ABSTRACT

Dengue is the most prevalent arbovirolosis in the world caused by *Dengue virus* (DENV) and is present in all continents, for more than three decades has been a constant public health concern and often fatal by dengue hemorrhagic fever (DHF). The pathogenesis of dengue is closely related to the host immune response, reaching exacerbated inflammation and transient autoimmunity. All tissues are affected, which liver is one of the most important in severe conditions, due its intense viral replication and its significant role in metabolism. The study of microRNAs (miRNA) as regulatory elements of metabolism and immune response during infection is crucial to understanding the regulatory mechanisms of gene expression on DENV infection, and can help in diagnostic development of anti-viral therapies. We sequenced the miRNoma in MySeq platform (Illumina) to identify the miRNAs profile expressed in FFPE liver tissue, ten DHF fatal cases were compared to five control cases. Eight miRNAs exhibited differential expression in DHF liver, miR-126-5p, a regulatory molecule of endothelial cells, and miR-133a-3p are upregulated in dengue and miR-122-5p, a liver-specific miRNA, miR-146a-5p, interferon regulator, miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-148a-5p and miR-423-5p were downregulated. Functional analysis of KEGG pathways and GO terms with predicted target genes of overexpressed miRNAs found regulatory pathways of apoptosis and immune response, involving *MAPK* gene, *RAS*, *CDK* and *FAS*; immune response pathways showed NF- $\kappa$ B, CC and CX families, IL and TLR. The same analysis with target genes of downregulated miRNAs also identified in most pathways of apoptosis and biosynthetic pathways of metabolism. In our knowledge, this is the first description of the liver miRNA profile in DHF, the results together show a feasible relationship of miR-126-5p, miR-122-5p and miR-146a-5p with liver pathogenesis of DHF, through endothelial repair and vascular permeability regulation, control of homeostasis and liver expression regulation of inflammatory cytokines.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Árvore *neighbor-joining* compilada com sequências de flavivírus disponíveis no Genbank, usando Kimura dois parâmetros como fórmula de distância. As abreviações e nomenclaturas são as mesmas do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Vírus incluídos são: dengue 1-4 (DENV-1, 2, 3 e 4); *Kunjin* (KUNV); *West Nile* (WNV); *Murray Valley encephalitis* (MVEV); *Japanese encephalitis* (JEV); *Yellow fever* (YFV); *Louping Ill* (LIV); *Tick-borne encephalitis* (TBEV) linhagem Neudorlf (Neu); *Tick-borne encephalitis* (TBEV) linhagem Vasilchenko (Vas); *Langat* (LGTV); *Powassan* (POWV); *Montana myotis leukoencephalitis* (MMLV); *Rio Bravo* (RBV); *Modoc* (MODV); *Apoi* (APOIV); *Tamana bat* (TABV); Agente de fusão celular (CFAV). NKV - vetor artrópode desconhecido (Halstead 2008b).....18
- Figura 2:** Esquema da estrutura de proteínas de um flavivírus imaturo associado à célula (à esquerda) e a partícula madura à direita (Halstead 2008b).....19
- Figura 3:** Esquema representativo do ciclo de replicação do Vírus dengue. **A)** Legenda das proteínas codificadas pelo vírus dengue em cada região do genoma. **B)** Passo-a-passo da entrada na célula, replicação, maturação e liberação da partícula madura final (Tomlinson et al. 2009).....20
- Figura 4.** Fluxograma com a classificação atual de risco e manejo clínico de caso suspeito de dengue (Ministério Da Saúde 2016).....22
- Figura 5:** Janela de detecção de antígenos e anticorpos para o diagnóstico da dengue. NS1: proteína não estrutural 1; IgM: imunoglobulina M; IgG: imunoglobulina G. (Tang and Ooi 2012).....24
- Figura 6:** Presença e risco global de dengue em 2010. **a,** probabilidade de ocorrência de dengue com resolução espacial de 5Km. Áreas com alta probabilidade estão em vermelho e com baixas probabilidades estão em verde. **c,** mostra o cartograma do número anual de infecções para todas idades (Bhatt et al. 2013).....26
- Figura 7.** Incidência de dengue no Brasil nos anos de 2014, 2015 e 2016 (até a 16a semana epidemiológica. (Fonte: Sinan Online em 25/04/2016). .....28
- Figura 8:** Resposta imonológica cutânea à infecção do *Dengue virus* (DENV). Célula dendrítica (DC). Modificado de (St John et al. 2013).....30
- Figura 9.** Interação de linfócitos T com células infectadas e o efeito da ativação por peptídeos totalmente agonistas e agonistas parciais (Rothman 2011).....32
- Figura 10.** Efeito da imunoamplificação dependente de anticorpo na infecção e replicação viral (Rothman 2011).....33
- Figura 11:** Biogênese de microRNA. Droscha processa o pri-miRNA no núcleo para produzir o pre-miRNA, em outra via de síntese, ela ocorre a partir de íntrons, chamados mirtrons, essa via dispensa a ação da Droscha pois a excisão do íntron por splicing já gera o precursor do miRNA.

A partir daí as duas vias convergem para o transporte ao citoplasma, clivagem pela Dicer e ligação ao complexo de silenciamento induzido por miRNA – RISC (Krol et al. 2010).....37

**Figura 12.** Expressão de hsa-miR-126-5p nos tecidos hepáticos dos grupos de dengue hemorrágica (Dhf) e controle. Mostrando evidente regulação positiva no grupo de Dhf (logFC = 3,09; FDR = 0,00675).....50

**Figura 13.** Diferença na expressão do hsa-miR-122-5p entre grupos amostrais, evidenciando a diminuição no grupo de tecido hepático com dengue hemorrágica. Valores de expressão em log(CPM), logFC = -6,59; FDR < 0,00000001.....51

**Figura 14.** Boxplot de seis miRNAs diferencialmente expressos no fígado de dengue hemorrágica (DHF). miR-146a-5p: logFC = -2,6476 e FDR = 0,0387; miR-10b-5p: logFC = -6,1663 e FDR < 0,00000001; miR-204-5p: logFC = -5,6317 e FDR < 0,000001; miR-148a-5p: logFC = -3,1354 e FDR = 0,00722; miR-423-5p: logFC = -2,7806 e FDR = 0,04589.....51

**Figura 15.** Gráfico Heatmap construído com dados de CPM dos 38 miRNAs diferencialmente expressos com menor valor de FDR no teste Exato de Fisher. (DHF - febre hemorrágica da dengue; *Color Key* – chave de cores).....53

**Figura 16.** Análise MDSPlot, bidimensional com base nos valores de logFC (fold change), destacando o agrupamento das amostras DHF (febre hemorrágica da dengue) separadas das amostras controle (Control).....54

**Figura 17.** Análise de MDS entre os grupos de dengue hemorrágica de indivíduos com menos de 30 anos (preto) e indivíduos com mais de 30 anos (vermelho).....55

**Figura 18.** Análise de Heatmap baseada nos valores de CPM, mostrando os miRNAs diferencialmente expressos nos grupos de dengue hemorrágica (Dhf) com menos de 30 anos (Dhf\_140, Dhf\_253, Dhf\_277 e Dhf\_884) e mais de 30 anos (Dhf\_173, Dhf\_198, Dhf\_255, Dhf\_236 e Dhf\_347).....56

**Figura 19.** Anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos, regulados positivamente no tecido hepático do grupo de dengue hemorrágica, lista de vias mais os resultados estatísticos. Azul: vias de morte celular; vermelho: vias de resposta imune.....58

**Figura 20.** Rede de interações entre genes alvo dos miRNAs superexpressos no dengue hemorrágica com vias metabólicas obtidas na análise funcional do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Termos das vias em azul e símbolo oficial do gene em verde.....59

**Figura 21.** Anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos, regulados negativamente no tecido hepático do grupo de dengue hemorrágica, lista de vias mais os resultados estatísticos das 30 primeiras vias com menor valor de p ajustado pelo método Benjamini-Hochberg (FDR). Azul: vias de morte celular; verde: vias biossintéticas.....60

**Figura Suplementar 1.** Gráfico MDS Plot bidimensional construído com base no logFC (fold change) das 15 amostras (10 dengue hemorrágica e 5 controles).....76

**Figura Suplementar 2.** Gráfico MDS Plot bidimensional construído com base no logFC (fold change) de 11 amostras (6 dengue hemorrágica e 5 controles). Em evidência a amostra DHF\_299, como *outlier* e o agrupamento das outras, baseado em óbito por dengue e controle em dengue.....77

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados clínicos e dos resultados dos sequenciamentos por amostra. IAM: infarto agudo do miocárdio; Dhf: dengue hemorrágica.....45
- Tabela 2.** Lista dos 30 microRNAs mais expressos nos grupos de amostras de tecido hepático de controles e dengue hemorrágica (DHF) com respectivos valores de média de expressão por grupo, normalizados em *counts per million* (CPM).....47
- Tabela 3.** Resumo dos resultados obtidos da análise de expressão diferencial, apresentados os 38 microRNAs com valor de  $p < 0,05$  cujas expressões em CPM foram maiores que 5. Os microRNAs com diferença significativa são os com  $FDR < 0,05$  e  $\log FC > 2$ .....49
- Tabela Suplementar 1.** Resultados do teste para comparação entre os grupos de dengue hemorrágica (DHF) com menos e mais de 30 anos de idade.  $\log FC$ : log do Fold Change; GLM: General Linear Model; FDR: False Discovery Rate.....78
- Tabela Suplementar 2.** Dez grupos de anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs regulados positivamente no tecido hepático de indivíduos que faleceram de dengue hemorrágica. Presente as vias detectadas e os genes relacionados a cada uma com seus respectivos escores de enriquecimento, valores de  $p$  com ajuste de Benjamini.....79
- Tabela Suplementar 3.** Dez grupos de anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs regulados negativamente no tecido hepático de indivíduos que faleceram de dengue hemorrágica. Presente as vias detectadas e os genes relacionados a cada uma com seus respectivos escores de enriquecimento, valores de  $p$  com ajuste de Benjamini.....83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DENV	–	Virus dengue
EBV	–	Virus Epstein-Barr
HBV	–	Virus da hepatite B
HCV	–	Virus da hepatite C
JEV	–	Virus da encefalite japonesa
RNA	–	ácido ribonucleico
<i>dsRNA</i>	–	<i>RNA dupla fita</i>
<i>miRNA</i>	–	<i>MicroRNA</i>
<i>mRNA</i>	–	<i>RNA mensageiro</i>
<i>ncRNA</i>	–	<i>RNA não codificante</i>
<i>piRNA</i>	–	<i>RNA de interação com piwi</i>
<i>RNAi</i>	–	<i>interferência por RNA</i>
<i>sfRNA</i>	–	<i>RNA subgenômico de flavivirus</i>
<i>siRNA</i>	–	<i>pequenos RNA de interferência</i>
<i>ssRNA</i>	–	<i>RNA simples fita</i>
ALT	–	alanina aminotransferase
AST	–	aspartato amino transferase
C	–	proteína do capsídeo
cDNA	–	DNA (ácido desoxiribonucleico) complementar
CPM	–	counts per million
DC	–	célula dendrítica
DE	–	Expressão diferencial
E	–	proteína do envelope
FC	–	Fold Change
FDR	–	False Discovery Rate
DHF	–	Febre Hemorrágica da Dengue
GLM	–	General Linear Model
GO	–	Gene Ontology
hg_19	–	human genome versão 19
HLA	–	antígeno leucocitário humano
IAM	–	infarto agudo do miocárdio
IFN	–	Interferon
Ig	–	Imunoglobulina
IH	–	inibição da hemaglutinação
KEGG	–	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LMA	–	Leucemia Mielóide Aguda
M	–	proteína de membrana
MBL	–	lecitina ligadora de manose
MDS	–	multidimensional scale
MRE	–	elemento de reconhecimento de miRNA
NS	–	proteína não estrutural
ORF	–	quadro aberto de leitura
PAGE	–	eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	–	reação em cadeia da polimerase
pH	–	potencial hidrogeniônico
prM	–	proteína pré membrana
RISC	–	complexo de silenciamento induzido por miRNA
RT-PCR	–	PCR com transcrição reversa

SCD	_	síndrome do choque da dengue
SNP	_	polimorfismo de único nucleotídeo
TGF	_	fator de transformação do crescimento
TNF	_	fator de necrose tumoral
UTR	_	região não traduzida
WHO	_	organização mundial de saúde

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	Contextualização.....	16
1.2	O Vírus da dengue.....	17
1.3	Classificação, diagnóstico e tratamento.....	21
1.3.1	Classificação.....	21
1.3.2	Diagnóstico Laboratorial.....	23
1.3.3	Tratamento.....	25
1.4	Epidemiologia.....	25
1.5	Infecção e Imunopatogenia.....	30
1.6	RNAi: microRNAs.....	34
1.7	Regulação de miRNAs em doenças.....	36
1.8	Objetivos.....	40
1.8.1	Objetivo Geral.....	40
1.8.2	Objetivos Específicos.....	40
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODO.....</b>	<b>41</b>
2.1	Amostras.....	41
2.2	Extração de miRNA e Sequenciamento.....	41
2.3	Análises dos Dados de Sequenciamento.....	42
2.4	Análise de miRNAs Diferencialmente Expressos.....	43
2.5	Predição de Alvos dos miRNAs.....	43
2.6	Análise Funcional.....	43
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
3.1	Sequenciamento.....	44
3.2	Identificação de miRNAs expressos.....	46
3.3	Análise de Expressão Diferencial: DHF e Controles.....	47
3.4	Análise de Expressão Diferencial: DHF < 30 anos e DHF > 30 anos.....	54
3.5	Predição de Genes Alvo e Anotação Funcional.....	56
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>69</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Contextualização

A dengue é a arbovirose mais prevalente entre humanos, uma doença é caracterizada principalmente por febre, artralgia, mialgia e exantema. O *Vírus dengue* (*Dengue virus* – DENV) é transmitido pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Ae. albopictus*, que são vetores da doença e endêmicos em países tropicais e subtropicais. Uma vez no organismo do vetor, após o repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, o DENV passa por um período de incubação extrínseca, de oito a doze dias, e a partir daí está apto a transmitir o vírus até o fim do seu ciclo de vida (de seis a oito semanas).

O DENV e seu mosquito vetor são amplamente distribuídos ao redor do mundo, estando atualmente presentes em todos os continentes. Existem quatro sorotipos virais que apresentam proteção cruzada parcial entre si, todos são capazes de causar doença. A dengue é endêmica em mais de 100 países e aproximadamente 300 milhões de pessoas no mundo são infectadas pelo *Vírus dengue* por ano, 25% dos infectados desenvolvem quadros de dengue (Bhatt et al. 2013).

O período de incubação do vírus no hospedeiro humano é em média de cinco a seis dias, e a transmissão para o mosquito pode ocorrer durante o período de viremia, que começa um dia antes do aparecimento da febre, e vai até aproximadamente o quinto dia de doença. Foram identificados ciclos silvestres do DENV, tendo primatas não humanos como hospedeiros e mosquitos do gênero *Aedes* como vetores (Rico-Hesse 1990; Wang et al. 2000); há evidências de que na Ásia ou África, esses ancestrais silvestres tenham dado origem aos sorotipos DENV que hoje infectam humanos.

O quadro clínico varia desde formas mais brandas, chamadas Dengue Clássica, até quadros mais graves chamados Febre Hemorrágica da Dengue, caracterizada por uma síndrome de extravasamento plasmático que pode levar o indivíduo à morte se não tratado corretamente. Essas diferenças apresentadas entre infecções assintomáticas e diferentes níveis de gravidade da doença são alvos de extensas pesquisas, acredita-se que a causa seja imunopatológica, grande parte da sintomatologia da dengue deve-se à resposta do hospedeiro contra o vírus (Sun and Kochel 2013; Jain et al. 2014).

Durante a ação do sistema imune nas infecções, ocorre um aumento da comunicação entre células e intensa modificação do microambiente citoplasmático, com objetivo de regular a expressão dos genes necessários no desenvolvimento de proteção contra o agente, os miRNAs são moléculas de RNA que atuam nesse cenário, interferindo ativamente na expressão gênica.



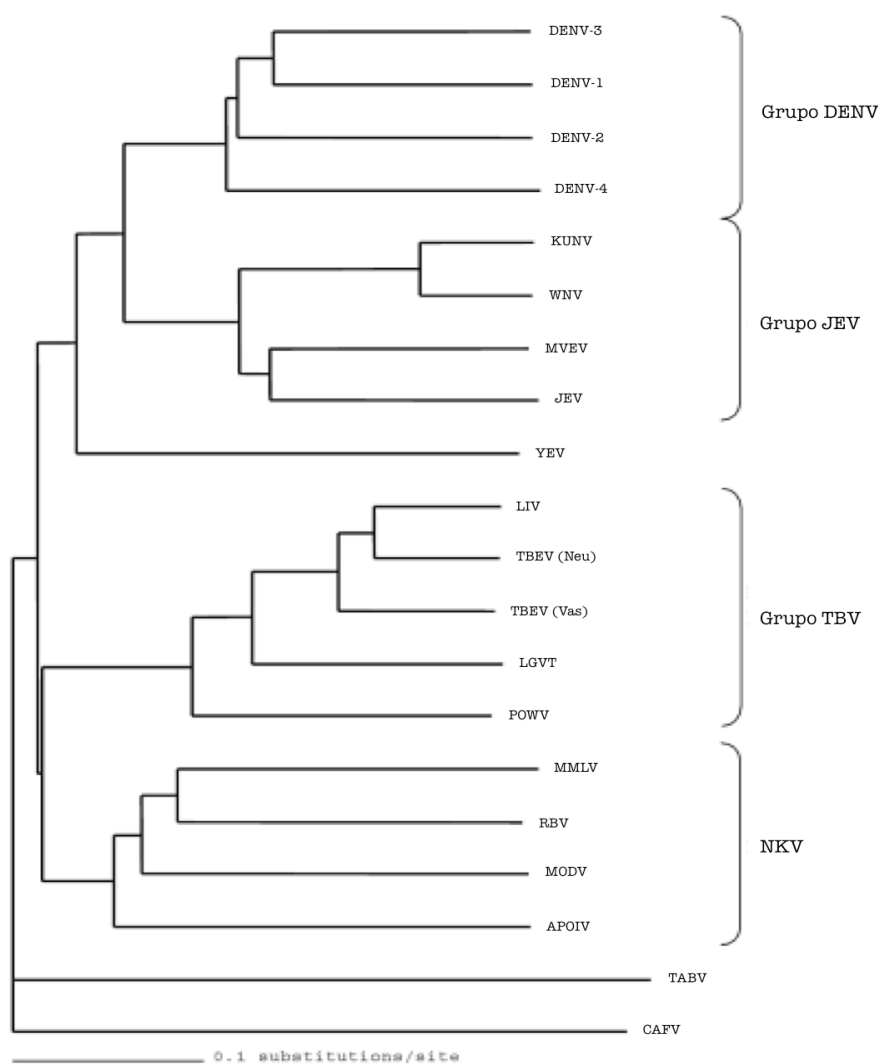
A presença de tipos diferentes de miRNA é altamente variável e sensível a muitas alterações no organismo, provocadas por exemplo por infecções, câncer e envelhecimento. Os microRNAs podem ser usados como marcadores de alterações (biomarcadores), possivelmente como mecanismos de tratamento, além de serem extremamente úteis no esclarecimento de mecanismos patogênicos das doenças.

## 1.2 O Vírus da dengue

O *Vírus dengue* (DENV) pertence ao gênero *Flavivirus*, da família *Flaviviridae*. Existem 53 vírus que infectam humanos e animais, pertencentes ao gênero *Flavivirus*, que são classificados também como arbovírus, que são vírus transmitidos aos hospedeiros vertebrados através de vetores artrópodes como mosquitos e carrapatos (Figura 1).

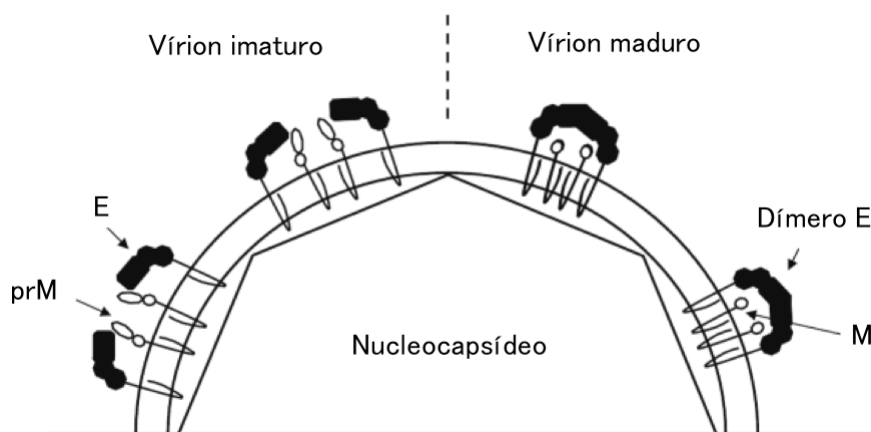
Existem vários grupos sorológicos de arbovírus no gênero *Flavivirus*, distinguidos através de testes mediados por anticorpos, inibição da hemaglutinação (IH) e reação de detecção da proteína NS1 (método mais recente que os anteriores); para o *Vírus dengue* são determinados quatro grupos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4.

O DENV é um vírus de RNA de fita simples com polaridade positiva envolvidos por um nucleocapsídeo de simetria icosaédrica e um envelope esférico de 40 a 50 nm de diâmetro derivado de membranas de células hospedeiras, representando de 15 a 20% do vírus total (Gurugama et al. 2010). Carboidratos representam 9-10% da partícula viral e os principais encontrados são glicolipídios e glicoproteínas.



**Figura 1:** Árvore *neighbor-joining* compilada com sequências de flavivírus disponíveis no Genbank, usando Kimura dois parâmetros como fórmula de distância. As abreviações e nomenclaturas são as mesmas do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV). Vírus incluídos são: dengue 1-4 (DENV-1, 2, 3 e 4); *Kunjin* (KUNV); *West Nile* (WNV); *Murray Valley encephalitis* (MVEV); *Japanese encephalitis* (JEV); *Yellow fever* (YFV); *Louping Ill* (LIV); *Tick-borne encephalitis* (TBEV) linhagem Neudorlf (Neu); *Tick-borne encephalitis* (TBEV) linhagem Vasilchenko (Vas); *Langat* (LGTV); *Powassan* (POWV); *Montana myotis leukoencephalitis* (MMLV); *Rio Bravo* (RBV); *Modoc* (MODV); *Apoi* (APOIV); *Tamana bat* (TABV); Agente de fusão celular (CAFAV). NKV - vetor artrópode desconhecido (Halstead 2008b).

Virions são formados pelas proteínas estruturais do Capsídeo (C), Membrana (M) e Envelope (E) e pelo genoma de RNA (Figura 2), as proteínas estruturais não participam da replicação viral, apenas as proteínas não estruturais (NS), que por sua vez não estão presentes em níveis detectáveis nas partículas maduras.

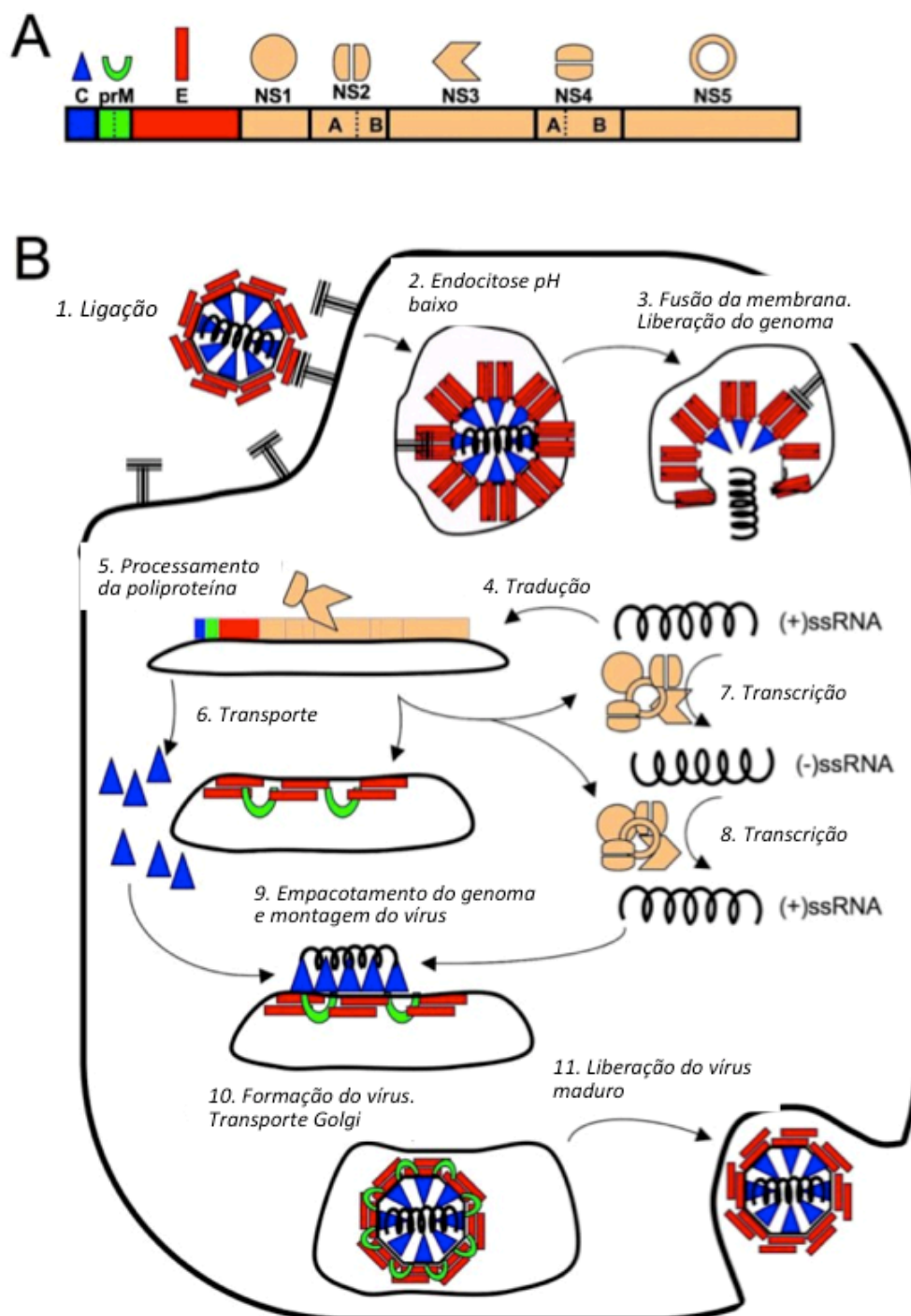


**Figura 2:** Esquema da estrutura de proteínas de um flavivírus imaturo associado à célula (à esquerda) e a partícula madura à direita (Halstead 2008b).

A proteína E é uma proteína N-glicosilada de fusão da membrana, composta por três domínios envolvidos na virulência: domínio I e domínio II abrigam o peptídeo de fusão em sua extremidade distal e o peptídeo III é responsável pela ligação com receptor (Chen et al. 1996). Formando o capsídeo encontram-se heterotetrâmeros de E:M:M:E que ancoram a região subjacente à bicamada lipídica do envelope, através de hélices transmembrana E-T1, E-T2, M-T1 e M-T2 esse conjunto forma a estrutura viral e envolve o material genético (Zhang et al. 2013).

O genoma viral completo possui aproximadamente 11 kb e apenas uma matriz de leitura aberta (*open reading frame* – ORF), flanqueada por regiões não traduzidas (*untranslated region* - UTR) a 5' de 100 nt, com um *cap* tipo I m<sup>7</sup>G5'ppp5'A no mRNA e a 3' com 400 a 800 nt, essas regiões possuem várias sequências conservadas e estruturas de haste e laço que acredita-se estarem envolvidas nos processos de replicação, tradução e interação com o hospedeiro (Brinton et al. 1986; Hahn et al. 1987).

A ORF produz uma única poliproteína (Figura 3) que é clivada por proteases virais e do hospedeiro em proteínas estruturais: capsídeo, pré-membrana/membrana e envelope (C, preM/M e E); e proteínas não-estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Weaver and Reisen 2010). A síntese proteica é realizada no retículo endoplasmático, onde regiões de ancoragem na membrana direcionam a topologia da poliproteína, as proteínas estruturais e a não-estrutural NS1 são projetadas para o lúmen do retículo endoplasmático, onde ocorrerá a maturação viral (Murphy and Whitehead 2011).



**Figura 3:** Esquema representativo do ciclo de replicação do Vírus dengue. **A)** Legenda das proteínas codificadas pelo vírus dengue em cada região do genoma. **B)** Passo-a-passo da entrada na célula, replicação, maturação e liberação da partícula madura final (Tomlinson et al. 2009).

A conformação molecular da proteína E é altamente modulada pelo pH do ambiente, em pH alcalino ela possui conformação dimérica aderida ao longo da superfície viral e em pH ácido, como no interior do endossomo, a proteína adquire uma conformação tridimensional e projeta-se da superfície viral. Essa característica é importante, pois facilita a interação com a membrana de fusão e a liberação do genoma viral para o citoplasma (Murphy and Whitehead

2011; Jain et al. 2014). Como principal proteína exposta na superfície viral, a glicoproteína E deve executar funções de ligação com receptores celulares, fusão com membranas celulares do hospedeiro, direcionamento da montagem viral e apresentação de grupos antigênicos que induzem a resposta imune (Modis et al. 2004).

Depois de infectar o mosquito, o vírus exerce intensa replicação no esôfago, a partir daí que a infecção será disseminada para outros tecidos. Para que o vírus seja transmitido durante o repasto sanguíneo para um hospedeiro humano ou primata, o DENV deve chegar até as glândulas salivares e promover replicação para que seja secretado na saliva (Halstead 2008a).

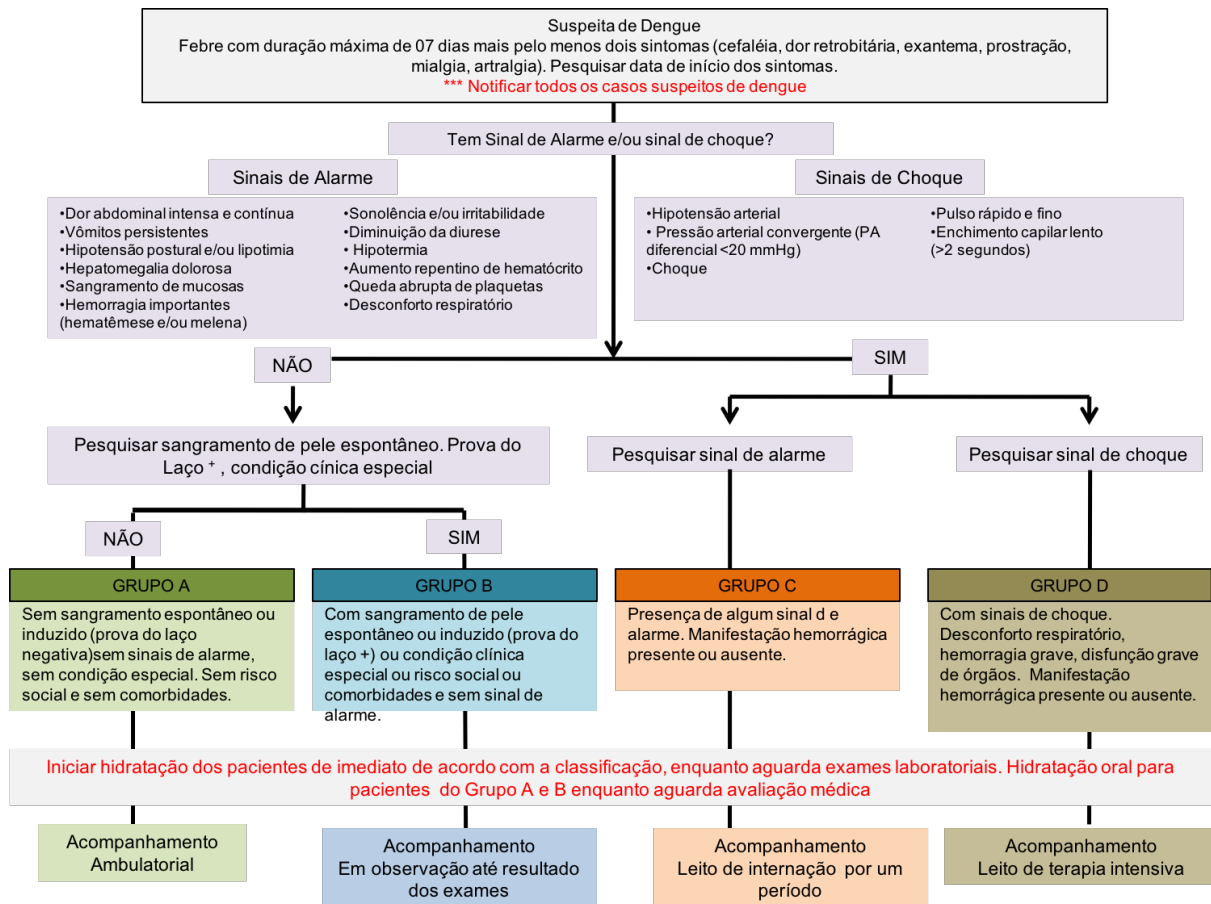
### **1.3 Classificação, diagnóstico e tratamento**

A dengue é uma doença aguda febril de amplo espectro de manifestações, desde uma infecção assintomática, na maioria dos casos, até casos muito graves que necessitam acompanhamento médico constante.

Depois do período de incubação, geralmente 3 a 6 dias após a inoculação do vírus, quadros de dengue tem início abrupto com febre alta (entre 39°C e 40°C). Em crianças pequenas, a fase de febre pode levar à desidratação e distúrbios neurológicos que podem causar convulsões. A doença é altamente incapacitante, causando grandes limitações para o indivíduo, devido a intensa cefaleia, dor retro-orbital, mialgia, artralgia, petéquias, exantema e leucopenia. O exantema está presente em aproximadamente 50% dos casos e é principalmente do tipo maculo-papular, atingindo face, tronco e membros (WHO 2009; Brasil 2013).

#### **1.3.1 Classificação**

Em 2009, uma nova classificação foi publicada pela WHO, e adotada pelo Ministério da Saúde em 2014. Este documento classifica a doença em dengue, dengue com sinais de alarme e dengue grave. Inicialmente todos os casos são tratados como suspeitos e passam a ser confirmados com resultados positivos em testes laboratoriais (IgM, detecção de NS1, isolamento viral, PCR ou imunohistoquímica). A figura 4 apresenta um fluxograma com a classificação e o manejo clínico do paciente com dengue.



**Figura 4.** Fluxograma com a classificação atual de risco e manejo clínico de caso suspeito de dengue (Ministério Da Saúde 2016).

Apesar da classificação atual, a anterior e os termos Dengue Clássica (*Dengue Fever - DF*), Febre Hemorrágica da Dengue (*Dengue Hemorrhagic Fever – DHF*) e Síndrome do Choque da Dengue (*Dengue Shock Syndrome – DSS*) ainda são amplamente utilizados principalmente na literatura científica, por esse motivo mais o fato de que na época do diagnóstico das amostras utilizadas neste trabalho, a classificação adotada era a anterior, neste trabalho será utilizada a nomenclatura febre hemorrágica da dengue ou dengue hemorrágica (*DHF – dengue hemorrhagic fever*). A classificação anterior é detalhada a seguir:

- a) Dengue Clássica (*DC*)  
É o caso suspeito, confirmado laboratorialmente. Em epidemias, os primeiros casos da área devem ter confirmação laboratorial e os demais diagnósticos podem ser clínico-epidemiológicos;
- b) Febre Hemorrágica da Dengue (*DHF*)  
Caso confirmado laboratorialmente, com a presença dos seguintes critérios:
  - Febre ou história de febre recente de sete dias;
  - Trombocitopenia ( $\leq 100.000/\text{mm}^3$ );

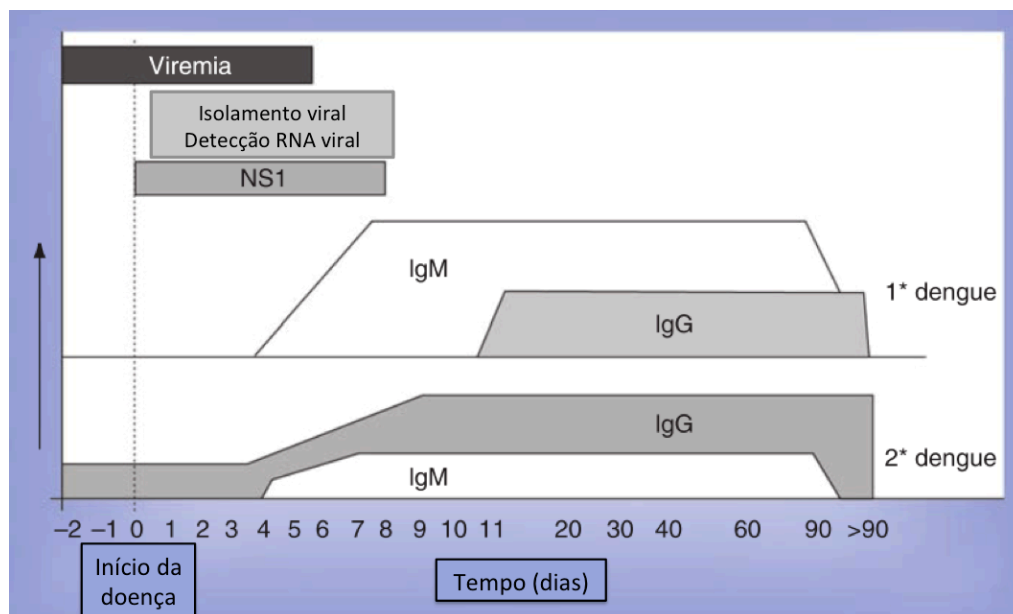
- Tendências hemorrágicas evidenciadas por: prova do laço positiva, petéquias, equimoses ou púrpuras, sangramentos de mucosas do trato gastrintestinal e outros;
- Extravasamento de plasma causado por aumento de permeabilidade capilar detectado por: hematócrito com aumento de 20% sobre o basal inicial; queda do hematócrito em 20%, após o tratamento adequado; derrame pleural, ascite ou hipoproteinemia.

A DHF pode ser classificada de acordo com o nível de gravidade apresentado:

- *Grau I*: febre acompanhada de sintomas inespecíficos, em que a única manifestação hemorrágica é a prova do laço positiva;
- *Grau II*: além das manifestações do grau I, hemorragias espontâneas leves (sangramento de pele, epistaxe, gengivorragia e outros);
- *Grau III*: Síndrome do Choque da Dengue (SCD), colapso circulatório com pulso fraco e rápido, estreitamento da pressão arterial ou hipotensão, pele pegajosa e fria e inquietação;
- *Grau IV*: Síndrome do Choque da Dengue (SCD), ou seja, choque profundo com ausência de pressão arterial e pressão de pulso imperceptível.

### 1.3.2 Diagnóstico Laboratorial

A confirmação do caso suspeito de dengue é realizada obrigatoriamente através de testes laboratoriais, a figura 5 mostra o tempo aproximado de desenvolvimento da doença e o momento em que cada teste deve ser realizado.



**Figura 5:** Janela de detecção de antígenos e anticorpos para o diagnóstico da dengue. NS1: proteína não estrutural 1; IgM: imunoglobulina M; IgG: imunoglobulina G. (Tang and Ooi 2012).

A viremia inicia 2 a 3 dias antes do aparecimento dos sintomas e perdura até 4 a 5 dias depois. Durante esse período, sangue, plasma ou soro podem ser usados para o isolamento do vírus. A técnica mais usada na rotina de diagnóstico é a inoculação em linhagens de células C6/36 derivadas de *Ae. albopictus* (Tesh 1979), o sucesso do isolamento pode ser verificado através do efeito citopático e por ensaios de imunofluorescência com anticorpos monoclonais.

Outro método utilizado é a reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida de transcrição reversa (RT-PCR); realizada após extração de RNA viral a partir de sangue, soro ou plasma; é um método sensível e específico para confirmação de dengue. Vários *primers* e protocolos estão descritos para amplificação de regiões do genoma do DENV por meio de PCR convencional ou PCR em tempo real, utilizando SYBR Green ou sondas oligonucleotídicas.

Métodos de detecção de antígenos virais e anticorpos específicos são frequentemente utilizados devido seu baixo custo, simplicidade e rapidez de execução. A proteína NS1 é altamente conservada e secretada de células infectadas, seus níveis no soro ou plasma são correlacionados com a viremia e a gravidade da doença, a captura de NS1 através de anticorpos apresenta sensibilidade de 94 a 98% (Poloni et al. 2010; Hirayama et al. 2012). Os testes com imunoglobulinas M e G (IgM e IgG) são os mais amplamente utilizados para confirmação de dengue. Presença de IgM é detectada a partir do 3<sup>o</sup> ao 5<sup>o</sup> dia da doença e permanece circulante até aproximadamente 180 dias. Para um diagnóstico confiável, é preciso demonstrar a conversão sorológica com amostras pareadas identificando o aumento nos títulos de IgM. A



resposta de anticorpos antidengue apresenta reação cruzada entre os quatro sorotipos e outros flavivírus; falsos positivos são encontrados em pacientes com infecções prévias de dengue e malária (Groen et al. 2000; Prince and Matud 2011).

### 1.3.3 Tratamento

O controle da reprodução do vetor é o único método de prevenção da dengue disponível. Ainda não existem vacinas ou drogas antivirais específicas para o DENV, mas existem alguns modelos candidatos em desenvolvimento, entre eles vacinas de vírus vivos atenuados, vírus vivos quiméricos (GUY et al., 2015), vírus inativados e de vírus vivos recombinantes (MURRELL; WU; BUTLER, 2011). O tratamento dos pacientes consiste em cuidado de apoio aos sintomas como repouso, antitérmicos e analgésicos. Em casos de choque hipovolêmico, é imprescindível hospitalização para reposição de fluidos perdidos com o extravasamento vascular. Aspirinas e outros salicilatos devem ser evitados devido o aumento de permeabilidade capilar (Tang and Ooi 2012).

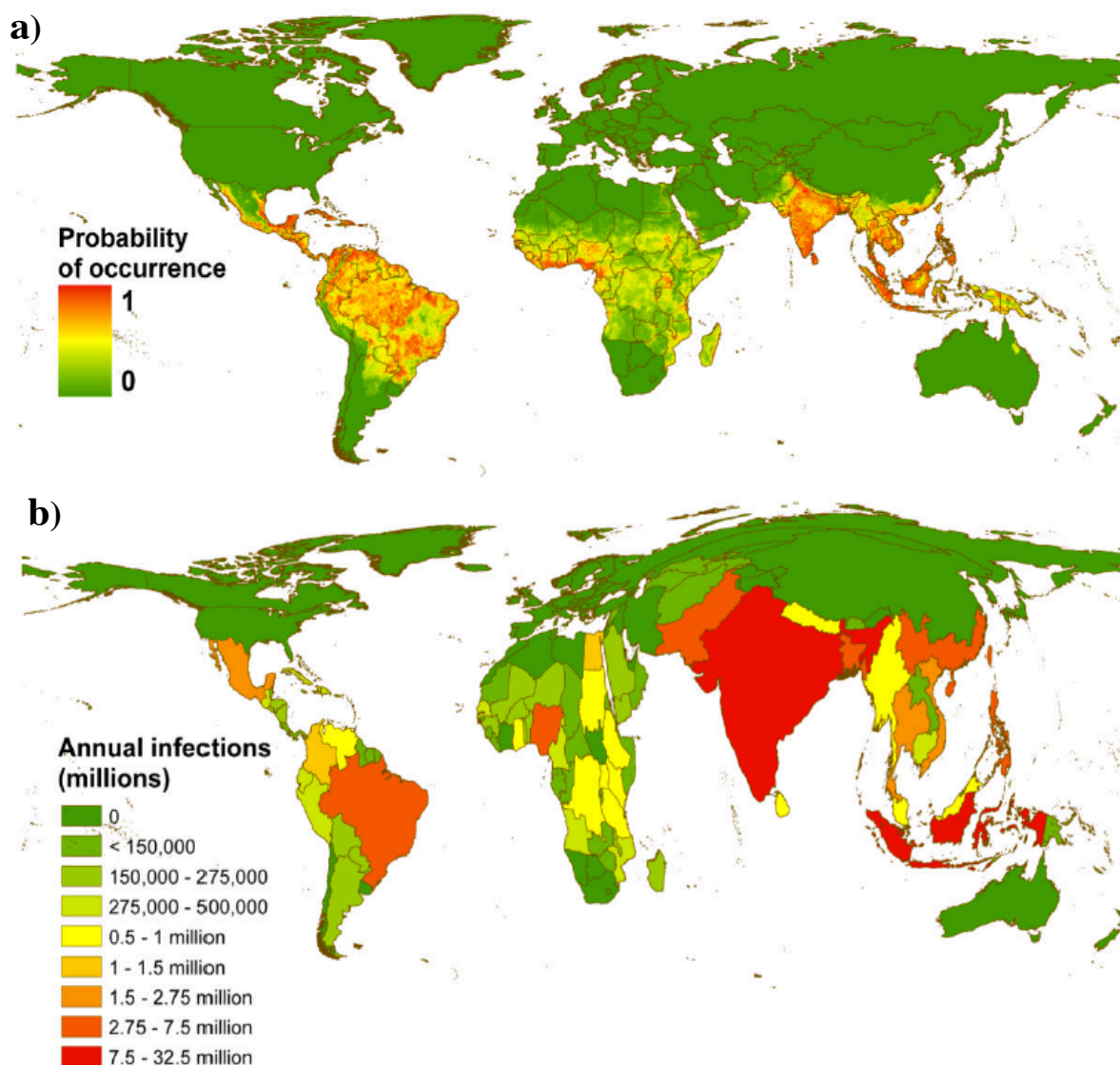
Na ausência de sinais de alarme, a conduta utilizada é apenas o acompanhamento ambulatorial e hidratação oral. Drogas sintomáticas são recomendadas para pacientes com febre elevada e dor. Nos casos de dengue com sintomas clássicos sem sinais de alarme mas com a presença de sangramento espontâneo (petéquias) ou induzido (prova do laço) e condições clínicas especiais e/ou comorbidades, a conduta terapêutica consiste nas mesmas citadas anteriormente e além disso um acompanhamento de exames constantes, verificando sempre o estado do hemograma e hematócrito. Nos casos com presença de sinais de alarme, a hidratação venosa deve ser imediata, dependendo da gravidade do quadro e dos resultados dos exames, o paciente deve ser encaminhado para leito de internação por no mínimo 48h, nos casos de choque a internação deve ser em leitos de terapia intensiva com reposição volêmica e avaliação clínica a cada 15-30 minutos (Brasil 2013; Bäck and Lundkvist 2013).

## 1.4 Epidemiologia

O número global de infecções anuais de dengue tem sido estimado em vários estudos, várias incidências foram sugeridas, mas o número oficial mais citado e adotado pela WHO é de 50 a 100 milhões de infecções por ano. (Bhatt et al. 2013) realizaram uma metanálise e chegaram ao total de 294 milhões de infecções no ano de 2010 (Figura 6). No século XX foi observado um importante aumento no número de casos e gravidade, provavelmente devido o crescimento populacional, urbanização e desenvolvimento do transporte aéreo, que permitiu

que um indivíduo se deslocasse entre continentes diferentes dentro do período de incubação/viremia possibilitando a transmissão (Gubler 2002). O maior registro de pandemia ocorreu em 1998, quando 56 países foram atingidos e cerca de 1,2 bilhão de pessoas foram infectadas (Gurugama et al. 2010).

Cuba foi o primeiro país da América Latina a relatar uma grande epidemia de dengue no período de 1977-78, com o sorotipo DENV-1. A primeira epidemia de DHF ocorreu em 1981 com o sorotipo DENV-2. Com um programa de controle do vetor, Cuba alcançou um período de 16 anos sem dengue, até 1997, quando outra epidemia de DENV-2 afetou a região (Guzmán et al. 1999).



**Figura 6:** Presença e risco global de dengue em 2010. **a**, probabilidade de ocorrência de dengue com resolução espacial de 5Km. Áreas com alta probabilidade estão em vermelho e com baixas probabilidades estão em verde. **b**, mostra o cartograma do número anual de infecções para todas idades (Bhatt et al. 2013).

Os primeiros casos de dengue registrados no Brasil datam do século XIX. Em 1981-82 os vírus DENV-1 e DENV-4 foram isolados pela primeira vez durante a epidemia em Boa Vista, Roraima, região próxima da Venezuela; foram efetuadas ações de controle do mosquito vetor e não houveram epidemias no Brasil dentro dos quatro anos seguintes. Vieram ocorrer novamente epidemias de dengue causadas pelo vírus DENV-1, nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e estados do nordeste do Brasil nos anos 1986 e 1987.

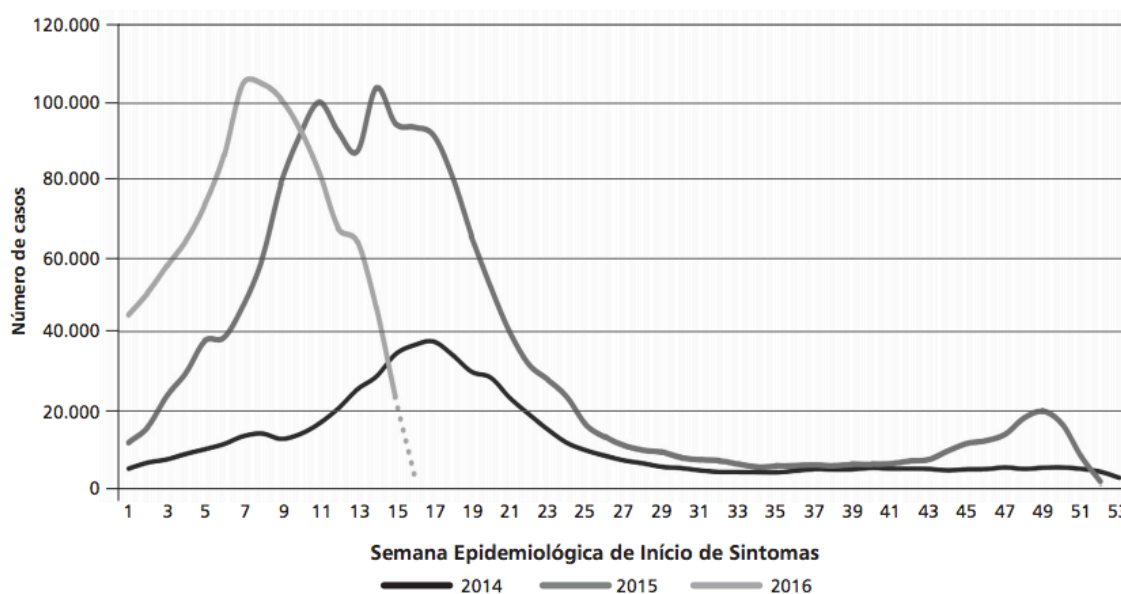
Em 1990 e 1991 a epidemia foi provocada por vírus do sorotipo 2 e acometeu novamente os estados do Rio de Janeiro, São Paulo, além de Mato Grosso e Tocantins, DENV-1 também circulava nesse mesmo período em São Paulo e Minas Gerais (Dégallier et al. 1996; Nogueira et al. 2007).

Em 1992 foi identificada a reintrodução do *Ae. aegypti* no estado do Pará e em 1995 foram notificados os primeiros casos de dengue nas cidades de Redenção e Rondon do Pará. No ano de 1996, foram registrados em Belém oito casos de uma doença febril que viria a ser identificada como dengue semanas depois, após o isolamento do vírus DENV-1 e um ano depois o DENV-2 também foi isolado, a partir daí ambos sorotipos continuaram circulantes na cidade de Belém (Travassos da Rosa et al. 2000).

O sorotipo 3 foi predominante a partir de 2003, a partir de 2007, a prevalência foi do DENV-2 (Teixeira et al. 2013). Em julho de 2010 o sorotipo DENV-4 ressurgiu em Boa Vista (RR), após 28 anos ausente em epidemias no Brasil (Temporão et al. 2011). A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS) registrou um total de 1.484.899 casos prováveis de dengue no país até a semana epidemiológica 48 (30/12/2012 a 30/11/2013) de 2013. A Região Sudeste teve o maior número de casos (940.453 casos; 63,3%), seguida da Região Centro-Oeste (274.109 casos; 18,5%), Nordeste (151.012 casos; 10,2%), Sul (69.030 casos; 4,6%) e Norte (50.295 casos; 3,4%). A incidência global do país em 2013 foi de 765,5 casos por 100.000 habitantes e todas as regiões apresentaram incidência acima de 100 casos por 100.000 habitantes. Na análise comparativa em relação ao ano de 2012, observa-se aumento de 163% dos casos no país. No boletim epidemiológico de 2016, até a semana 16 os casos de dengue no Brasil já superam os números de 2015, e ambos já têm incidência maior que 2014 em pelo menos o dobro (Figura 7).

A transmissão do DENV é dependente do vetor *Aedes aegypti*, e *Aedes albopictus*, portanto, a disseminação do vírus depende da distribuição geográfica do mosquito (WHO 1997). A reprodução do vetor ocorre com a deposição de ovos em ambientes que acumulem água, onde ocorre a eclosão e desenvolvimento de larvas, pupas até a forma adulta; a densidade

de mosquitos aumenta em períodos chuvosos, levando ao conseqüente aumento no número de casos, no Estado do Pará, o número máximo de casos registrados de dengue ocorre entre janeiro e março. O *Ae. aegypti* é altamente adaptado ao ambiente urbano e vive em proximidade com seres humanos, seu ciclo de alimentação permite com que um único mosquito consiga entrar em contato com múltiplos hospedeiros em um ciclo gonotrófico (Bäck and Lundkvist 2013).



**Figura 7.** Incidência de dengue no Brasil nos anos de 2014, 2015 e 2016 (até a 16ª semana epidemiológica). (Fonte: Sinan Online em 25/04/2016).

Todos os quatro sorotipos do DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4) são capazes de causar quadros graves de dengue, sendo que a carga viral no decorrer da doença está fortemente associada ao desenvolvimento de dengue grave. Sorotipos DENV-2 e DENV-4 aparecem menos frequentemente associados com quadros graves durante a infecção primária da dengue, enquanto que em infecções secundárias DENV-2 e DENV-3 são mais frequentemente associados a quadros graves (Fried et al. 2010).

É comum a ocorrência de oscilações na prevalência de cada sorotipo em um cenário de epidemia, normalmente um sorotipo é dominante durante um período de 2 a 4 anos, quando sua prevalência diminui e dá lugar a um outro sorotipo que o substitui (Adams et al., 2006). A causa para esse declínio seria o acúmulo de imunidade de rebanho em uma população, onde o número de indivíduos suscetíveis diminuiria ao longo desses anos (Whitehorn e Simmons, 2011).

Tratando das características epidemiológicas em seres humanos, a idade é um fator de risco importante para o desenvolvimento de quadros graves e para mortalidade. Em populações asiáticas, a taxa de mortalidade por dengue entre crianças na faixa etária de um a cinco anos é quatro vezes maior que em crianças de onze a quinze anos, com uma maior prevalência de SCD

em relação a adultos, provavelmente devido a uma maior permeabilidade do endotélio vascular (Gamble *et al.*, 2000).

Durante epidemias em Cuba, foi observado que comorbidades pré-existentes tais como asma brônquica, diabetes melitus e anemia falciforme apresentavam altas frequências entre pacientes com quadros graves de dengue (Bravo *et al.*, 1987; Díaz *et al.*, 1988; Limonta *et al.*, 2009). No Brasil, um estudo realizado nas cidades de Fortaleza e Salvador encontrou que entre os casos de DHF havia alta frequência de indivíduos com alergia e diabetes (Figueiredo *et al.*, 2010). Também tem sido observado que condições clínicas crônicas estão presentes em 70% dos casos fatais de dengue (Rigau-Pérez e Laufer, 2006). Trabalhos em Singapura encontraram que em pacientes com hipertensão os quadros de dengue são geralmente benignos (Lye *et al.*, 2010).

Evidências que a genética do hospedeiro influencia na suscetibilidade à dengue vêm de estudos caso-controle. Durante a infecção, os antígenos virais são apresentados aos linfócitos T através do complexo principal de histocompatibilidade, em humanos HLA (Human Leucocyte Antigen) de classe I e II. Diversos alelos diferentes do HLA, entre eles alelos de HLA-A e B são associados com diferentes fenótipos de dengue, alguns conferindo proteção ou suscetibilidade ao desenvolvimento de dengue e/ou DHF (Stephens *et al.*, 2002; Coffey *et al.*, 2009). Uma hipótese para a geração de suscetibilidade através de moléculas de HLA é que a natureza e a magnitude da resposta imune gerada apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC de classe I poderia contribuir com a imunopatologia da dengue. (Kalayanarooj *et al.*, 2007) foi o primeiro estudo a associar o grupo sanguíneo ABO com a dengue, este estudo encontrou que crianças com o tipo AB tinham maior probabilidade de desenvolver DHF do que crianças do tipo O, A ou B.

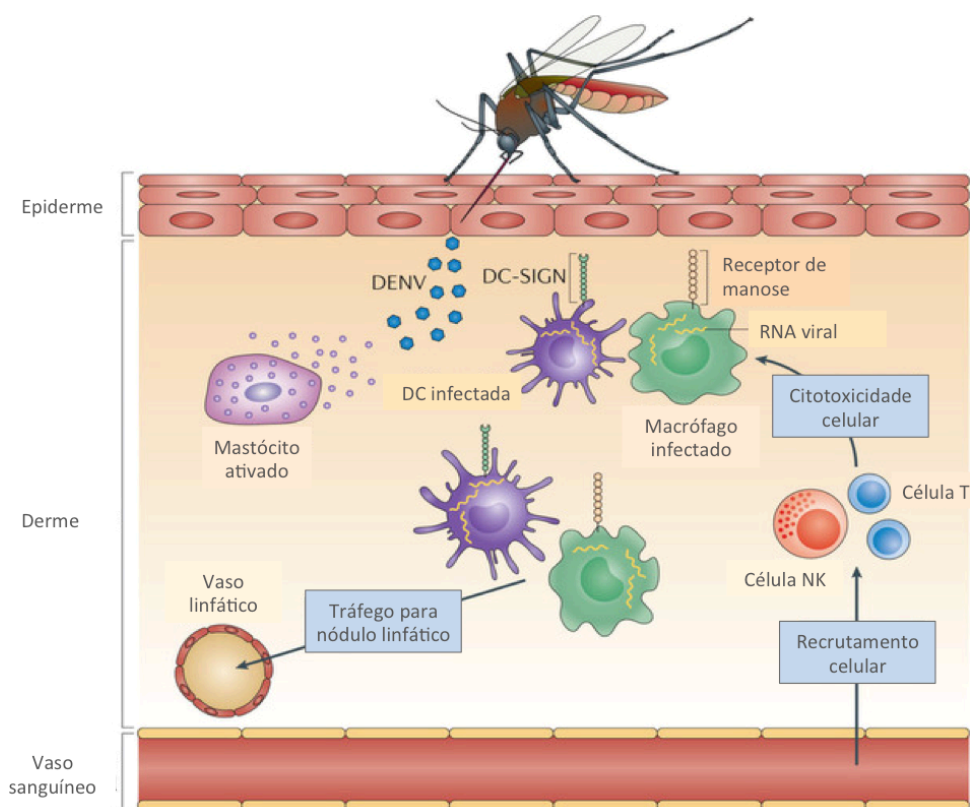
Vários polimorfismos de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism – SNP) têm sido associados ao desenvolvimento da dengue e suas formas clínicas. Um SNP no gene que codifica receptores Fcγ presentes em células dendríticas (*dendritic cell* - DC) foi associado com proteção contra dengue grave (DG) em pacientes do Vietnã; polimorfismo não-sinônimo, alelo C no gene do receptor de vitamina D foi associado com proteção contra SCD; o alelo A na região promotora de TNF-α foi associado com risco de DG em pacientes da Venezuela; e polimorfismo na proteína de sinalização JAK1 foi associado com DG em população brasileira (Silva *et al.*, 2010; Coffey *et al.*, 2009; Stephens, 2010).

O receptor de células dendríticas DC-SIGN (codificado pelo gene CD209), já citado, é um fator de ligação do DENV por meio do qual DC são infectadas. Vários polimorfismos no

gene CD209 já foram identificados e associados a doenças em que o microrganismo utiliza esse receptor na infecção (Sakuntabhai et al. 2005; Wang et al. 2011; Oliveira et al. 2014).

### 1.5 Infecção e Imunopatogenia

No ponto inicial da infecção, durante o repasto sanguíneo (da fêmea do mosquito do gênero *Aedes*) em humanos, o DENV é injetado e infecta inicialmente as células de Langerhans (células dendríticas [*dendritic cell* - DC] epidérmicas) e queratinócitos (figura 8). As células infectadas migram do sítio de infecção para os linfonodos, onde monócitos e macrófagos são recrutados e se tornarão alvo da infecção, conseqüentemente o vírus replica-se e dissemina-se pelo sistema linfático. Em autópsias de casos fatais, foram encontrados vírus nos tecidos da pele, fígado, baço, linfonodos, rins, medula óssea, pulmão, timo e cérebro (Martina et al. 2009; Wan et al. 2013).



**Figura 8:** Resposta imunológica cutânea à infecção do *Dengue virus* (DENV). Célula dendrítica (DC). Modificado de (St John et al. 2013).

Após essa viremia primária, várias células da linhagem mononuclear são infectadas, dentre elas DC mielóides, monócitos e macrófagos; nesse processo, muitas dessas células infectadas morrem por apoptose; as células infectadas são estimuladas a produzir uma gama de

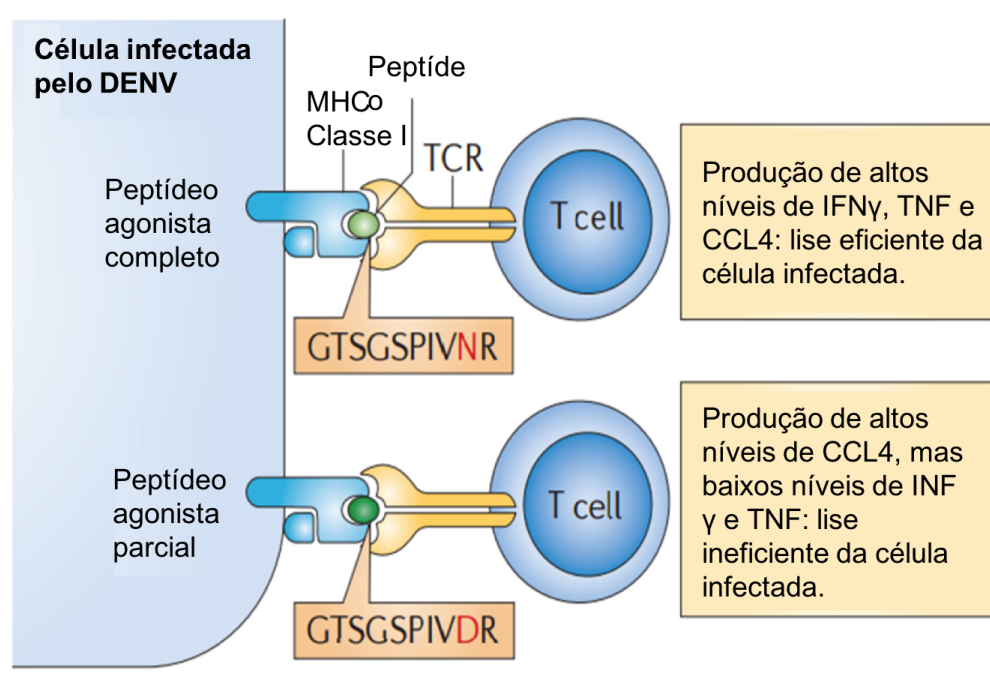
mediadores envolvidos na inflamação e homeostase do hospedeiro (Libraty et al. 2001; Fernandez-Gracia et al. 2009; Martina et al. 2009).

A grande variedade de tecidos e células infectadas do hospedeiro sugere que os receptores para o DENV sejam amplamente distribuídos. Atualmente, vários são os candidatos a receptores para o vírus, entre eles Lecitina Ligadora de Manose (MBL), Heparan Sulfato, Sulfato de Condroitina e CD209 (Libraty et al. 2001; Avirutnan et al. 2007; Miller et al. 2008). O DENV causa lesão em vários órgãos, sendo o fígado o mais atingido, é um sítio de intensa replicação e contribui significativamente para o aumento da carga viral. Os receptores hepáticos descritos são os proteoglicanos de heparan sulfato, via de entrada do DENV nos hepatócitos, que são as células mais atingidas durante a infecção junto com as células de Kupffer (Hilgard and Stockert 2000; Sreekanth et al. 2016). As alterações mais importantes no fígado durante a dengue são mediadas pela apoptose e necrose de hepatócitos, essas alterações acompanham insuficiência portal e infiltrado inflamatório intralobular de células mononucleares (Pagliari et al. 2014). Em análises histopatológicas de fígado de casos fatais por dengue, são encontrados adicionalmente hemorragia, edema, danos causados por alterações metabólicas e reações inflamatórias, esteatose, hiperplasia e destruição das células de Kupffer (Póvoa et al. 2014). Acredita-se que a inflamação no fígado se desenvolva com o objetivo de proteger os hepatócitos de dano, favorecer o reparo dos tecidos lesionados e para o reestabelecimento da homeostase (Brenner et al. 2013).

A infecção e inflamação no fígado leva ao desenvolvimento de um ambiente com várias células expressando IL-6 e TGF-beta, com ausência de células expressando Foxp3, identificado no estudo de Pagliari et al. (2014). A expressão de TGF-beta pode estar relacionada à apoptose de hepatócitos, caracterizada histologicamente pela presença dos corpúsculos de Councilman. Tanto IL-6 como TGF-beta são citocinas com funções importantes na inflamação e provavelmente estão associadas ao aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e consequente agravamento dos sintomas da dengue (Pagliari et al. 2014). TNF-alfa, IFN-gama e IL-2 também são citocinas vasoativas que podem ser expressas durante a infecção, (Lühn et al. 2007) identificaram a capacidade de linfócitos Treg em inibir a produção dessas citocinas durante a dengue.

Em relação à resposta celular contra o DENV, vários epítomos de proteínas diferentes tem sido identificados sendo reconhecidos por linfócitos: linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem epítomos das proteínas NS4B, NS5 e principalmente NS3, enquanto células T CD4<sup>+</sup> reconhecem capsídeo, proteína E e NS3 (Weiskopf and Sette 2014). Linfócitos T de memória reagem contra vírus heterólogos e podem gerar uma imunidade parcial, entretanto podem causar

imunopatologia. De acordo com a teoria do “pecado original antigênico” células T de memória de baixa afinidade geradas na primeira infecção de DENV se expandem seletivamente durante a segunda infecção por outro sorotipo, isso acontece antes da ativação de células T *naive* de maior avides (Figura 9). A reação cruzada leva a produção de grandes concentrações de citocinas pro-inflamatórias que contribuem para a patogênese e extravasamento plasmático na dengue, entretanto esse processo não é necessário para causar dengue graves em crianças (Wan et al. 2013; Weiskopf and Sette 2014).



**Figura 9.** Interação de linfócitos T com células infectadas e o efeito da ativação por peptídeos totalmente agonistas e agonistas parciais (Rothman 2011).

Tanto a resposta imune celular quanto a humoral contribuem para a eliminação do vírus. A inibição da infectividade viral por anticorpos de neutralização tem um importante papel na proteção contra a dengue. Assim como no modelo celular descrito, o papel da indução de anticorpos também pode apresentar dois lados, gerando proteção e contribuindo para o desenvolvimento de quadros mais graves da doença.

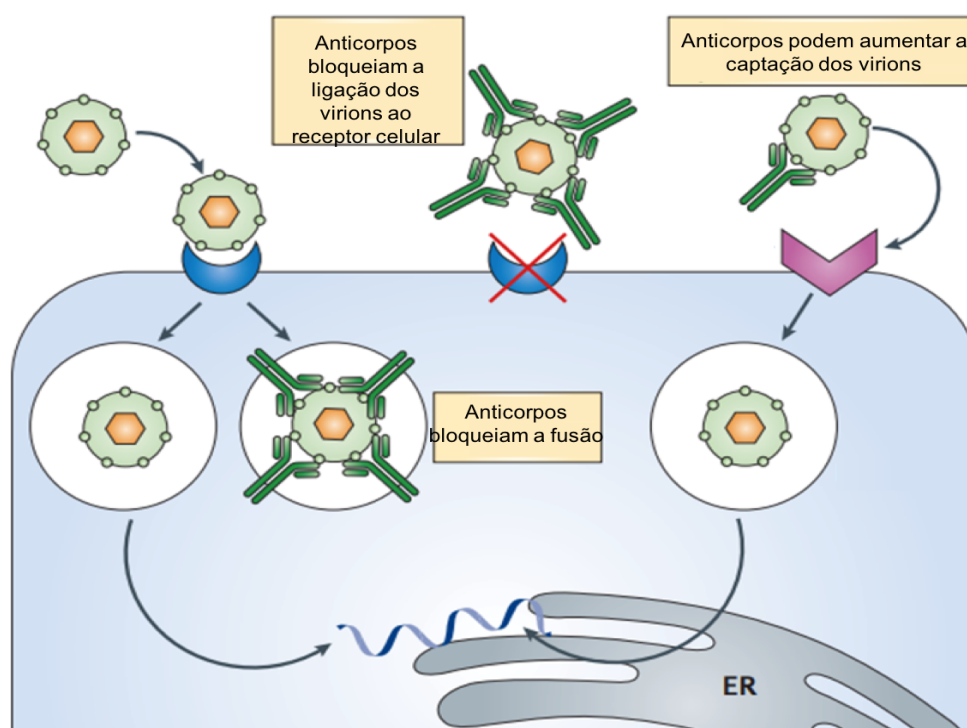
Na resposta imune humoral a proteína E é o alvo principal dos anticorpos, a neutralização ocorre quando há quantidades suficientes de anticorpos capazes de ligar-se a epítomos na proteína E e impedir a ligação do vírus com células alvo. A ligação de anticorpos em no mínimo 25% da superfície viral é suficiente para prevenir a proliferação da infecção. Vários fatores influenciam na neutralização do DENV, como o nível de anticorpos ocupados



com epítomos E, a afinidade do anticorpo, a acessibilidade do epítopo na superfície viral e a interação anticorpo-complemento (Murphy and Whitehead 2011).

A infecção pode ser prevenida pelos anticorpos por vários mecanismos que incluem: bloqueio de ligação, inibição da fusão da membrana do vírus com a membrana do endossomo (o que impede a liberação do RNA viral no citoplasma) e lise de vírus cobertos por anticorpos pelo sistema complemento.

Assim como na resposta celular, o modelo de imunoamplificação dependente de anticorpo (ADE – *antibody-dependent enhancement*) é um mecanismo associado à gravidade da dengue (Halstead et al. 1977; Chareonsirisuthigul et al. 2007). Nesse modelo, os anticorpos heterólogos provenientes de uma infecção prévia por outro sorotipo poderiam exacerbar a infecção pelo Vírus dengue através de células que apresentam receptores Fc $\gamma$  (Figura 10). Esse mecanismo pode aumentar a eficiência da infecção e suprimir a resposta anti-viral mediada por interferon (IFN) do tipo I (Halstead 2012; Ho et al. 2013).



**Figura 10.** Efeito da imunoamplificação dependente de anticorpo na infecção e replicação viral (Rothman 2011).

Foi descrita a indução de anticorpos anti-plaquetas auto-reativas e anti-células endoteliais. Esses anticorpos, junto com IFN- $\gamma$  ativam macrófagos que podem atuar na fagocitose de plaquetas opsonizadas pelos anticorpos e de células endoteliais. Respostas que

poderiam contribuir com o extravasamento vascular endotelial e trombocitopenia nos casos graves de dengue (Ho et al. 2013).

Entre estratégias de regulação associados à imunopatogenia da dengue, alguns mecanismos podem influenciar diretamente nas respostas imunológicas, como o mecanismo de interferência por RNA (RNAi) que pode determinar desde a eficiência da replicação viral até regular a expressão de citocinas como IFN, IL, TNF e TGF. Entender a dinâmica da infecção e o processo patogênico é indispensável para o desenvolvimento de métodos de proteção ou tratamento contra a dengue, os mecanismos de regulação da doença como resposta celular e humoral, além de mecanismos epigenéticos como RNA de interferência (RNAi) no hospedeiro humano e no mosquito, devem ser profundamente identificados. Muitos trabalhos têm investigado a função do RNAi nos mosquitos *Aedes*; no hospedeiro humano, o número total de publicações investigando influência de RNAi durante a dengue no hospedeiro é menor, portanto ainda é uma grande área a ser explorada.

## 1.6 RNAi: microRNAs

Interferência por RNA (RNAi) é um processo epigenético de controle da expressão gênica ao nível pós-transcricional e de alta especificidade, o termo RNAi é usado para descrever de forma ampla, a inibição da expressão gênica pelos pequenos RNAs não codificantes. Epigenética refere-se a mudanças na expressão gênica disparadas por estímulos e causadas por processos independentes de modificações na sequência do DNA, os mecanismos incluem: metilação do DNA e de histonas, remodelagem da cromatina e silenciamento por ncRNA (Gómez-Díaz et al. 2012).. A complementariedade do RNA associado a proteínas como endonucleases e argonautas, resulta na degradação do RNA mensageiro (mRNA) alvo. Esses RNA não codificantes (ncRNAs) são gerados dentro da célula, a partir de longas cadeias de RNA dupla fita (dsRNA) ou a partir de moléculas exógenas (Gavazzo et al. 2013). Os ncRNA não codificantes estão envolvidos em vários tipos de funções, além da regulação gênica por inibição direta do mRNA, exercem funções na defesa contra vírus, defesa contra atividade de transposons, orientação na modelagem da cromatina, metilação de RNA e formação do spliceossomo. Os principais tipos de RNAs regulatórios e mais estudados são: microRNA (miRNA), pequenos RNAs de interferência (siRNA) e RNA de interação com piwi (piRNA), estes últimos envolvidos no controle do desenvolvimento germinativo (Gavazzo et al. 2013).

Os miRNA e siRNA são bioquímica e funcionalmente idênticos, sendo diferenciados apenas por sua molécula precursora, a sequência madura possui em média 22 nucleotídeos (nt).

Os siRNAs são pequenas moléculas dsRNA produzidas a partir de cadeias extensas de dsRNA de origem endógena ou exógena, enquanto os miRNAs são pequenas moléculas de RNA fita simples (ssRNA) produzidos de estruturas intracelulares dupla fita, os *hairpins*, de um RNA precursor ou transcritas de genes contendo palíndromos (Dogini et al. 2014).

Os miRNAs envolvidos na regulação da expressão gênica, possuem uma região entre a base 2 e 8, chamada região *seed* (semente), que é a sequência conservada na molécula e extremamente importante no reconhecimento do alvo, localizado em geral nas regiões 3'UTR de mRNAs, chamados de elementos de reconhecimento de miRNA (*miRNA recognition element* – MRE). Muitas vezes os genes para miRNA podem estar localizadas dentro ou sobrepostas a sequências de mRNA já anotadas, alguns deles possuem seus próprios promotores independente do “gene hospedeiro”.

Os genes que codificam miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II e ocasionalmente pela polimerase III; é produzido primeiramente o miRNA primário (pri-miRNA), uma molécula longa dobrada em um *hairpin* contendo modificações 5' e 3' idênticas as do mRNA (Krol et al. 2010). Ainda no núcleo, pri-miRNAs servem de substrato para duas enzimas da família das RNase III, as endonucleases Drosha e Dicer, o produto da clivagem da Drosha produz uma sequência de ~70 nt e é chamado pré miRNA (pre-miRNA) que é transportado para o citoplasma onde a Dicer processa e gera um duplex miRNA-3p/5p (anteriormente miRNA/miRNA\*) de ~22 nt. Drosha e Dicer clivam respectivamente no ponto de início e término da sequência madura. Uma única fita do miRNA formado se liga ao complexo de silenciamento induzido por miRNA (RISC), esse complexo de proteínas ligado ao miRNA parecia com mRNA complementar levando a sua repressão traducional, deadenilação ou degradação (Bartel 2004; Krol et al. 2010). As proteínas argonautas (AGO) interagem com miRNA e atuam no sentido 3' como efetoras da repressão, essenciais na montagem e função do RISC (Figura 11).

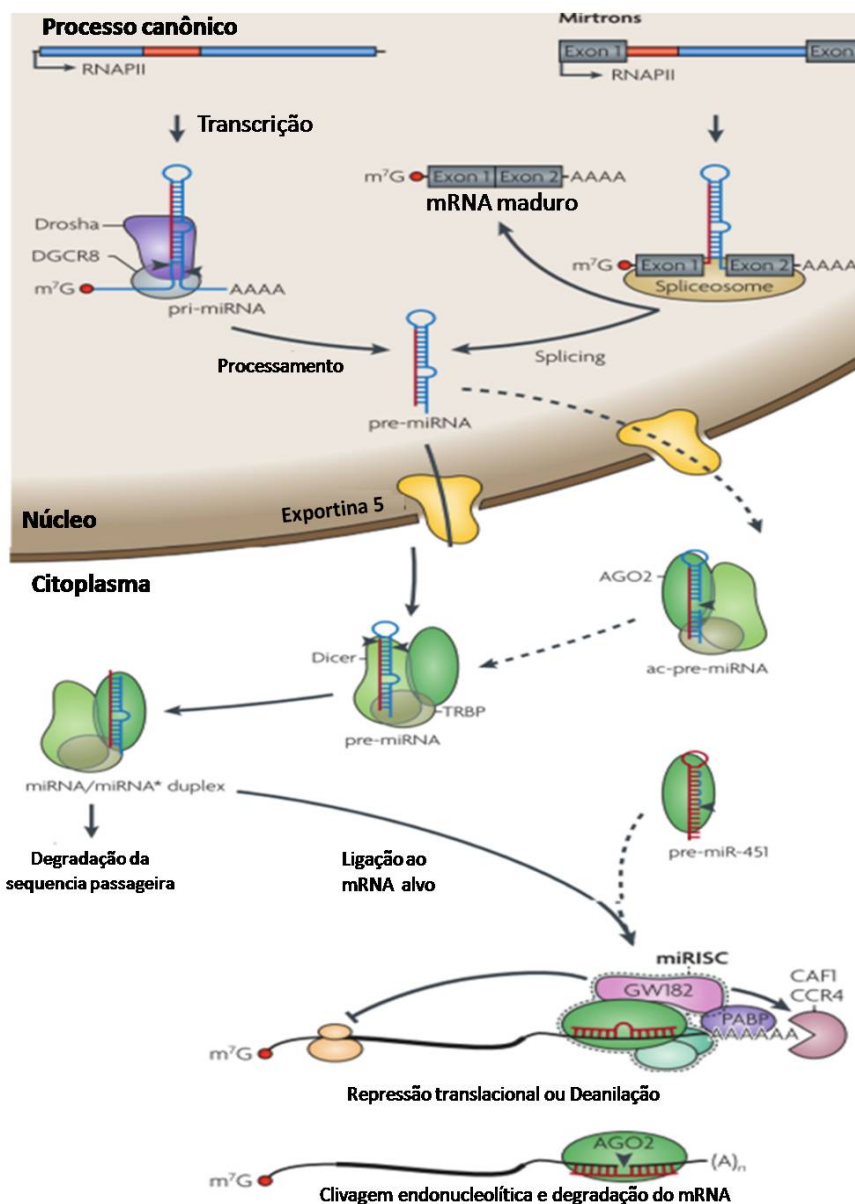
A síntese de miRNAs em mamíferos pode ser dividida em geral de duas formas: canônica (clássica) e não canônica, baseado no processamento dos pri-miRNAs. A via canônica é a descrita no parágrafo anterior, com ação da RNase III e Drosha após ligação com a subunidade regulatória DGCR8 para produzir o *hairpin* pri-miRNA que por sua vez será processado com a atuação de muitos outros fatores auxiliares não citados (Bartel 2004; Graves and Zeng 2012). Vias não canônicas não necessitam de nenhum desses fatores e proteínas, o pre-miRNA pode ser gerado a partir introns produzidos no splicing de pre-mRNAs, esses são chamados de *mirtrons* (Figura 11).

A nomenclatura oficial usada é a desenvolvida pelo miRBase, onde sequências numéricas indicam miRNAs diferentes e um prefixo de três a quatro letras indica a espécie, o termo “miR” indica que trata-se de uma molécula madura, enquanto os precursores são identificados por “mir”, sendo assim, **hsa-miR-101** significa: *Homo sapiens* - miRNA maduro - código numérico de identificação individual (Griffiths-Jones et al. 2006).

### 1.7 Regulação de miRNAs em doenças

Os microRNAs apresentam expressão específica tecidual e temporal, sendo uma das principais funções associadas a regulação temporal do desenvolvimento (Lee et al. 1993). Até o momento, miRNAs foram associados à regulação da expressão de aproximadamente 1/3 dos genes humanos, executando importantes funções em vários processos biológicos como regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação celular e desenvolvimento embrionário (Bartel 2004). A regulação da função dos miRNAs também é finamente controlada por dezenas de enzimas e fatores de processamento; a regulação dos miRNAs ocorre através de RNases que degradam as sequências precursoras (por exemplo a RNase MCPIP1 degrada pre-miRNA antes que possa ser processado pela Dicer), pela degradação do miRNA maduro após sua ação, dissociando a proteína AGO do complexo (Graves and Zeng 2012) e ainda através de regulação por patógenos.

A proteína NS3 do DENV pode interagir com proteínas heat shock e perturbar a formação de RISC, impedindo a ação silenciadora do complexo (Kakumani et al. 2015) e a transcrição da sequência ainda pode ser regulada por estímulo viral, como no caso do Epstein-Barr virus (EBV) que induz a expressão do miR-146a via NF- $\kappa$ B, um miRNA com efeito pró-viral através da supressão de INF (Cameron et al. 2008). A proteína NS4B do DENV foi identificada como uma potente supressora de RNAi, através do teste com mutantes virais e da repressão de proteínas envolvidas na síntese de miRNA celulares, os autores demonstraram a importância dessa proteína viral na capacidade replicativa e na interferência na modulação de vias de RNAi do hospedeiro (Kakumani et al. 2013).



**Figura 11:** Biogênese de microRNA. Drosha processa o pri-miRNA no núcleo para produzir o pre-miRNA, em outra via de síntese, ela ocorre a partir de íntrons, chamados mirtrons, essa via dispensa a ação da Drosha pois a excisão do íntron por splicing já gera o precursor do miRNA. A partir daí as duas vias convergem para o transporte ao citoplasma, clivagem pela Dicer e ligação ao complexo de silenciamento induzido por miRNA – RISC (Krol et al. 2010).

A regulação negativa da expressão de miRNA está frequentemente associada com câncer pela inativação de genes supressores de tumor (Lu et al. 2005; Kunej et al. 2011). De fato, a associação entre desregulação de miRNAs e condições patológicas foi primeiramente descoberta em estudos com câncer, muitos microRNAs foram encontrados regulados negativamente em tecidos tumorais quando comparados a tecidos normais, o que pode ter relação com a perda de diferenciação celular, revisado por LU et al., (2005).

Se tratando de infecções virais, existe uma lista extensa de associações, o miR-146a tem destaque entre os miRNAs regulatórios do sistema imune, sua regulação positiva já foi associada com aumento da taxa de replicação em cultivo de HCV, HBV e os arbovírus DENV e Virus da Encefalite Japonesa (JEV), pelo efeito de reprimir a liberação de mediadores inflamatórios e a resposta imune inata (Wu et al. 2013; Sharma et al. 2015; Bandiera et al. 2016; Ye and Steinle 2016). O miR-146a-5p foi encontrado sub-expresso no soro de indivíduos na fase virêmica da dengue, na contramão da tendência em associar sua expressão a prognósticos ruins. A suspeita levantada no estudo foi que ele poderia estar sendo produzido mas não excretado, dessa forma não ser identificado no perfil circulante. Os miRNAs superexpressos nessa coorte foram miR-21-5p, -590-5p, -188-5p e 152-3p, caracterizados como possíveis biomarcadores para dengue (Ouyang et al. 2016).

Nos perfis hepáticos, o miRNA mais marcante dentro do cenário de associação a doenças é o miR-122, que é específico do fígado e está relacionado à manutenção da homeostase, metabolismo de lipídeos, glicose e ferro. É fortemente associado a patologias hepáticas como infecções, esteato-hepatite não alcoólica, fibrose e câncer, apresenta em geral efeitos tanto na proteção quanto na progressão da doença, dependendo da etiologia e tipo celular envolvido (Brunetto et al. 2014; Tan et al. 2014a; Tsubota et al. 2014; Tan et al. 2014b; Castillo et al. 2015; Thakral and Ghoshal 2015; Dong et al. 2016; Liu et al. 2016).

Alguns miRNAs de origem viral e celular podem ter impacto positivo ou negativo na replicação viral, sequências produzidas por vírus podem regular diretamente a expressão gênica, podendo mimetizar miRNAs celulares e sequestrar redes regulatórias predefinidas (Wang 2009). Moléculas de RNA subgenômico em flavivirus (sfRNA), são ncRNAs resultantes da degradação incompleta do genoma de RNA, variam de tamanho entre espécies de flavivirus e podem possuir em torno de 500 nt. Esses sfRNAs são necessários na patogenicidade dos flavivirus em modelos animais, embora o mecanismo exato pelo qual isso ocorra não seja claro, foi demonstrado que essas moléculas também interferem na resposta por INF alfa e beta em camundongos e podem servir como a principal fonte de miRNA em células de mosquitos (Schnettler et al. 2012; Hussain and Asgari 2014; Pijlman 2014).

As interações patógeno-hospedeiro são relações de alta plasticidade, no momento de uma infecção, o fenótipo do hospedeiro é rapidamente e drasticamente alterado, em alguns casos esse fenótipo parasitado é repassado para gerações seguintes (Poulin and Thomas 2008), além disso a adaptação durante a infecção, ocorre em uma escala de tempo evolucionária muito curta, nesse contexto, as modificações epigenéticas fornecem uma fonte de ferramentas de rápido acesso, reversíveis e adaptáveis para ambos, hospedeiro e patógeno.

Vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e dependem totalmente da maquinaria do hospedeiro para sobrevivência e propagação, por isso são altamente suscetíveis ao programa de regulação gênica da célula hospedeira. Além disso, também são capazes de modular a expressão gênica, que tem como alvo os genes do hospedeiro e seus próprios genes, utilizando ncRNAs é possível regular a reação do sistema imune e ampliar as possibilidades de escape.

O interesse nos miRNAs proporcionou um grande avanço de conhecimento nessa área desde a identificação de associação com doenças em 2002. O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração que produzem resultados de alta profundidade, viabilizou um maior avanço das pesquisas associando miRNAs a diversas doenças e condições animais e vegetais, entre as doenças humanas o maior destaque está nas pesquisas em câncer, mas muita informação vem sendo produzida em estudo com microorganismos, incluindo vírus. A busca por biomarcadores para diagnóstico e oportunidades terapêuticas através da manipulação farmacológica de microRNAs são os principais objetivos das pesquisas.

A maioria dos estudos de miRNA em dengue descrevem e analisam aspectos da relação vírus/mosquito ou miRNAs virais que tem alvos genes humanos. Em relação aos esforços para entender e aplicar a atuação de RNAi virais e no mosquito *Aedes*, podemos dizer que são poucos os trabalhos que tratam da expressão e regulação dos microRNAs no hospedeiro humano e sua relação com a modulação da resposta imune da dengue. Quanto ao fígado, as alterações bioquímicas durante a infecção são amplamente estudadas e descritas na literatura, assim como o perfil de citocinas expressas na dengue (Ahmed et al. 2014; Pagliari et al. 2014; Póvoa et al. 2014; Jain et al. 2014), entretanto, assim como em muitos tecidos, o perfil de expressão de microRNAs no ambiente hepático humano é desconhecido.

Técnicas de RNAi vem sendo amplamente utilizadas em laboratórios para *knock-out* de genes e estudos de genética reversa, além de informações importantes sobre a patogenia da infecção pelo DENV, a identificação de miRNAs pode sugerir potenciais biomarcadores da doença, prover a base para estudos posteriores através da compreensão da patogenia e permitir o desenvolvimento de experimentos focados em terapias farmacológicas utilizando microRNAs como *mimics* e *antimiRs*, vários experimentos usam RNAi para acessar a função de uma proteína/enzima envolvida em alguma via metabólica.

## 1.8 Objetivos

### 1.8.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil de expressão diferencial de microRNAs do tecido hepático humano provenientes de casos fatais de DHF/dengue grave e propor os mecanismos de regulação dessas moléculas nas vias metabólicas relacionadas à patogenia da doença.

### 1.8.2 Objetivos Específicos

- Descrever o perfil de expressão de miRNA do fígado de indivíduos com óbito por DHF pelo método de miRNA-Seq;
- Descrever o perfil de expressão de miRNA do fígado de indivíduos controles sem dengue por miRNA-Seq;
- Verificar a influência da idade na expressão de miRNAs e como fator confundidor na análise comparativa de dengue e controle;
- Caracterizar a expressão diferencial de miRNA nos tecidos de dengue grave e de controles;
- Predizer os genes alvo dos miRNAs descritos associados;
- Relacionar os genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos com vias metabólicas de componente celular, processo biológico e função molecular.



## **2 MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1 Amostras**

As amostras de de tecido hepático de pacientes com DHF (n=10) fixadas em parafina foram selecionadas dos arquivos do Departamento de Patologia do Hospital Guilherme Álvaro, município de Santos, São Paulo, Brasil. As espécies de tecido hepático foram obtidas durante viscerotomia de pacientes que faleceram por DHF durante surto no ano de 2010, todos procedimentos seguiram os padrões do Comitê de Ética Institucional (Pagliari et al. 2016). A idade dos pacientes variou de 19 a 62 anos com média de 39,5 anos distribuídos em 7 mulheres e 3 homens.

O diagnóstico de dengue foi confirmado por correlação entre dados clínicos, diagnóstico sorológico (anticorpos IgM e antígenos NS1 com detecção por ELISA) e exame histológico por coloração hematoxilina-eosina com detecção de antígenos virais através de ensaio imunohistoquímico (Pagliari et al. 2016). Esses indivíduos não apresentavam nenhuma comorbidade.

Os controles (n = 5) incluíram espécies de tecido hepático fixado em parafina que tiveram como causa de óbito infarto agudo do miocárdio, faleceram sem nenhuma infecção ou danos hepáticos, confirmados histologicamente (dados não apresentados). A idade média do grupo foi de 55 anos, com 1 mulher e 4 homens. Todas coletas de amostras teciduais foram realizadas em até 12 horas após o momento da morte.

### **2.2 Extração de miRNA e Sequenciamento**

Os pequenos RNAs, incluindo microRNAs, das amostras foram extraídos de cortes de 5µm dos blocos de tecidos, utilizando o High Pure miRNA Isolation Kit (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT, USA). Foi realizada uma incubação de 16 horas com proteinase K, seguida da extração conforme o protocolo do fabricante. A qualidade e quantidade de RNA extraído foi verificada usando respectivamente o Qubit 2.0 Fluorômetro (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e Small RNA Analysis Kits no Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

As amostras foram encaminhadas ao Centro de Genômica Funcional (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP, Piracicaba, SP) para sequenciamento na plataforma MiSeq Illumina para pequenos RNAs, de acordo com o protocolo do fabricante, resumido a seguir. Durante o preparo da biblioteca TruSeq Small RNA Library Prep (Illumina Inc., San

Diego, CA, USA), na primeira etapa é realizada a ligação dos adaptadores às extremidades 5' e 3' dos fragmentos de RNA, em seguida a transcrição reversa por PCR (RT-PCR), para fragmentos de cDNA formados do RNA inicial mais os adaptadores 5' e 3', essa etapa também enriquece a amostra selecionando as moléculas ligadas a adaptadores em ambas terminações. A biblioteca foi purificada por eletroforese em PAGE 6% e eluída em água ultrapura; as etapas seguintes foram a validação da biblioteca no Agilent 2100 Bioanalyzer (confirmação do tamanho, pureza e concentração da biblioteca) e normalização da concentração para 2nM. As bibliotecas geradas foram então agrupadas no mesmo volume e sequenciadas em duas corridas no Illumina MiSeq System (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

### 2.3 Análises dos Dados de Sequenciamento

Após o sequenciamento, as imagens geradas no instrumento foram analisadas e o primeiro processamento foi realizado no próprio sequenciador, o *basecalling*, efetuado pelo Off-Line Basecaller (OLB v1.8.0, Illumina Inc., San Diego, CA, USA). As leituras resultantes foram submetidas aos seguintes processos: (1) FastQC (Andrews, 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) usado para visualizar os parâmetros das leituras do sequenciamento antes e depois dos tratamentos aplicados; (2) remoção de adaptadores 3' e sequências contendo apenas N executado com o FastXToll Kit ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)); (3) as sequências redundantes foram agrupadas e as leituras menores que 17nt eliminadas no mapper, script em Perl incluso no miRDeep2 (Friedländer et al. 2012), além disso o mapper realizou o alinhamento das leituras contra o genoma humano v.hg19.

Depois desse pré-processamento, foi utilizado o programa miRDeep2, com Bowtie v1.0, para gerar os arquivos de contagens de leituras, identificação de miRNAs anotados e predição de novos com base nos bancos de dados de miRNAs maduros e hairpins do miRBase v21 (disponível em <http://www.mirbase.org/>). O miRBase é o banco de dados de miRNA amplamente utilizado, atualmente na versão 21, armazena dados integrados de sequências, anotação e genes alvo. Além da nomenclatura oficial de miRNAs, neste trabalho, em algumas fugiras pode aparecer essa nomenclatura, adicionada de mais um prefixo e um sufixo, por exemplo **281\_hsa-miR-142-3p\_MIMAT0000434**, que significa: *index interno\_ hsa-miR-142-3p\_ Número de acesso miRBase*.

## 2.4 Análise de miRNAs Diferencialmente Expressos

Para comparar a expressão de miRNA nos grupos Controle e Pacientes DHF, foram utilizados os resultados de contagens gerados pelo miRDeep2, utilizando o pacote EdgeR - Bioconductor (Robinson et al. 2009), o fator de normalização por amostra foi obtido e as contagens foram normalizadas em *counts per million* (CPM), em seguida executada a análise de expressão diferencial (*Differential Expression* – DE), foram aplicados os testes estatísticos Exato de Fisher e GLM (*General Linear Model*), com correção FDR (*False Discovery Rate*) usada para ajustar o valor de p. Os miRNAs com contagem abaixo de 5 em todas amostras foram excluídos nesse processamento. Os miRNA diferencialmente expressos foram determinados de acordo com o critério de *fold change* (FC)  $\geq 2$  associado à determinação de significância pelo valor FDR  $< 0,05$ .

## 2.5 Predição de Alvos dos miRNAs

Os genes alvo em potencial dos miRNAs diferencialmente expressos foram preditos com algoritmos de predição de alvos que usam três abordagens diferentes: (1) TargetScan (disponível em [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) método computacional, critério context++ score  $< -0.2$ ; (2) miRDB (disponível em [www.miRDB.org](http://www.miRDB.org)) que utiliza o método de inteligência artificial com critério de seleção para score  $> 80$ ; e (3) miRTarBase (disponível em [www.miRTarBase.mbc.nctu.edu.tw/](http://www.miRTarBase.mbc.nctu.edu.tw/)), um banco de dados curado da literatura baseado em evidência experimental, com critério de seleção de que o alvo tenha sido identificado por no mínimo dois métodos diferentes.

## 2.6 Análise Funcional

O programa DAVID 6.7 (Disponível em: <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) foi usado para realizar anotação funcional e análise de enriquecimento dos genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos, baseados em três aspectos: componente celular, processo biológico e função molecular. O valor de p com correção de Bejamini foi usado como parâmetro de significância de enriquecimento dos genes alvo candidatos e o score  $> 1,3$  foi adotado como relevante na geração dos grupos na anotação funcional (Huang et al. 2009). A rede de interação de genes alvo e vias de processos foi construída com a plataforma Cytoscape 3.3, disponível gratuitamente em: <http://www.cytoscape.org/>.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Sequenciamento

A quantificação de miRNAs extraídos dos cortes de parafina foi em média 67ng/uL de DHF e 138ng/uL de amostras controle, devido já estar enriquecido apenas com os pequenos RNAs, essa quantidade de miRNA foi suficiente para o preparo da biblioteca, sem necessidade de enriquecimento adicional.

As 15 bibliotecas sequenciadas geraram total de 77.367.198 leituras em três corridas no MiSeq (Illumina), cada biblioteca gerou uma média de 5.157.813 leituras, todas com qualidade média Phred Score Q37. Após o tratamento dos dados brutos com remoção de adaptadores e exclusão das sequências com N, o número médio de leituras por amostra passou para 2.724.497, referente ao conjunto de leituras adequadas para os processamentos seguintes. Essa quantidade corresponde a média de 53,1% dos dados brutos sequenciados; em todas amostras o tamanho das leituras ficou em 22nt, coerente com o tamanho referente à maioria dos microRNAs maduros (Tabela 1).

Previamente a qualquer análise computacional, identificamos na Tabela 1 algumas discrepâncias nos dados clínicos e de rendimento dos sequenciamentos, entre os mais marcantes observamos a idade dos indivíduos envolvidos no estudo e o volume de dados mantidos pós-filtro. Nesses casos, foi identificado um número alto de sequências contendo apenas N, que ocupou uma grande parcela dos dados brutos, gerando uma expressiva perda de dados principalmente nos casos das amostras Controle\_13, Controle\_63, Dhf\_193 e Dhf\_299. Todas amostras foram mantidas nas análises, e o comportamento dessas discrepâncias foram observadas cuidadosamente nas análises posteriores para evitar resultados espúrios.

**Tabela 1.** Dados clínicos e dos resultados dos sequenciamentos por amostra. IAM: infarto agudo do miocárdio; Dhf: dengue hemorrágica

Amostra_ID	Dados Clínicos			Dados Sequenciamento			Qualidade média
	Idade	Sexo	Causa de óbito	Leituras brutas	Leituras filtradas	Leituras utilizáveis (%)	
Controle-63	44	M	IAM, aterosclerose	1.565.618	724.999	46,3	37
Controle-81	48	M	Edema agudo de pulmão, IAM, aterosclerose sistêmica	4.212.073	2.793.822	66,3	37
Controle-94	56	M	IAM, aterosclerose	6.192.749	5.263.821	85,0	37
Controle-13	58	M	Nulo	1.498.026	938.826	62,7	37
Controle-14	73	F	Nulo	5.280.226	3.885.399	73,6	37
Dhf-140	19	F	Derrame pleural, ascite, edema cerebral	5.086.952	3.627.180	71,3	37
Dhf-173	52	M	Derrame pleural, hepatite transinfeciosa	7.644.988	3.787.025	49,5	37
Dhf-198	52	F	Derrame pleural e peritoneal, hepatite transinfeciosa, hematêmese	3.001.348	864.836	28,8	37
Dhf-236	41	F	Derrame pleural, ascite	6.079.568	2.349.387	38,6	37
Dhf-253	25	F	Hemorragia esplênica, hepatite aguda	5.464.911	2.514.411	46,0	37
Dhf-255	62	M	Esplenomegalia	7.225.149	3.923.213	54,3	37
Dhf-277	28	F	Hepatite aguda, ascite volumosa,	5.268.565	3.475.088	66,0	37
Dhf-299	43	F	Hepatite aguda, edema cerebral	6.633.706	717.805	10,8	37
Dhf-347	47	F	Congestão esplênica, com focos de hemorragia, esteatose hepática	8.315.347	4.154.626	50,0	37
Dhf-884	26	M	Derrame pleural, edema, congestão cerebral, petéquias, equimose cutânea	3.897.972	1.847.021	47,4	37

### 3.2 Identificação de miRNAs expressos

Os dados processados foram mapeados de acordo com o banco de dados miRBase v21 humano (contendo 2588 miRNAs maduros e 1881 precursores *hairpin*). Utilizando o mapper.pl, realizamos o mapeamento com o genoma humano hg19\_UCSC e a seleção de miRNAs de tamanho entre 18 a 26nt, as amostras tiveram em média 0,88% de miRNAs mapeados dentro dos dados filtrados gerados. Utilizando miRDeep2, foi identificado o total de 1129 miRNAs maduros descritos no banco de dados e mais 52 alinhados com banco de *hairpin*, entretanto todos tiveram menos que 100 leituras mapeadas, portanto neste trabalho não será realizada essa abordagem. Os 30 miRNAs mais expressos em cada grupo são detalhados na Tabela 2, os valores de expressão estão normalizados por CPM (*counts per million*) e apresentam a média aritmética da expressão nos dois grupos. Observamos que o miR-122-5p, específico do tecido hepático, tem a expressão extremamente elevada nas amostras sem dengue e não aparece na lista dos mais expressos (top) 30 de DHF, enquanto o mais expresso no grupo DHF, o miR-143-3p ainda aparece na lista de Controle na quinta posição, com valores de CPM aparentemente muito semelhantes (CPM = 93.950,57 e 96.662,51, respectivamente). Entre outras diferenças que merecem ser ressaltadas, estão os miRNAs miR-10b-5p e 146a-5p aparecendo entre os top expressos nos Controles e os miR-126-5p e 133a-5p entre os top expressos em DHF. Entre os outros listados, podemos identificar grande semelhança em quase todas posições, como miR-192-5p, 22-3p, 10a-5p, 30a-5p, entre os 7 mais expressos em ambos grupos. Entre os mais expressos podemos observar o grande número de miRNAs 5p (anteriormente identificados com \*), a sequência complementar à sequência guia 3p, que é a canônica em regulação da expressão, hoje sabe-se que as sequências 5p também podem ser funcionais e cada vez mais os trabalhos tem identificado e analisado seus efeitos celulares.

Não foi realizado nenhum outro filtro prévio para exclusão de leituras, com alinhamento contra bancos de dados de outras espécies de RNA (Rfam e piRNABank, por exemplo) ou contra o genoma humano, o objetivo foi manter o máximo de sequências disponíveis para identificação com os miRNAs maduros já descritos, já que neste estudo não foi realizada a identificação de novos, essa análise será abordada em projetos posteriores.

**Tabela 2.** Lista dos 30 microRNAs mais expressos nos grupos de amostras de tecido hepático de controles e dengue hemorrágica (DHF) com respectivos valores de média de expressão por grupo, normalizados em *counts per million* (CPM).

<b>Ranking</b>	<b>miRNA</b>	<b>Controle (média CPM)</b>	<b>miRNA</b>	<b>DHF (média CPM)</b>
1	hsa-miR-122-5p*	225797,54	hsa-miR-143-3p	93950,57
2	hsa-miR-192-5p	142361,14	hsa-miR-192-5p	60231,03
3	hsa-miR-10b-5p*	134833,23	hsa-miR-27b-3p	42784,48
4	hsa-miR-22-3p	99530,51	hsa-miR-22-3p	42661,72
5	hsa-miR-143-3p	96662,53	hsa-miR-21-5p	37702,97
6	hsa-miR-10a-5p	87218,63	hsa-miR-10a-5p	26870,72
7	hsa-miR-30a-5p	65286,96	hsa-miR-30a-5p	23868,67
8	hsa-miR-26a-5p	46657,54	hsa-miR-126-5p*	22629,93
9	hsa-miR-27b-3p	39069,49	hsa-miR-26a-5p	22190,67
10	hsa-miR-148a-3p	32382,40	hsa-miR-451a	18251,66
11	hsa-miR-486-5p	29730,49	hsa-miR-486-5p	16815,22
12	hsa-miR-146b-5p	26265,61	hsa-let-7f-5p	12382,60
13	hsa-miR-21-5p	17553,78	hsa-miR-181a-5p	11090,36
14	hsa-miR-30e-5p	16693,45	hsa-let-7i-5p	10764,92
15	hsa-miR-451a	13438,83	hsa-miR-148a-3p	10506,86
16	hsa-let-7f-5p	13017,50	hsa-miR-30e-5p	9277,09
17	hsa-miR-30d-5p	12961,10	hsa-miR-16-5p	8057,48
18	hsa-miR-378a-3p	9132,45	hsa-miR-146b-5p	7199,33
19	hsa-miR-92a-3p	8745,08	hsa-miR-101-3p	6530,05
20	hsa-miR-146a-5p*	8548,37	hsa-miR-133a-3p*	6351,99
21	hsa-let-7i-5p	8317,40	hsa-miR-30d-5p	6051,11
22	hsa-let-7a-5p	7247,17	hsa-miR-186-5p	5738,95
23	hsa-miR-92a-3p	7076,30	hsa-miR-26b-5p	5689,11
24	hsa-miR-26b-5p	6166,08	hsa-miR-92a-3p	5455,07
25	hsa-miR-181a-5p	5357,57	hsa-let-7a-5p	5146,89
26	hsa-let-7g-5p	4898,23	hsa-miR-92a-3p	4914,85
27	hsa-miR-186-5p	4652,75	hsa-miR-126-3p	4757,55
28	hsa-miR-16-5p	4275,93	hsa-let-7g-5p	4154,16
29	hsa-miR-100-5p	3979,56	hsa-miR-142-5p	3984,70
30	hsa-miR-99a-5p	3712,07	hsa-miR-141-3p	3859,45

\* miRNAs que estão diferencialmente expressos (análise detalhada a seguir).

### 3.3 Análise de Expressão Diferencial: DHF e Controles

A partir dos resultados de contagem de leituras gerados pelo miRDeep2, foi realizada a análise de expressão diferencial com pacote edgeR, para identificar se as diferenças na expressão de miRNAs entre os dois grupos seriam estatisticamente significantes, nessa etapa, foram excluídos miRNAs identificados que tiveram alinhamento de menos que 5 leituras.

As primeiras análises foram executadas entre todas amostras juntas com dez DHF e cinco controles, essa combinação de amostras já indicava um problema de subestruturamento devido a grande diferença de idades no grupo DHF (de 19 a 62 anos) em contraste com a maior homogeneidade das idades no grupo controle (44 a 73 anos). Apesar de o teste GLM ter gerado

diferenças significantes nos níveis de expressão, o problema de subestruturamento foi confirmado na análise de MDS (*Multidimensional scaling*) bidimensional (Figura Suplementar 1), que não foi capaz de agrupar as amostras de nenhuma forma, seja pela idade ou pela condição de óbito.

A mesma análise foi repetida, excluindo apenas os quatro indivíduos com idade menor que 30 anos (Dhf\_140, 253, 277, 884), o gráfico da análise MDS demonstrou um agrupamento satisfatório, dividindo as amostras pela condição de óbito, controles e dengue hemorrágica. Entretanto, uma das amostras de DHF, Dhf\_299 destaca-se dos dois grupos formados (Figura Suplementar 2), foi identificada nessa amostra uma importante característica que tornou seus resultados dignos de dúvida, o fato do rendimento bruto do sequenciamento ter sido igual a 6.633.703 leituras e após o filtro, apenas 10% dos dados se mostraram úteis, com 89,2% de sequencias formadas apenas por N, essa amostra teve 717.805 leituras analisadas nesse teste, foi o pior sequenciamento entre todas 15 amostras e dessa forma, a opção foi remover a amostra Dhf\_299 devido aparente falha técnica.

Trabalhando com dez amostras de fígado, sendo cinco replicatas de controles e cinco DHF, foi possível identificar um grupo de 38 miRNAs expressos diferencialmente, considerando o valor de p (Tabela 3). Ao aplicar o ajuste do valor de p, os resultados de FDR se mantêm significantes em oito microRNAs: miR-133a-3p, miR-122-5p, miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-126-5p, miR-148a-5p, miR-146a-5p e miR-423-5p.

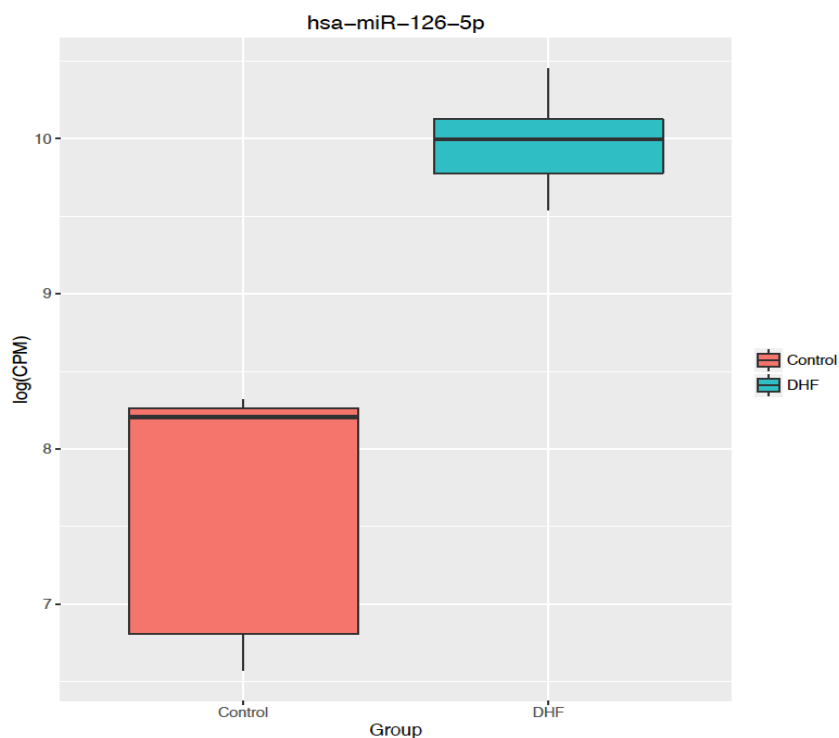
Entre esses oito miRNAs, dois estão regulados positivamente no fígado de DHF: o primeiro, hsa-miR-133a-3p apresentou  $\log_{2}FC = 6,77$  e  $FDR < 0,00000001$ , valores totais de CPM estão mais de 100 vezes aumentados no tecido hepático de dengue. Apesar desse aumento, a significância encontrada é certamente devido a uma única amostra, a Dhf\_255, que teve expressão de 31.503,26, enquanto a segunda amostra com maior expressão desse grupo teve CPM de 96,63. Independente disso, esse é um miRNA que merece atenção devido sua relação já descrita com doenças infecciosas incluindo dengue e diversos cânceres.

O segundo superexpresso em tecido com DHF, o hsa-miR-126-5p, apresenta CPM mais homogêneo no grupo DHF ( $\log_{2}FC = 3,09$ ;  $FDR = 0,00675$ ) e está aumentado quase nove vezes no fígado de dengue comparado com controle (Figura 12). Embora tenha um valor de p mais alto, a consistência dos dados observados dentro de cada grupo é maior que a do miR-133a-3p.



**Tabela 3.** Resumo dos resultados obtidos da análise de expressão diferencial, apresentados os 38 microRNAs com valor de  $p < 0,05$  cujas expressões em CPM foram maiores que 5. Os microRNAs com diferença significativa são os com  $FDR < 0,05$  e  $\logFC > 2$ .

miRNA ID	logFC	logCPM	Teste GLM		Controles (Expressão CPM)					Dengue Hemorrágica (Expressão CPM)				
			PValue	FDR	Controle 63	Controle 81	Controle 94	Controle 13	Controle 14	Dhf_173	Dhf_198	Dhf_236	Dhf_255	Dhf_347
<b>hsa-miR-133a-3p</b>	<b>6,7767</b>	<b>11,6553</b>	<b>0,00000000</b>	<b>0,00000000</b>	<b>43,72</b>	<b>118,21</b>	<b>54,42</b>	<b>55,28</b>	<b>18,91</b>	<b>16,51</b>	<b>48,33</b>	<b>96,63</b>	<b>31503,26</b>	<b>95,24</b>
<b>hsa-miR-122-5p</b>	<b>-6,5937</b>	<b>16,7992</b>	<b>0,00000000</b>	<b>0,00000000</b>	<b>105405,02</b>	<b>10267,63</b>	<b>15628,35</b>	<b>726378,27</b>	<b>271308,42</b>	<b>4568,23</b>	<b>10,36</b>	<b>1269,06</b>	<b>2150,65</b>	<b>3685,83</b>
<b>hsa-miR-10b-5p</b>	<b>-6,1663</b>	<b>16,0610</b>	<b>0,00000000</b>	<b>0,00000001</b>	<b>650029,31</b>	<b>5401,20</b>	<b>2727,72</b>	<b>10745,30</b>	<b>5262,59</b>	<b>1934,44</b>	<b>2651,49</b>	<b>1518,15</b>	<b>1792,91</b>	<b>1489,84</b>
<b>hsa-miR-204-5p</b>	<b>-5,6317</b>	<b>10,4449</b>	<b>0,00000000</b>	<b>0,00000013</b>	<b>12761,74</b>	<b>208,28</b>	<b>161,09</b>	<b>160,83</b>	<b>272,59</b>	<b>61,53</b>	<b>31,07</b>	<b>49,39</b>	<b>70,70</b>	<b>58,51</b>
<b>hsa-miR-126-5p</b>	<b>3,0933</b>	<b>13,6270</b>	<b>0,00007561</b>	<b>0,00675425</b>	<b>4103,75</b>	<b>903,48</b>	<b>3657,28</b>	<b>713,67</b>	<b>3874,07</b>	<b>24969,17</b>	<b>13896,14</b>	<b>34649,08</b>	<b>17659,07</b>	<b>21976,20</b>
<b>hsa-miR-148a-5p</b>	<b>-3,1354</b>	<b>9,3225</b>	<b>0,00008324</b>	<b>0,00721739</b>	<b>201,48</b>	<b>1548,03</b>	<b>766,29</b>	<b>1140,87</b>	<b>2082,79</b>	<b>184,59</b>	<b>96,67</b>	<b>64,42</b>	<b>192,30</b>	<b>112,93</b>
<b>hsa-miR-146a-5p</b>	<b>-2,6476</b>	<b>12,2746</b>	<b>0,00057794</b>	<b>0,03872188</b>	<b>5139,67</b>	<b>1415,74</b>	<b>803,30</b>	<b>14655,42</b>	<b>20727,72</b>	<b>1260,61</b>	<b>2064,57</b>	<b>1007,09</b>	<b>1529,92</b>	<b>959,21</b>
<b>hsa-miR-423-5p</b>	<b>-2,7806</b>	<b>7,2592</b>	<b>0,00070059</b>	<b>0,04589619</b>	<b>114,05</b>	<b>315,23</b>	<b>450,63</b>	<b>306,58</b>	<b>169,12</b>	<b>46,52</b>	<b>37,98</b>	<b>10,74</b>	<b>55,14</b>	<b>44,90</b>
hsa-miR-223-3p	2,5945	7,4584	0,00134798	0,07497797	38,02	19,70	84,90	25,13	70,09	415,70	307,27	446,64	134,33	156,47
hsa-miR-142-3p	2,3451	9,8276	0,00226425	0,10942615	167,27	481,30	182,86	291,50	369,38	1437,70	3162,45	1479,50	695,67	813,63
hsa-miR-338-3p	2,3752	8,1973	0,00257502	0,12243787	205,28	64,74	41,36	80,41	70,09	267,13	324,53	1056,48	257,34	500,70
hsa-miR-193b-3p	-2,3916	6,9823	0,00332657	0,14002844	55,12	543,22	315,66	50,26	90,12	49,52	24,17	19,33	56,56	48,98
hsa-miR-378a-5p	-2,5167	5,9155	0,00337246	0,14002844	53,22	92,88	84,90	45,23	186,92	16,51	13,81	6,44	19,80	23,13
hsa-miR-144-5p	2,1186	9,4112	0,00554004	0,21489512	606,34	53,48	422,33	100,52	87,90	313,65	2606,61	1294,83	709,81	613,62
hsa-miR-15a-5p	2,0464	9,4565	0,00716388	0,26733075	389,66	70,36	468,05	75,39	338,23	1134,55	417,75	1533,18	957,26	1519,78
hsa-miR-320a	-1,9509	8,9860	0,01069315	0,37222214	243,30	1967,40	1179,91	532,74	130,17	348,17	283,10	94,48	131,50	190,48
hsa-miR-7641	2,0813	6,4534	0,01161616	0,37222214	100,74	8,44	6,53	15,08	21,14	219,11	138,10	88,04	69,28	142,86
hsa-miR-146b-5p	-1,8673	14,0306	0,01222926	0,38100765	12121,18	5533,49	3574,56	34839,30	75259,55	5240,55	12781,00	6081,20	5756,27	6137,61
hsa-miR-500a-3p	-2,0466	6,3821	0,01309387	0,39084339	239,50	84,44	95,79	80,41	136,85	16,51	34,52	32,21	38,18	32,65
hsa-miR-218-5p	1,9802	6,3473	0,01670700	0,42828028	66,53	28,15	17,42	30,16	18,91	25,51	248,58	212,58	63,63	92,52
hsa-miR-199b-5p	1,8547	7,9577	0,01706409	0,43366336	125,45	140,73	71,84	145,75	50,07	132,06	583,47	418,73	329,46	462,60
hsa-miR-218-5p	1,9670	6,3365	0,01744434	0,43581286	66,53	28,15	17,42	30,16	18,91	24,01	248,58	208,29	63,63	92,52
hsa-miR-374b-5p	-1,8475	7,6385	0,01788233	0,43930932	395,36	36,59	100,14	165,85	778,82	133,57	55,24	49,39	73,53	97,96
hsa-miR-30c-2-3p	-1,9744	5,9885	0,01870760	0,45578510	159,66	112,58	39,19	135,70	63,42	19,51	55,24	12,88	26,87	16,33
hsa-miR-10a-5p	-1,6986	15,7999	0,02199444	0,50655939	192902,94	40437,23	44867,03	75056,27	82829,67	35304,70	32722,39	32871,11	13728,24	19727,15
hsa-miR-148a-3p	-1,6238	14,3892	0,02815700	0,58108723	8283,53	10912,17	42391,83	16268,73	84055,76	14728,18	2585,89	4713,36	19419,47	11087,42
hsa-miR-409-3p	-1,7391	6,6107	0,03149254	0,62308739	15,21	298,35	176,33	155,80	114,60	21,01	65,60	32,21	60,80	47,62
hsa-miR-335-5p	-1,7118	6,8524	0,03215285	0,63191072	106,44	14,07	84,90	145,75	470,63	61,53	41,43	42,95	35,35	69,39
hsa-miR-378a-3p	-1,5799	12,5734	0,03278822	0,64001420	3371,96	16625,79	11557,45	7106,57	7000,47	2582,76	897,64	1090,84	7994,59	2704,85
hsa-miR-144-3p	1,5483	10,8107	0,03749770	0,70409695	3138,16	106,95	659,62	417,15	248,11	697,84	6128,11	2890,29	1716,56	1948,36
hsa-miR-374a-5p	-1,5795	8,2924	0,03871920	0,70897023	406,76	39,40	71,84	392,02	1369,61	186,09	179,53	130,99	125,84	141,50
hsa-miR-141-3p	1,5114	11,3514	0,04163799	0,74141550	4662,58	244,87	400,56	1065,48	392,75	397,69	3804,61	6723,25	2270,84	6100,87
hsa-miR-98-5p	-1,5176	9,6444	0,04225163	0,74141550	1366,65	166,06	574,72	1015,22	2748,12	666,32	345,25	304,92	446,81	287,08
hsa-let-7f-2-3p	-1,7226	5,0514	0,04197370	0,74141550	38,02	25,33	39,19	60,31	65,64	21,01	6,90	8,59	18,38	12,25
hsa-miR-92b-3p	1,5835	7,1985	0,04409139	0,76012525	150,16	53,48	93,61	15,08	30,04	91,54	110,48	171,79	500,55	160,55
hsa-miR-27a-3p	1,4795	9,9809	0,04714703	0,76789743	657,66	185,76	711,86	246,27	840,01	1229,10	1491,46	1893,93	1600,61	1164,66
hsa-miR-30a-5p	-1,4517	15,4442	0,04867298	0,78839536	199781,80	18477,79	20108,53	37050,68	51016,01	15208,41	33426,69	28655,93	22145,60	19906,74

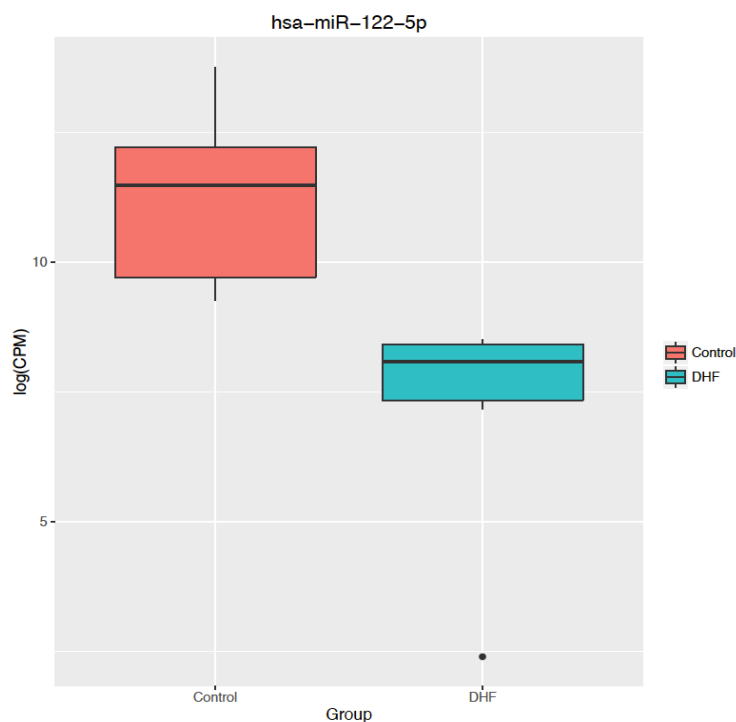


**Figura 12.** Expressão de hsa-miR-126-5p nos tecidos hepáticos dos grupos de dengue hemorrágica (Dhf) e controle. Mostrando evidente regulação positiva no grupo de Dhf (logFC = 3,09; FDR = 0,00675).

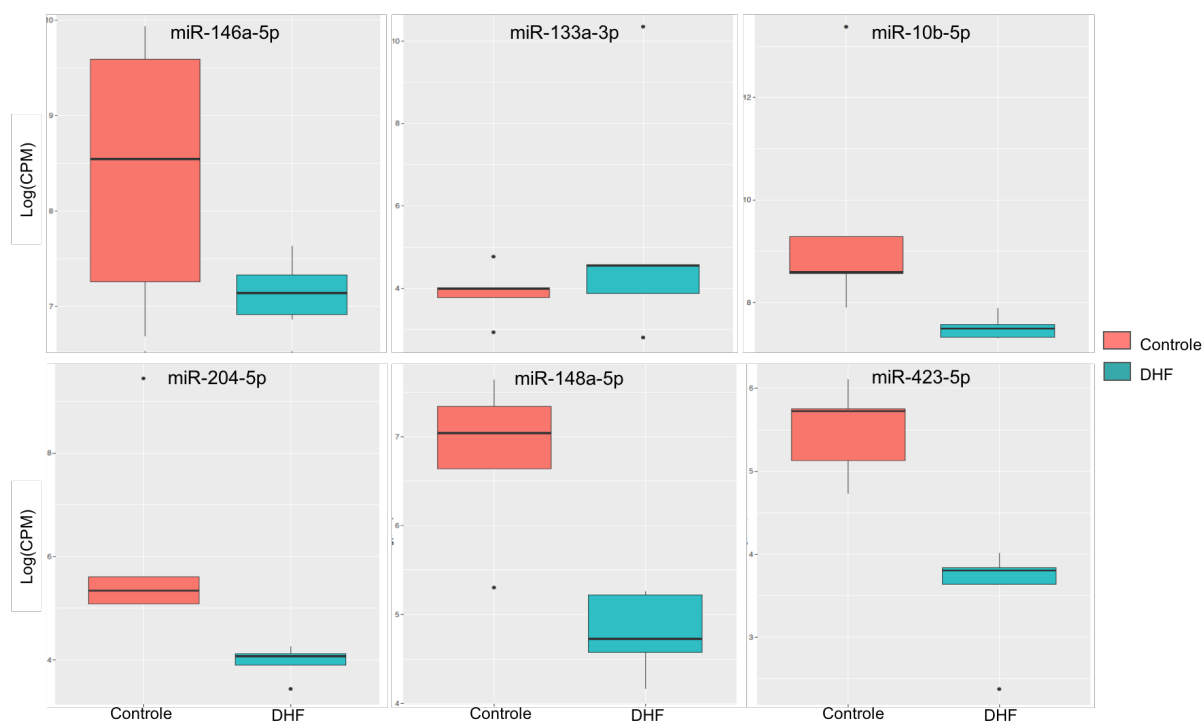
A maioria dos miRNAs detectados estão sub-expressos na dengue em relação ao controle, entre eles está o hsa-miR-122-5p que também é a molécula com maior nível de expressão em todo grupo controle (logFC = -6,59; FDR < 0,00000001), com média de CPM de 225.797,2 no grupo controle e 2.336,4 no grupo DHF, ou seja, mais de 100 vezes menos expresso no grupo de dengue (Figura 13).

O miR-10b-5p é o segundo com maior nível de expressão entre o grupo controle, diminuído quase 100 vezes na DHF, seguido do miR-146a-5p, ambos apresentam valores de CPM altos e com logFC = -6,1663 (FDR < 0,00000001) e logFC = -2,6476 (FDR = 0,0387) respectivamente (Figura 14).

Os miRNAs hsa-miR-204-5p, hsa-miR-148a-5p e hsa-miR-423-5p possuem CPMs mais baixos em relação aos outros já descritos, mais ainda assim apresentam valores significantes nos testes estatísticos e logFC que permitem afirmar sua associação não aleatória com a condição estudada, resultados são respectivamente: logFC = -5,6317 e FDR < 0,000001; logFC = -3,1354 e FDR = 0,00722; logFC = -2,7806 e FDR = 0,04589 (Figura 14).



**Figura 13.** Diferença na expressão do hsa-miR-122-5p entre grupos amostrais, evidenciando a diminuição no grupo de tecido hepático com dengue hemorrágica. Valores de expressão em log(CPM), logFC = -6,59; FDR < 0,00000001.

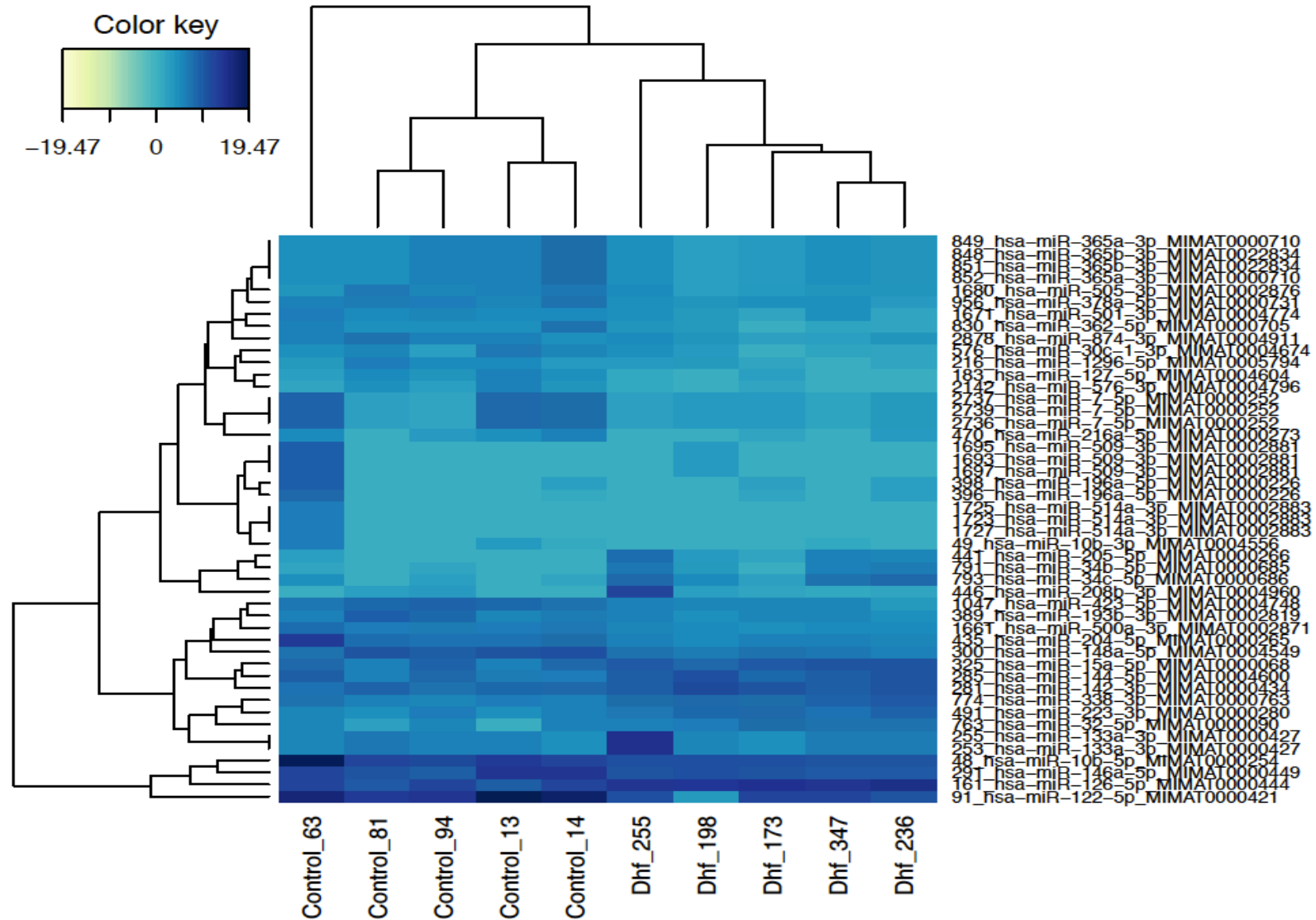


**Figura 14.** Boxplot de seis miRNAs diferencialmente expressos no fígado de dengue hemorrágica (DHF). miR-146a-5p: logFC = -2,6476 e FDR = 0,0387; miR-10b-5p: logFC = -6,1663 e FDR < 0,00000001; miR-204-5p: logFC = -5,6317 e FDR < 0,000001; miR-148a-5p: logFC = -3,1354 e FDR = 0,00722; miR-423-5p: logFC = -2,7806 e FDR = 0,04589.

De forma geral, foram encontrados mais miRNAs sub-expressos no grupo DHF do que superexpressos, de acordo com a análise de Heatmap, realizada com os valores de CPM por amostra/por miRNA, podemos visualizar a formação de dois grupos distintos a partir dos dados de expressão de miRNAs (Figura 15). Onde também pode ser observado a maior expressão dos miRNAs citados anteriormente na região inferior da figura.

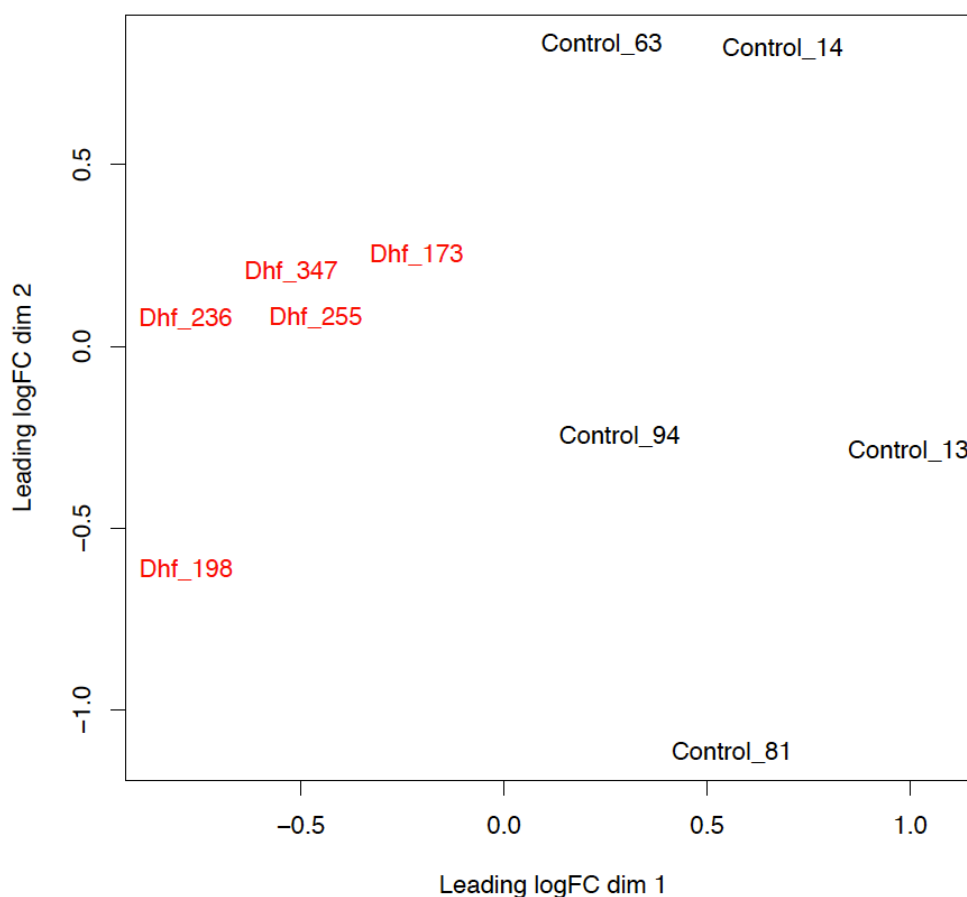
Essa apresentação evidencia outra discrepância na amostra Controle\_63, que se mostra com expressão claramente diferente das outras replicatas, aparecendo como um grupo externo nos clados gerados; para resolver essa questão, foi realizada uma nova análise excluindo essa amostra e todas outras que tiveram baixo rendimento no sequenciamento, e não foi identificada qualquer alteração relevante na lista dos miRNAs significantes ou mesmo nos valores de FC, apenas os valores de p e FDR tiveram um discreto aumento, provavelmente devido diminuição do poder estatístico causado pelo menor número de replicatas, portanto essa amostra foi mantida em todas análises.

Na análise MDS, o gráfico é construído com base no logFC (Figura 16), explicita a dispersão de todas amostras na escala multidimensional (MDS), neste caso, bidimensional, e evidencia a separação das amostras em dois grupos, o de DHF mostra-se bem consistente, com uma proximidade maior entre si do que as amostras controle, que se apresenta mais disperso denotando a heterogeneidade nesse grupo, apesar disso, é muito clara a separação entre as amostras DHF e controle. Após a remoção da amostra Dhf\_299, foi possível observar o aumento na resolução do agrupamento gerado, produzindo essa diferença nas dispersões das amostras no MDS com e sem a amostra Dhf\_299 com problemas técnicos (Figura Sup. 4 e Figura 14).



**Figura 15.** Gráfico Heatmap construído com dados de CPM dos 38 miRNAs diferencialmente expressos com menor valor de FDR no teste Exato de Fisher. (DHF - febre hemorrágica da dengue; *Color Key* – chave de cores).

É interessante observar que duas das amostras de DHF possuem uma maior proximidade entre si na análise de MDS (Figura 16), que são Dhf\_255 e Dhf\_347. Foi possível identificar uma variável comum entre essas amostras, ambas apresentaram acometimento esplênico (esplenomegalia e congestão esplênica), em contraste com as outras amostras que não apresentaram essa condição como causa de óbito.

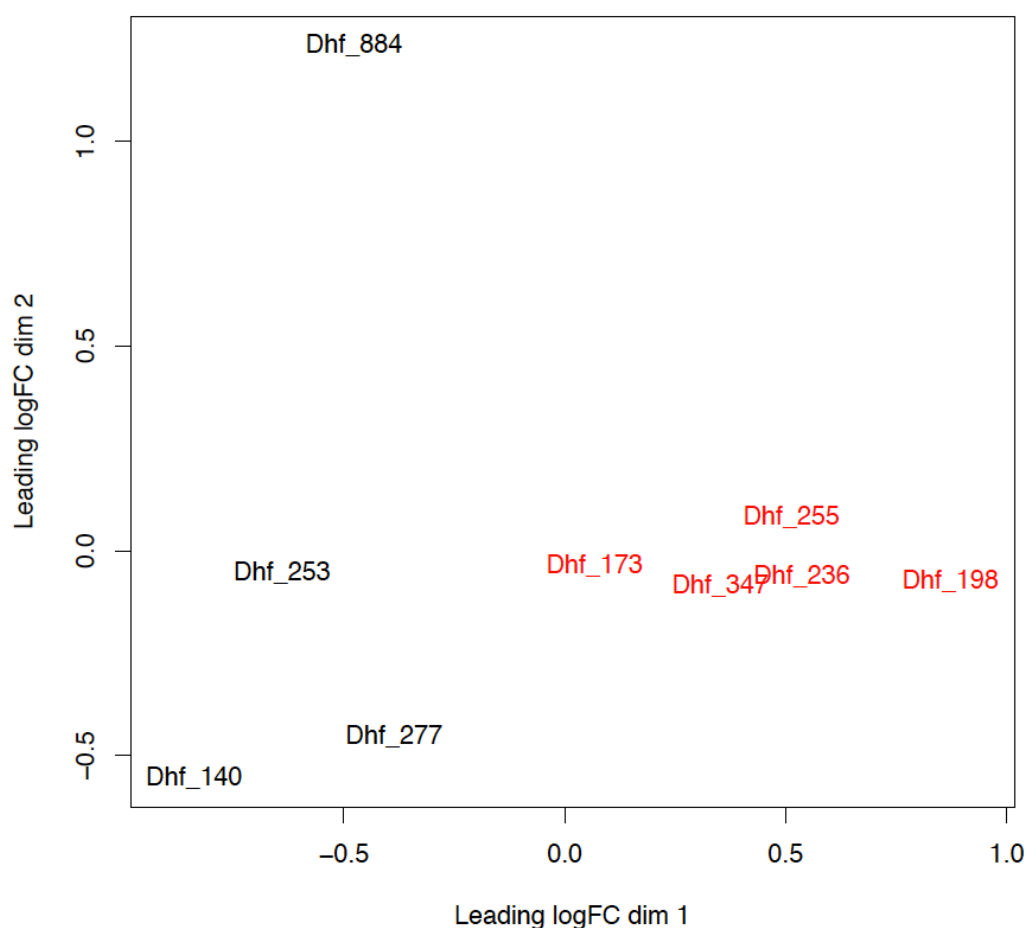


**Figura 16.** Análise MDSPlot, bidimensional com base nos valores de logFC (fold change), destacando o agrupamento das amostras DHF (febre hemorrágica da dengue) separadas das amostras controle (Control).

### 3.4 Análise de Expressão Diferencial: DHF < 30 anos e DHF > 30 anos.

Devido às grandes diferenças nas idades dos indivíduos do grupo de dengue, foram realizadas as análises de expressão diferencial dentro do grupo DHF, a fim de identificar qual a extensão da influência e a relevância da idade na expressão dos miRNAs. Estes grupos foram divididos entre menores que 30 anos, chamados “< 30” e grupos de indivíduos com mais de 30 anos, chamados “>30”, com o teste GLM foram identificados cinco miRNAs com diferença estatisticamente significativa: miR-133a-5p, o único com maior expressão no grupo >30 anos

(logFC = 7,6; FDR < 0,0000001) e outros quatro superexpressos no grupo < 30 anos: miR-122-5p (logFC = -6,982; FDR < 0,0000001), miR-10b-5p (logFC = -6,474; FDR < 0,0000001), miR-204-5p (logFC = -5,896; FDR < 0,0000001) , miR-146a-5p (logFC = -2,578; FDR = 0,0185), todos estes miRNAs também são os diferencialmente expressos no grupo DHF em relação ao controle, mas com uma diferença ainda mais acentuada entre estes grupos de idades diferentes, que pode ser observada na diminuição dos valores FDR (Tabela Suplementar 1). Na análise de MDS, ficou evidente o agrupamento das amostras >30, separadas do grupo de amostras < 30 (Figura 17), entre estas se observa a amostra Dhf\_884 bastante destacada dos dois grupos, as variáveis que podem estar ocasionando essa separação podem ser o sexo masculino e o número e diversidade de sintomas apresentados no atestado de óbito ser maior que das outras.

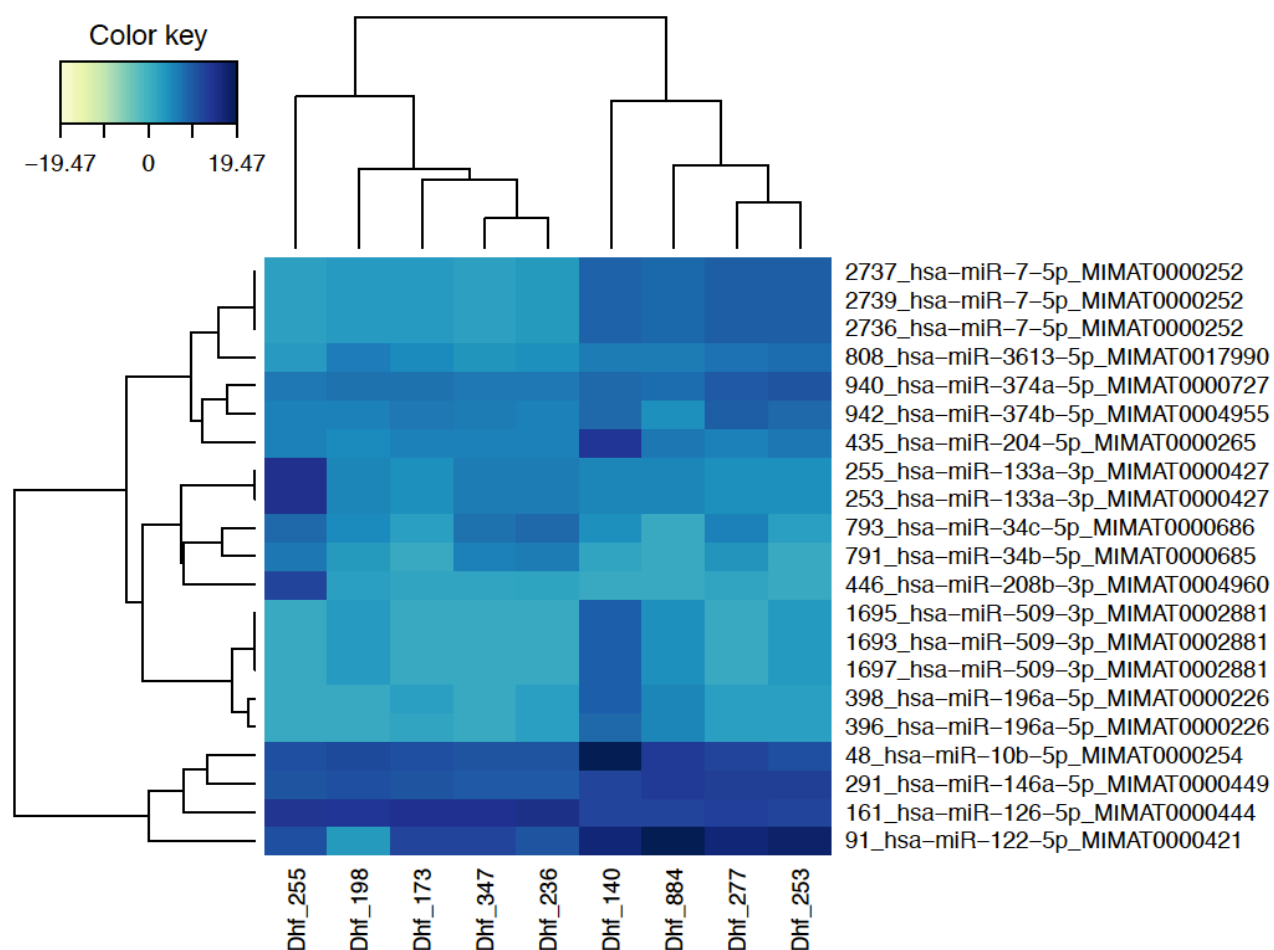


**Figura 17.** Análise de MDS entre os grupos de dengue hemorrágica de indivíduos com menos de 30 anos (preto) e indivíduos com mais de 30 anos (vermelho).

A análise de Heatmap (Figura 18) demonstra os mesmos resultados obtidos por MDS, com divisão clara de dois clados com as amostras de menos de 30 anos: Dhf\_140, Dhf\_253,

Dhf\_277 e Dhf\_884 e no outro clado, as amostras com mais de 30 anos: Dhf\_173, Dhf\_198, Dhf\_255, Dhf\_236 e Dhf\_347.

Os microRNAs que aparecem repetidos na imagem são referentes a isoformas, ou seja, sequencias similares provenientes do mesmo precursor pri-miRNA e com poucas substituições de bases na região *seed*.



**Figura 18.** Análise de Heatmap baseada nos valores de CPM, mostrando os miRNAs diferencialmente expressos nos grupos de dengue hemorrágica (Dhf) com menos de 30 anos (Dhf\_140, Dhf\_253, Dhf\_277 e Dhf\_884) e mais de 30 anos (Dhf\_173, Dhf\_198, Dhf\_255, Dhf\_236 e Dhf\_347).

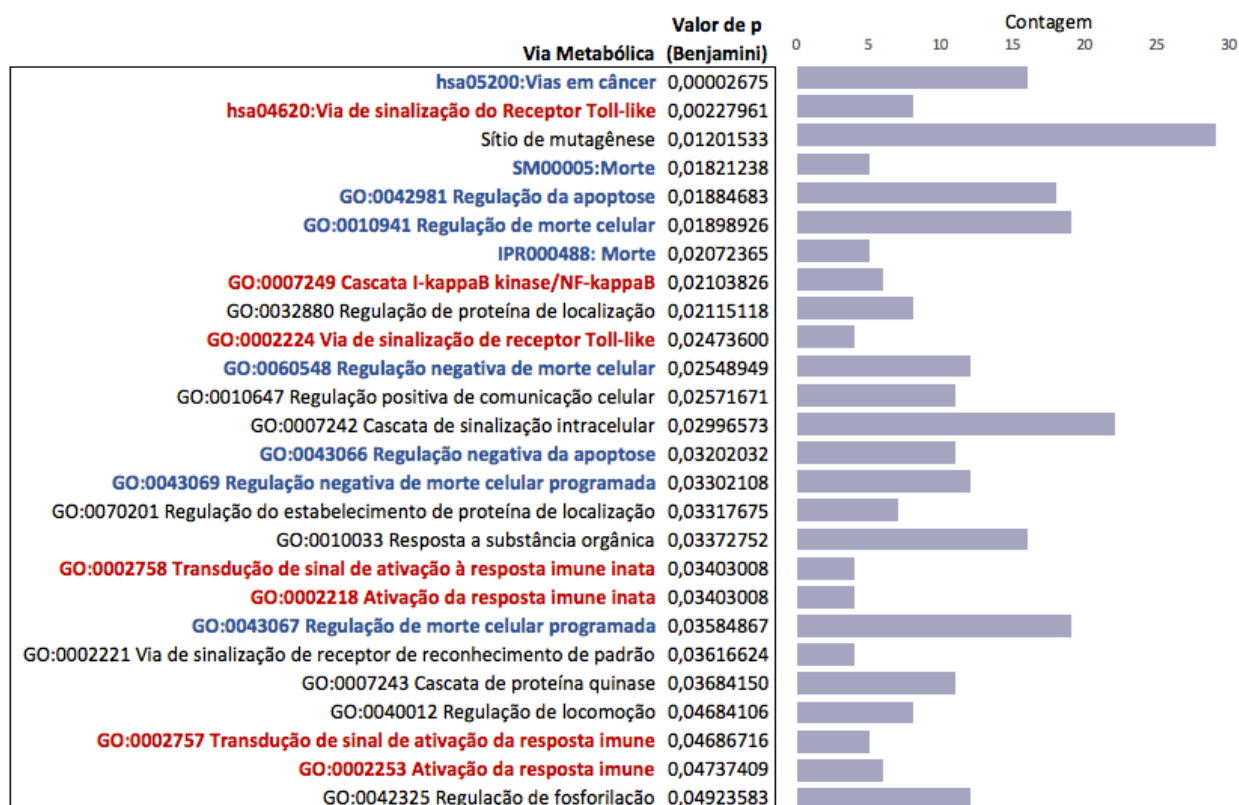
### 3.5 Predição de Genes Alvo e Anotação Funcional

A predição de alvos para cada miRNA diferencialmente expresso foi realizada nas três plataformas TargetScan, miRTarBase e miRDB, cada uma executa abordagem diferente para predição, computacional, experimental e inteligência artificial, respectivamente. O valor limite (*threshold*) para considerar a predição confiável e real, foi o valor de context++ score < -0,2 no



TargetScan e no miRDB, Target Score > 80. A lista de genes alvo identificada variou para cada miRNA e entre os três bancos de dados.

Em seguida, uma lista única foi gerada a partir das três listas de genes alvo obtidas nos bancos de dados acima, apenas com os genes alvo dos miRNA superexpressos no fígado DHF, o total de 224 genes alvo foram submetidos à anotação funcional no programa DAVID 6.7 via web (Huang et al. 2009), onde foram identificadas na análise de enriquecimento, 27 vias com valor de p significantes < 0,05 mesmo após ajuste de Benjamini, as vias foram obtidas de vários bancos de dados como GO (*Gene Ontology*), KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e Interpro. Estão descritas vias relacionadas a processos biológicos, função molecular e componentes celulares, entre elas, destacam-se oito vias de regulação da apoptose e ciclo celular; oito relacionadas à resposta imune incluindo vias ativadas por NF- $\kappa$ B, as outras dez vias são relacionadas principalmente a sinalização e transdução de sinal celular (Figura 19). Foram gerados grupos de anotação com escores de enriquecimento > 1,3 e entre os gerados, dez grupos foram selecionados por conter vias com valor de p < 0,05, a Tabela Suplementar 2 contém os resultados detalhados dessa análise; o grupo de anotação 1 contém as sete vias com p < 0,05 e apresentou o maior escore de enriquecimento = 2,898. O segundo maior escore = 2,455 foi de vias de sinalização NF- $\kappa$ B e o terceiro grupo, com escore = 2,349 contém três vias de morte.



**Figura 19.** Anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos, regulados positivamente no tecido hepático do grupo de dengue hemorrágica, lista de vias mais os resultados estatísticos. Azul: vias de morte celular; vermelho: vias de resposta imune.

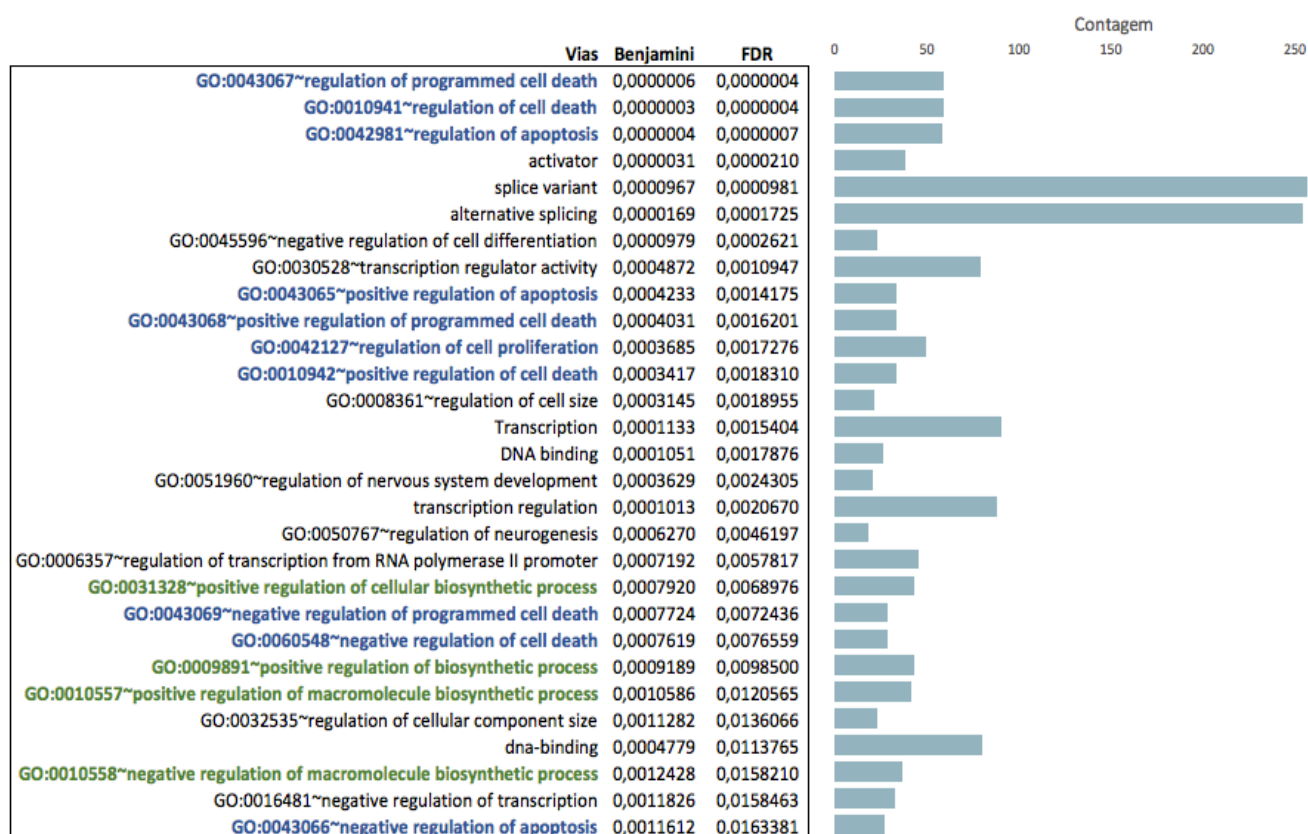
A partir dos dados de vias identificadas pelo DAVID, geradas apenas com base no banco de dados KEGG, é possível visualizar uma grande rede de interação entre genes e vias construída no programa Cytoscape, o que podemos perceber é que essas vias podem estar sendo reguladas pelas miRNAs superexpressos durante o quadro de dengue hemorrágica, no entanto a regulação pode ser negativa, pela atuação direta sobre os genes como alvo relacionados ou ainda podem estar sendo reguladas positivamente no caso em que o alvo do miRNA seja um inibidor da via, dessa forma, ao impedir a expressão de inibidores, ativar a função final da via (Figura 20).



**Figura 20.** Rede de interações entre genes alvo dos miRNAs superexpressos no dengue hemorrágico com vias metabólicas obtidas na análise funcional do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Termos das vias em azul e símbolo oficial do gene em verde.

Aparece de forma clara a relação dos genes com cada via e fica explícita a importância de vias apoptóticas e regulação da proliferação celular dentro de todo contexto de interação, Notch, MAPK, p53, Wnt e contendo ligações com um grande número de genes de controle celular como quinases dependentes de ciclinas CDKN1A e ligantes de morte FAS. As vias relacionadas à resposta imune contêm principalmente citocinas, sinalizadores, fatores de transcrição como NF-κB e muitos genes da família de quimiocinas CC e CX.

A análise funcional dos genes alvo dos miRNAs sub-expressos no grupo DHF foi realizada com 570 genes alvo de todos seis miRNAs obtidos nos três bancos de dados utilizados aqui e resultou em 208 vias das mais várias funções com um predomínio de vias de morte celular, para fins de organização dos dados, foram selecionadas as 30 vias com menores valores de p. A via de fosfoproteína apresentou a maior taxa de enriquecimento em ambas análises de miRNA super e sub-expressos e foi excluída para eliminar o ruído sobre a análise das outras vias (Figura 21), entre as 30 selecionadas, dez são relacionadas ao controle de morte celular, novamente essa função é representada significativamente, com valores de FDR < 0,05 (tabela Suplementar 3). As outras vias são relacionadas funções celulares variadas e quatro a vias biossintéticas, esperado por se tratar de amostra hepática com funções biológicas dentro do metabolismo.



**Figura 21.** Anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos, regulados negativamente no tecido hepático do grupo de dengue hemorrágica, lista de vias mais os resultados estatísticos das 30 primeiras vias com menor valor de p ajustado pelo método Benjamini-Hochberg (FDR). Azul: vias de morte celular; verde: vias biossintéticas.

## 4 DISCUSSÃO

A patogenia da dengue envolve o desencadeamento de respostas à replicação viral e resposta imune do hospedeiro, somado a fatores genéticos e complexas redes de regulação. Na dengue hemorrágica, o aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático, choque hipovolêmico e hemorragias podem frequentemente levar à morte. O grupo amostral DHF apresentou heterogeneidade a respeito da causa de óbito e os sintomas apresentados, essas diferenças foram testadas quanto ao nível de influência na expressão de miRNAs, entretanto em nenhum dos testes de MDS e Heatmap houve agrupamento dentro das amostras DHF quanto aos sintomas ou causa da morte. Talvez alguma diferença apareça com a análise de um grupo amostral maior, todavia o estudo do fígado é limitado pela invasividade do procedimento de biópsia e pelo fato de não ser um exame realizado em indivíduos com dengue, o que limita, portanto, a comparação entre a expressão de genes e miRNAs hepáticos em casos de dengue clássica e hemorrágica. Dessa forma, apesar da pouca quantidade de dados neste estudo sobre a apresentação clínica dos casos de dengue, pode ser afirmado que os grupos amostrais de DHF e controles são consistentes e podem ser comparados, mesmo se tratando de um elemento tão variável e específico como são os microRNAs.

Foi confirmada a forte influência da idade na expressão de miRNAs na coorte de DHF e a pouca influência do sexo, como foi relatado previamente, 35 miRNAs apresentam expressão diferencial entre indivíduos saudáveis de diferentes idades, descrevendo essa variável como um fator confundidor em estudos de associação (Meder et al. 2014), portanto, a estratégia de corte em 30 anos de idade dos pacientes com DHF, tornou a amostragem mais homogênea em relação aos controles. Essa remoção diminuiu os valores de p e FDR do teste estatístico e agrupou as replicatas dentro dos grupos esperados nas análises MDS e Heatmap, a partir dessa exclusão de amostras com menos de 30 anos, foi possível identificar o total de oito miRNAs diferencialmente expressos, sendo dois superexpressos na dengue: miR-126-5p e miR-133a-3p; e seis sub-expressos: miR-122-5p, miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-148a-5p, miR-146a-5p e miR-423-5p.

O miR-126-5p é um miRNA intrônico presente no gene *Egfl7*, essa região codifica os miRNA-126-3p (nomeado miR-126), que é a sequência guia e o 5p, chamado passageiro. Tanto o gene *Egfl7* quanto os miR-126-3p/5p são fatores angiogênicos envolvidos na manutenção da integridade vascular (Nikolic et al. 2010), e relatados em diversos estudos mostrando a associação de miR-126-3p com doenças vasculares e câncer. Em muitos casos os miRNA 5p são degradados e apenas a sequência 3p exerce função regulatória, no caso de miR-126, foi

detectada a função regulatória também da fita 5p e com isso, estudos de sua função e associação a doenças emergiram a partir de 2013. A presença da sequência 5p foi identificada em sete dos oito miRNAs identificados neste estudo, existe muita informação a respeito do miRNA canônico e pouca sobre o passageiro. Embora o miR-126-3p esteja presente entre os mais expressos na dengue, a diferença não foi estatisticamente significativa (CPM Controles: 2141,9; DHF: 4757,5; FDR = 1).

De forma geral o miR-126-5p aparece associado à proteção ou quadros mais brandos nas doenças estudadas, como supressor de tumor em células gigantes através da regulação negativa do hormônio da paratireoide – PTHrP (Zhou et al. 2014), à diminuição de sua expressão associada a quadros graves de lesão pulmonar aguda por LPS em camundongos, devido aumento da expressão de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e aumento na permeabilidade alveolar (Tang et al. 2016) e principalmente como proteção a danos vasculares pela regulação de células endoteliais, como identificado por Schober et al., camundongos *Mir126<sup>-/-</sup>* tinham defeitos de reparo endotelial e aumento da lesão induzida por hiperlipidemia, o mecanismo de ação identificado foi a regulação negativa de *Dkl1* (inibidor da via de sinalização Notch1) pelo miR-126-5p (mas não por miR-126-3p). Dessa forma, ocorreu ativação de Notch1 e aumento da proliferação endotelial, através da regulação de CDKN1A e HES5 (Schober et al. 2014), nesse mesmo estudo foi verificado que o tratamento dos camundongos com *mimics* miR-126-5p levou à diminuição da lesão vascular.

Por outro lado, outros estudos têm identificado um efeito oposto da regulação por miR-126-5p, como o aumento na expressão sendo associado a prognósticos ruins e aumento do potencial de malignidade na leucemia mielóide aguda (LMA) (Shibayama et al. 2015), esse resultado concorda com o que foi encontrado neste estudo, em que o aumento da expressão está associado ao quadro de dengue hemorrágica. Sobre influência na proliferação celular, efeitos opostos foram identificados, sendo negativos em células estromais e positivos na replicação em células endoteliais e inibição da apoptose em melanoma (Felli et al. 2013; Schober et al. 2014; Zhou et al. 2014), essa diversidade de efeitos ressalta a importância da análise detalhada desse miRNA, de forma individualizada no ambiente da doença e do tipo celular estudado.

Alguns cenários possíveis dentro do contexto patogênico da DHF no fígado podem explicar os resultados observados da expressão do miR-126-5p. Nenhum dos trabalhos revisados demonstra seu comportamento no contexto de qualquer doença infecciosa, viral ou bacteriana, esse é o primeiro estudo a descrever a associação do miR-126-5p em doenças infecciosas, além de ser o primeiro a descrever o perfil de miRNA na dengue *in vivo*, no fígado. É possível que a patogenia da dengue hemorrágica, em destaque o aumento da permeabilidade

vascular, seja regulada pelo miR-126-5p, entretanto devido à natureza etiológica distinta das doenças descritas, isso ocorra através de um mecanismo diferente do que é observado em patologias vasculares e no câncer, que inclusive também apresentam resultados discordantes. Assim como ocorre com o miR-122-5p, que tem influência negativa em infecções hepáticas e positivas em câncer e outras patologias não infecciosas (Brunetto et al. 2014; Tan et al. 2014a; Tsubota et al. 2014; Tan et al. 2014b; Dong et al. 2016; Liu et al. 2016)

A possibilidade é que a inibição da proliferação celular seja o mecanismo chave de ação, uma vez que a apoptose é característica marcante da patogenia hepática na dengue (John et al. 2015). Esse cenário é reforçado pela análise conjunta das vias KEGG dos genes alvo dos dois miRNAs superexpressos (miR-133a-3p e miR-126-5p), em que verificamos a presença de oito vias de morte celular, que inclui genes CDK, Notch, MAPK, RAS, p53, Wnt e FAS sendo reguladas em algum nível pelos miRNAs superexpressos, todas com valor de p ajustado  $< 0,05$ . O mecanismo de ação celular do miR-133a-3p corrobora essas afirmativas; essa molécula é classificada como um *myomiR*, um miRNA estreitamente envolvido na regulação do desenvolvimento muscular, associado a diversos problemas de desenvolvimento estrutural e potencial biomarcador em diversos cânceres. Chung et al. descreveu o aumento na expressão de miR133a-3p associado à indução de apoptose em células da retina de camundongos, através da regulação da caspase 9 e ciclina D2 (Chung et al. 2015); e é regulado positivamente na osteoporose e negativamente em câncer de colo retal (Hao et al. 2016; Wang et al. 2016). Foi identificado que a superexpressão de miR-133a-3p sintético suprimia a replicação do DENV *in vitro* (Castillo et al. 2015), esse resultado por si só caracteriza que essa molécula tem potencial associação com os quadros de dengue ou DHF e merece ser investigado, mesmo com a ausência de concordância na expressão entre as amostras de pacientes.

Somado aos argumentos anteriores, está também o resultado da análise conjunta das vias KEGG dos genes alvo de miRNAs regulados negativamente na dengue: miR-122-5p, miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-148a-5p, miR-146a-5p e miR-423-5p; um total de 29 de 208 vias encontradas foram de morte celular foram identificadas e destas, dez encontram-se entre as 30 vias com menor valor de p; agregando evidências ao provável envolvimento desses miRNAs na patogenia hepática, no sentido de regulação da apoptose, pois ao mesmo tempo que as citocinas liberadas na dengue ativam linfócitos T citotóxicos para conter e eliminar o DENV, o aumento da taxa de apoptose pode ser benéfico para replicação devido ao aumento do suprimento de fosfolípidos de membrana para produção de envelope viral (Lin et al. 2008).

Entre outras situações possíveis da função do miR-126-5p na dengue, temos que o aumento na sua expressão seja reflexo de outro estímulo paralelo, para que haja reparo nos

danos endoteliais vasculares causados durante a infecção do DENV e nesse cenário, o aumento da permeabilidade vascular estaria sendo induzido por fatores como o a “tempestade de citocinas”, precipitação de imunocomplexos, ativação de complemento e indução de marcadores de ativação endotelial como Angiopoetina-2 (Ang-2), fator Von Willebrand (vWF) e VEGF, estes dois últimos são alvos de miR-126-5p e VEGF foi detectado aumentado em consequência da supressão de miR-126-5p na lesão pulmonar aguda, o que levou a aumento na permeabilidade alveolar e agravamento da doença em camundongos (Tang et al. 2016).

A regulação do crescimento e reparo endotelial pelo miR-126-5p (e miR-126-3p) é muito bem estabelecida e consolidada na literatura, assim como a importância do aumento da permeabilidade vascular na patogenia da dengue hemorrágica, dessa forma fica clara essa potencial relação encontrada entre a superexpressão do miR-126-5p e os sintomas vasculares da dengue hemorrágica. Porém, devido a ausência de dados como perfil de expressão gênica e citocinas nas amostras estudadas, tornam-se necessárias outras análises experimentais para elucidar o mecanismo pelo qual essa relação se estabelece, é preciso entender qual mecanismo de regulação endotelial ocorre no tecido hepático, identificar o exato gene (ou genes) alvo e as vias que são reguladas pelo miR-126-5p e miR-133a-3p na dengue hemorrágica, os alvos candidatos em potencial seriam os relacionados ao controle do ciclo celular e da proliferação endotelial que são alvos desses miRNAs como CDK19, ADAM9, MMP7, VWC2, VEGF, DLK1 MAP3K2 e MAP3K7, inclusive sinalizadores MAPK foram identificados por Sreekanth et al. como mediador apoptótico no tecido hepático em infecções por DENV, através da regulação de TNF-alpha e caspases (Sreekanth et al. 2016)

Quanto aos miRNAs regulados negativamente da dengue, o miR-122-5p é tecido específico e representa geralmente mais de 50% da expressão de miRNAs do fígado, atuando em vias do metabolismo de lipídeos. Ratos que tiveram esse gene silenciado apresentaram esteato-hepatite, fibrose e carcinoma hepatocelular (Tsai et al. 2012), o que condiz com os achados histopatológicos em casos de óbito por DHF, onde se detectou a presença de alterações hepáticas metabólicas, esteatose, necrose e hiperplasia (Póvoa et al. 2014). Em casos de câncer a expressão de miR-122-5p tem efeito supressor de tumor, enquanto em infecções por *Leishmania*, vírus da hepatite B e C, a presença dessa molécula em cultura é essencial para replicação do vírus e é encontrado sub-expresso em portadores assintomáticos e não respondedores ao tratamento (Brunetto et al. 2014; Tan et al. 2014a; Tsubota et al. 2014; Tan et al. 2014b; Dong et al. 2016; Liu et al. 2016).

Na dengue, elementos de reconhecimento de miRNAs miR-122 e miR-133a-3p adicionados à região 3'UTR do DENV suprimiu a replicação do vírus em cultura. No fígado



com DHF encontramos o miR-122-5p regulado negativamente com uma grande diferença entre os grupos amostrais, a diversidade de efeitos reflete a necessidade em pesquisas mais detalhadas sobre o mecanismo de ação dessa molécula, bem como do miR-146a-5p, que apresentou aqui expressão diminuída na dengue, divergindo da maioria dos casos relatados na literatura em que o miR-146a (sequencia -3p) é descrito como regulador da imunidade inata, resposta inflamatória e inibição de IFN através da regulação de NF-kB, esse efeito é o mecanismo pelo qual está envolvido em facilitar a replicação do DENV (WU et al., 2013) e do HCV em cultura de células (Bandiera et al. 2016). Por outro lado, ele está relacionado com diminuição da fibrose em esteato-hepatite não alcoólica (Du et al. 2015) e recentemente foi detectado também sub-expresso no soro de indivíduos com dengue (Ouyang et al. 2016).

O efeito de miR-146a pode ser extremamente importante na patogenia da dengue hemorrágica, é válido ressaltar que as diferenças percebidas entre os estudos são esperadas, visto a variedade de modelos experimentais e muitas vezes a análise em cultivo celular fora do contexto sistêmico. Para outras infecções onde a replicação viral tem papel central na patogenia, esses modelos de cultivo podem ser mais acurados na resolução de hipóteses, no caso da dengue é sempre necessário levar em consideração a patogenia marcada pela intensa reação inespecífica do sistema imune induzida por reação cruzada de linfócitos T e anticorpos, um quadro atualmente classificado como reação de hipersensibilidade tipo V caracterizada como acentuação de infecção microbiana por imunocomplexo de IgG em células com receptor Fc (Halstead, 2014), e adicionalmente a ativação de linfócitos T ineficazes em toxicidade e altamente competentes em ativar liberação de quimiocinas e com fraca indução de INF- $\gamma$ , o que provoca um exacerbado aumento da inflamação. Por outro lado, como foi extensamente revisado por John et al., o aumento de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, CCL2 (MCP-1) e CCL5 é detectado como característico de quadros graves dengue, que deve ser levado em considerações em nossos resultados por se tratar de amostras de óbito por dengue hemorrágica, o ponto mais grave que a infecção pode chegar (John et al. 2015).

Os outros quatro miRNAs sub-expressos miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-148a-5p e miR-423-5p tem associação variável com câncer e outras doenças não infecciosas, em quase metade dos estudos tem efeito de supressor tumoral/benéfico e na outra metade tem efeito contrário, dependendo do tipo celular e da etiologia da doença (Han et al. 2009; Hoss et al. 2014; Long et al. 2014; Wojcicka et al. 2014; He et al. 2015; Liu et al. 2015; Miyamoto et al. 2015; Zhao et al. 2015; Hoss et al. 2016). No geral, podem estar relacionadas também a vias de controle da proliferação celular, não apresentam relação imediata tão clara como os outros miRNAs

descritos aqui, mas mesmo com os critérios rigorosos de análise, apresentaram diferença estatística significativa e merecem estudos posteriores para esclarecimento de tal relação.

## 5 CONCLUSÃO

Na análise do miRNoma do fígado de indivíduos que faleceram por dengue hemorrágica e controles sem hepatopatias, foram identificados 1129 miRNA maduros expressos. Entre os 30 mais expressos, o miR-143-3p teve o maior número de leituras normalizadas no tecido hepático de dengue hemorrágica, enquanto no grupo controle o mais expresso foi o miRNA hepático específico miR-122-5p.

A idade dos indivíduos envolvidos em estudos de expressão de miRNA *in vivo* é um fator altamente modificador dos perfis de expressão hepática, de forma mais significativa que o sexo; a homogeneidade da faixa etária nos grupos de comparação deve ser rigorosamente controlada.

Oito miRNAs apresentaram expressão diferencial no fígado com DHF, o angiogênico miR-126-5p e o *myomiR* miR-133a-3p regulados positivamente na dengue. Enquanto o miRNA hepático miR-122-5p, o regulador de Interferon miR-146a-5p e os demais miR-204-5p, miR-148a-5p, miR-10b-5p e miR-423-5p estão regulados negativamente.

A análise conjunta de genes alvo de miRNA superexpressos miR-126-5p e miR133a-3p identificou genes envolvidos principalmente na sinalização celular: MAPK, família RAS, CDK e FAS; e na resposta imune: NF-kB, CC, CX, IL e TLR. A análise funcional KEGG e GO utilizando os genes alvo, resultaram em vias relacionadas a regulação da apoptose e ativação imune. A via de sinalização VEGF de controle da proliferação de células endoteliais também foi identificada.

Os alvos e vias identificadas na análise funcional dos miRNAs sub-expressos também foram em maior frequência, de regulação da apoptose e outras vias biosintéticas metabólicas.

Os miRNAs miR-126-5p, miR-122-5p, miR-146a-5p e miR-133a-3p parecem ter o maior envolvimento na patogenia hepática da dengue hemorrágica, pois: i) pode regular o crescimento e reparo endotelial, determinante na permeabilidade vascular apresentada em quadros hemorrágicos; ii) tem papel central na homeostase hepática, com a supressão *in vitro* associada a diversas patologias como esteatose e fibrose, encontrados em análise histopatológica hepática de casos de óbito por dengue hemorrágica; iii) regula a expressão de Interferon, citocina inflamatória associada aos quadros de exacerbação da resposta imune que leva à dengue grave; e iv) reguladores diretos da replicação do DENV em cultivo celular através da ligação com o genoma viral.

miRNAs parecem ser promissores agentes a serem usados em terapias anti-virais e diagnóstico de dengue, dessa forma, estudos adicionais são necessários para identificar os genes

alvo regulados por esses miRNAs no fígado durante a infecção por DENV, que podem ou não diferir dos genes e vias propostos nesse trabalho.

## 6 REFERÊNCIAS

- Ahmed A, Alvi AH, Butt A, Nawaz SA and Hanif A (2014) Assessment of Dengue Fever Severity Through Liver Function Tests. *J Coll Physicians Surg Pakistan* 24:640–644.
- Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Atkinson JP and Diamond MS (2007) Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog* 3:e183. doi: 10.1371/journal.ppat.0030183
- Bäck AT and Lundkvist A (2013) Dengue viruses - an overview. *Infect Ecol Epidemiol* 3:1–21. doi: 10.3402/iee.v3i0.19839
- Bandiera S, Pernot S, El Saghire H, Durand SC, Thumann C, Crouchet E, Ye T, Fofana I, Oudot MA, Barths J et al. (2016) HCV-induced up-regulation of miR-146a-5p in hepatocytes promotes viral infection and deregulates metabolic pathways associated with liver disease pathogenesis. *J Virol* JVI.00619–16. doi: 10.1128/JVI.00619-16
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell Press* 116:281–297.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Myers MF et al. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496:504–507. doi: 10.1038/nature12060.
- Brasil (2013) Dengue: diagnóstico e manejo clínico adulto e criança, 4th ed. Brasília
- Brenner C, Galluzzi L, Kepp O and Kroemer G (2013) Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* 59:583–594. doi: 10.1016/j.jhep.2013.03.033
- Brinton M a, Gavin EI and Fernandez a V (1986) Genotypic variation among six isolates of lactate dehydrogenase-elevating virus. *J Gen Virol* 67 ( Pt 12:2673–84.
- Brunetto MR, Cavallone D, Oliveri F, Moriconi F, Colombatto P, Coco B, Ciccorossi P, Rastelli C, Romagnoli V, Cherubini B et al. (2014) A serum microRNA signature is associated with the immune control of chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0110782
- Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, Lin Z, Schaefer BC and Flemington EK (2008) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol* 82:1946–58. doi: 10.1128/JVI.02136-07
- Castillo JA, Castrillón JC, Diosa-Toro M, Betancur JG, St Laurent G, Smit JM and Urcuqui-Inchima S (2015) Complex interaction between dengue virus replication and expression of miRNA-133a. *BMC Infect Dis* 16:29. doi: 10.1186/s12879-016-1364-y
- Chareonsirisuthigul T, Kalayanaroj S and Ubol S (2007) Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol* 88:365–375. doi: 10.1099/vir.0.82537-0
- Chen Y, Maguire T and Marks RM (1996) Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J Virol* 70:8765–72.
- Chung SH, Gillies M, Sugiyama Y, Zhu L, Lee SR and Shen W (2015) Profiling of Micro RNAs Involved in Retinal Degeneration Caused by Selective Müller Cell Ablation. *PLoS One* 10:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0118949
- Dégallier N, da Rosa a P, Vasconcelos PF, Figueiredo LT, da Rosa JF, Rodrigues SG and da Rosa ES (1996) Dengue and its vectors in Brazil. *Bull Soc Pathol Exot* 89:128–35; discussion 136.
- Dogini DB, Pascoal VDB, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC and Lopes-Cendes I (2014) The new world of RNAs. *Genet Mol Biol* 37:285–293.
- Dong H, Curran I, Williams A, Bondy G, Yauk CL and Wade MG (2016) Hepatic miRNA

- profiles and thyroid hormone homeostasis in rats exposed to dietary potassium perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Environ Toxicol Pharmacol* 41:201–210. doi: 10.1016/j.etap.2015.12.009
- Du J, Niu X, Wang Y, Kong L, Wang R, Zhang Y, Zhao S and Nan Y (2015) MiR-146a-5p suppresses activation and proliferation of hepatic stellate cells in nonalcoholic fibrosing steatohepatitis through directly targeting Wnt1 and Wnt5a. *Sci Rep* 5:16163. doi: 10.1038/srep16163
- Felli N, Felicetti F, Lustrì AM, Errico MC, Bottero L, Cannistraci A, De Feo A, Petrini M, Pedini F, Biffoni M et al. (2013) miR-126&126\* Restored Expressions Play a Tumor Suppressor Role by Directly Regulating ADAM9 and MMP7 in Melanoma. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0056824
- Fernandez-Gracia MD, Mazzon M, Jacobs M and Amara A (2009) Pathogenesis of Flavivirus Infections: Using and Abusing the Host Cell. *Cell Host Microbe* 5:318–328. doi: 10.1016/j.chom.2009.04.001
- Fried JR, Gibbons R V, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon I-K, Jarman RG, Green S, Rothman AL and Cummings D a T (2010) Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e617. doi: 10.1371/journal.pntd.0000617
- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W and Rajewsky N (2012) miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* 40:37–52. doi: 10.1093/nar/gkr688
- Gavazzo P, Vassalli M, Costa D and Pagano A (2013) Novel ncRNAs transcribed by Pol III and elucidation of their functional relevance by biophysical approaches. *Front Cell Neurosci* 7:203. doi: 10.3389/fncel.2013.00203
- Gómez-Díaz E, Jordà M, Peinado MA and Rivero A (2012) Epigenetics of host-pathogen interactions: the road ahead and the road behind. *PLoS Pathog* 8:e1003007. doi: 10.1371/journal.ppat.1003007
- Graves P and Zeng Y (2012) Biogenesis of mammalian microRNAs: a global view. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 10:239–45. doi: 10.1016/j.gpb.2012.06.004
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A and Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34:D140–4. doi: 10.1093/nar/gkj112
- Groen J, Koraka P, Velzing J, Copra C and Osterhaus a D (2000) Evaluation of six immunoassays for detection of dengue virus-specific immunoglobulin M and G antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 7:867–71.
- Gubler DJ (2002) Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10:100–3.
- Gurugama P, Garg P, Perera J, Wijewickrama A and Seneviratne SL (2010) Dengue viral infections. *Indian J Dermatol* 55:68–78. doi: 10.4103/0019-5154.60357
- Guzmán MG, Alvarez M, Rodríguez R, Rosario D, Vázquez S, Vald s L, Cabrera M V and Kourí G (1999) Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 3:130–5.
- Hahn CS, Hahn YS, Rice CM, Lee E, Dalgarno L, Strauss EG and Strauss JH (1987) Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J Mol Biol* 198:33–41.
- Halstead SB (2008a) Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol* 53:273–91. doi: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093326
- Halstead SB (2012) Controversies in dengue pathogenesis. *Paediatr Int Child Health* 32 Suppl 1:5–9. doi: 10.1179/2046904712Z.000000000045
- Halstead SB (2008b) *Dengue - Tropical Medicine: Science and Practice, Vol - 5*. Imperial College Press, London

- Halstead SB, O'Rourke EJ and Allison AC (1977) Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med* 146:218–29.
- Han J-W, Zheng H-F, Cui Y, Sun L-D, Ye D-Q, Hu Z, Xu J-H, Cai Z-M, Huang W, Zhao G-P et al. (2009) Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 41:1234–7. doi: 10.1038/ng.472
- Hao L, Li J, Tian Y and Wu J (2016) Changes in the MicroRNA Profile of the Mandible of Ovariectomized Mice. *Cell Physiol Biochem* 1267–1287. doi: 10.1159/000443074
- He H, Chen K, Wang F, Zhao L, Wan X, Wang L and Mo Z (2015) miR-204-5p promotes the adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by modulating DVL3 expression and suppressing Wnt/beta-catenin signaling. *Int J Mol Med* 35:1587–1595. doi: 10.3892/ijmm.2015.2160
- Hilgard P and Stockert R (2000) Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology* 32:1069–1077. doi: 10.1053/jhep.2000.18713
- Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I and Takasaki T (2012) Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol* 50:2047–52. doi: 10.1128/JCM.06557-11
- Ho T-S, Wang S-M, Anderson R and Liu C-C (2013) Antibodies in dengue immunopathogenesis. *J Formos Med Assoc* 112:1–2. doi: 10.1016/j.jfma.2012.11.009
- Hoss AG, Kartha VK, Dong X, Latourelle JC, Dumitriu A, Hadzi TC, MacDonald ME, Gusella JF, Akbarian S, Chen JF et al. (2014) MicroRNAs Located in the Hox Gene Clusters Are Implicated in Huntington's Disease Pathogenesis. *PLoS Genet*. doi: 10.1371/journal.pgen.1004188
- Hoss AG, Labadorf A, Beach TG, Latourelle JC and Myers RH (2016) microRNA Profiles in Parkinson's Disease Prefrontal Cortex. *Front Aging Neurosci* 8:1–8. doi: 10.3389/fnagi.2016.00036
- Huang DW, Lempicki R a and Sherman BT (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4:44–57. doi: 10.1038/nprot.2008.211
- Hussain M and Asgari S (2014) MicroRNA-like viral small RNA from Dengue virus 2 autoregulates its replication in mosquito cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:2746–51. doi: 10.1073/pnas.1320123111
- Jain B, Chaturvedi UC and Jain A (2014) Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; An overview. *Microb Pathog* 69-70C:45–52. doi: 10.1016/j.micpath.2014.03.004
- John DV, Lin Y-S and Perng GC (2015) Biomarkers of severe dengue disease - a review. *J Biomed Sci* 22:83. doi: 10.1186/s12929-015-0191-6
- Kakumani PK, Ponia SS, S RK, Sood V, Chinnappan M, Banerjea AC, Medigeshi GR, Malhotra P, Mukherjee SK and Bhatnagar RK (2013) Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *J Virol* 87:8870–83. doi: 10.1128/JVI.02774-12
- Kakumani PK, Rajgokul KS, Ponia SS, Kaur I, Mahanty S, Medigeshi GR, Banerjea AC, Chopra AP, Malhotra P, Mukherjee SK et al. (2015) Dengue NS3, an RNAi suppressor, modulates the human-miRNA pathways through its interacting partner. *Biochem J* 89–99. doi: 10.1042/BJ20150445
- Krol J, Loedige I and Filipowicz W (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11:597–610. doi: 10.1038/nrg2843
- Kunej T, Godnic I, Ferdin J, Horvat S, Dovc P and Calin GA (2011) Epigenetic regulation of microRNAs in cancer: an integrated review of literature. *Mutat Res* 717:77–84. doi:

10.1016/j.mrfmmm.2011.03.008

Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843–54.

Libraty DH, Pichyangkul S, Ajariyakhajorn C, Endy TP and Ennis FA (2001) Human Dendritic Cells Are Activated by Dengue Virus Infection : Enhancement by Gamma Interferon and Implications for Disease Pathogenesis. *J Virol* 75:3501–3508. doi: 10.1128/JVI.75.8.3501

Lin C-F, Wan S-W, Chen M-C, Lin S-C, Cheng C-C, Chiu S-C, Hsiao Y-L, Lei H-Y, Liu H-S, Yeh T-M et al. (2008) Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab Invest* 88:1079–1089. doi: 10.1038/labinvest.2008.70

Liu L, Wang J, Li X, Ma J, Shi C, Zhu H, Xi Q, Zhang J, Zhao X and Gu M (2015) MiR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 457:621–626. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.01.037

Liu Y, Chen X, Bian Q, Shi Y, Liu Q, Ding L, Zhang H and Zhu B (2016) Analysis of plasma microRNA expression profiles in a Chinese population occupationally exposed to benzene and in a population with chronic benzene poisoning. *J Thorac Dis* 8:403–414. doi: 10.21037/jtd.2016.02.56

Long XR, He Y, Huang C and Li J (2014) MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in hepatocellular carcinogenesis. *Int J Oncol* 45:1915–1922. doi: 10.3892/ijo.2014.2373

Lu J, Getz G, Miska E a, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando A a et al. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–8. doi: 10.1038/nature03702

Lühn K, Simmons CP, Moran E, Dung NTP, Chau TNB, Quyen NTH, Thao LTT, Van Ngoc T, Dung NM, Wills B et al. (2007) Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med* 204:979–985. doi: 10.1084/jem.20061381

Martina BEE, Koraka P and Osterhaus ADME (2009) Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clin Microbiol Rev* 22:564–81. doi: 10.1128/CMR.00035-09

Meder B, Backes C, Haas J, Leidinger P, St??hler C, Gro??mann T, Vogel B, Frese K, Giannitsis E, Katus HA et al. (2014) Influence of the confounding factors age and sex on microRNA profiles from peripheral blood. *Clin Chem* 60:1200–1208. doi: 10.1373/clinchem.2014.224238

Miller JL, de Wet BJM, deWet BJM, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek R a, Rudd PM and Gordon S (2008) The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog* 4:e17. doi: 10.1371/journal.ppat.0040017

Ministério Da Saúde (2016) Dengue diagnóstico e manejo clínico criança.

Miyamoto S, Usami S, Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Hakuno D, Nakashima Y, Nishiga M, Izuhara M, Nakao T et al. (2015) Expression Patterns of miRNA-423-5p in the Serum and Pericardial Fluid in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *PLoS One* 10:e0142904. doi: 10.1371/journal.pone.0142904

Modis Y, Ogata S, Clements D and Harrison SC (2004) Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427:313–9. doi: 10.1038/nature02165

Murphy BR and Whitehead SS (2011) Immune response to dengue virus and prospects for a vaccine. *Annu Rev Immunol* 29:587–619. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101315

Nikolic I, Plate K-H and Schmidt MH (2010) EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance. *J Angiogenes Res* 2:9. doi: 10.1186/2040-2384-2-9

Nogueira RMR, de Araújo JMG and Schatzmayr HG (2007) Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev Panam Salud Publica* 22:358–63.

Oliveira LF De, Lima CPS De, Azevedo RDSS, Mendonça DSF De, Rodrigues SG, Carvalho VL, Pinto EV, Maia AL, Maia MHT, Vasconcelos JM et al. (2014) Polymorphism of DC-

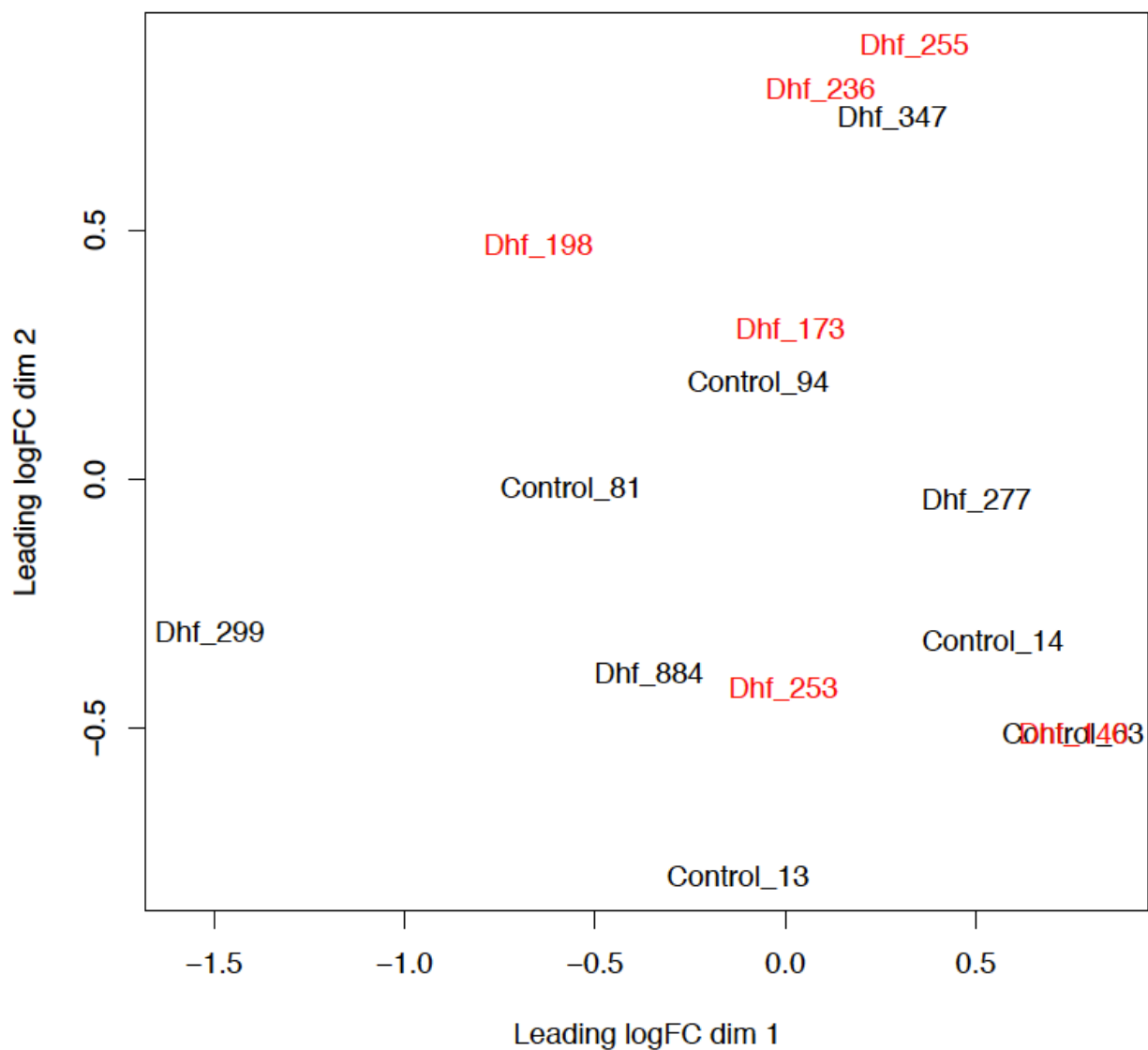


- SIGN (CD209) promoter in association with clinical symptoms of dengue fever. *Viral Immunol* 27:245–9. doi: 10.1089/vim.2013.0119
- Ouyang X, Jiang X, Gu D, Zhang Y, Kong SK, Jiang C and Xie W (2016) Dysregulated Serum MiRNA Profile and Promising Biomarkers in Dengue-infected Patients. *Int J Med Sci* 13:195–205. doi: 10.7150/ijms.13996
- Pagliari C, Quaresma JAS, Fernandes ER, Stegun FW, Brasil RA, Andrade-Jr. HF de, Barros V, Vasconcelos PFC and Duarte MIS (2014) Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever: Contribution to the Study of Human Liver Lesions. *J Med Virol* 86:1193–1197. doi: 10.1002/jmv
- Pagliari C, Simões Quaresma JA, Kanashiro-Galo L, de Carvalho LV, Vitoria WO, da Silva WLF, Penny R, Vasconcelos BCB, da Costa Vasconcelos PF and Duarte MIS (2016) Human kidney damage in fatal dengue hemorrhagic fever results of glomeruli injury mainly induced by IL17. *J Clin Virol* 75:16–20. doi: 10.1016/j.jcv.2015.12.005
- Pijlman GP (2014) Flavivirus RNAi suppression: decoding non-coding RNA. *Curr Opin Virol* 7C:55–60. doi: 10.1016/j.coviro.2014.04.002
- Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvão LR, Amarilla A a, Poloni DF, Figueiredo LT and Aquino VH (2010) Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virol J* 7:22. doi: 10.1186/1743-422X-7-22
- Poulin R and Thomas F (2008) Epigenetic effects of infection on the phenotype of host offspring: parasites reaching across host generations. *Oikos* 117:331–335. doi: 10.1111/j.2007.0030-1299.16435.x
- Póvoa TF, Alves AMB, Oliveira C a B, Nuovo GJ, Chagas VL a and Paes M V. (2014) The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: Histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0083386
- Prince HE and Matud JL (2011) Estimation of dengue virus IgM persistence using regression analysis. *Clin Vaccine Immunol* 18:2183–5. doi: 10.1128/CVI.05425-11
- Rico-Hesse R (1990) Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology* 174:479–93.
- Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (2009) edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Rothman AL (2011) Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol* 11:532–543. doi: 10.1038/nri3014
- Sakuntabhai A, Turbpaiboon C, Casadémont I, Chuansumrit A, Lowhnoo T, Kajaste-Rudnitski A, Kalayanaroj SM, Tangnararatchakit K, Tangthawornchaikul N, Vasanawathana S et al. (2005) A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. *Nat Genet* 37:507–13. doi: 10.1038/ng1550
- Schnettler E, Sterken MG, Leung JY, Metz SW, Geertsema C, Goldbach RW, Vlak JM, Kohl A, Khromykh A a and Pijlman GP (2012) Noncoding flavivirus RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and Mammalian cells. *J Virol* 86:13486–500. doi: 10.1128/JVI.01104-12
- Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Bidzhekov K, Gremse F, Grommes J, Megens RTA, Heyll K, Noels H, Hristov M et al. (2014) MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat Med* 20:368–76. doi: 10.1038/nm.3487
- Sharma N, Verma R, Kumawat KL, Basu A and Singh SK (2015) miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells. *J Neuroinflammation* 12:249. doi: 10.1186/s12974-015-0249-0
- Shibayama Y, Kondo T, Ohya H, Fujisawa SI, Teshima T and Iseki K (2015) Upregulation of microRNA-126-5p is associated with drug resistance to cytarabine and poor prognosis in

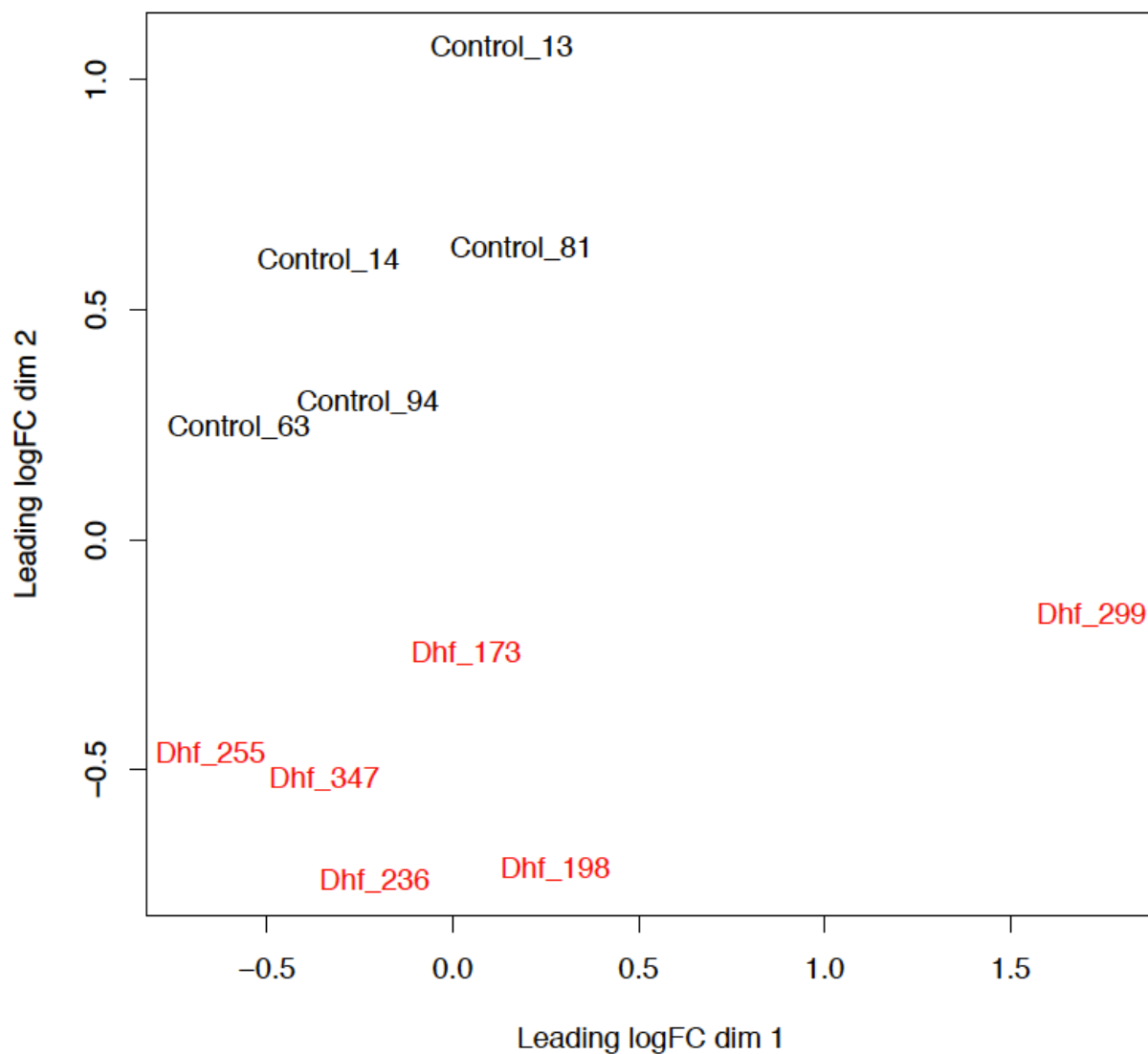
- AML patients. *Oncol Rep* 33:2176–2182. doi: 10.3892/or.2015.3839
- Sreekanth GP, Chuncharunee A, Sirimontaporn A, Panaampon J, Noisakran S, Yenchitsomanus P and Limjindaporn T (2016) SB203580 Modulates p38 MAPK Signaling and Dengue Virus-Induced Liver Injury by Reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 Phosphorylation. *PLoS One* 11:e0149486. doi: 10.1371/journal.pone.0149486
- St John AL, Abraham SN and Gubler DJ (2013) Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 11:420–6. doi: 10.1038/nrmicro3030
- Sun P and Kochel TJ (2013) The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal* 2013:843469. doi: 10.1155/2013/843469
- Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Chen L, Yu X, Zhou X and Gan J (2014a) A serum microRNA panel as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma related with hepatitis B virus. *PLoS One* 9:e107986. doi: 10.1371/journal.pone.0107986
- Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D and Gan J (2014b) A pilot study of serum micromRNAs panel as potential biomarkers for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 9:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0105192
- Tang KF and Ooi EE (2012) Diagnosis of dengue: an update. *Expert Rev* 10:895–907.
- Tang R, Pei L, Bai T and Wang J (2016) Down-regulation of microRNA-126-5p contributes to overexpression of VEGFA in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Biotechnol Lett.* doi: 10.1007/s10529-016-2107-2
- Teixeira MG, Siqueira JB, Ferreira GLC, Bricks L and Joint G (2013) Epidemiological trends of dengue disease in Brazil (2000-2010): a systematic literature search and analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2520. doi: 10.1371/journal.pntd.0002520
- Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Azevedo R do SS and Vasconcelos MRTNPF da C (2011) Dengue Virus Serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerg Infect Dis* 17:938–939. doi: 10.1638/2008-0011.1
- Tesh R. (1979) A Method for the Isolation and Identification of Dengue Viruses, using Mosquito Cell Cultures. *Am J Trop Med Hyg* November:1053–1059.
- Thakral S and Ghoshal K (2015) miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr Gene Ther* 15:142–50.
- Tomlinson SM, Malmstrom RD and Watowich SJ (2009) New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors. *Infect Disord Drug Targets* 9:327–43.
- Travassos da Rosa a P, Vasconcelos PF, Travassos Da Rosa ES, Rodrigues SG, Mondet B, Cruz a C, Sousa MR and Travassos Da Rosa JF (2000) Dengue epidemic in Belém, Pará, Brazil, 1996-97. *Emerg Infect Dis* 6:298–301. doi: 10.3201/eid0603.000311
- Tsai WC, Hsu S Da, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, Huang Y, Chen HC, Lee CH, Tsai TF et al. (2012) MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* 122:2884–2897. doi: 10.1172/JCI63455
- Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, Kushida T, Furihata T, Tanaka H and Matsuura T (2014) Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C. *PLoS One* 9:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0097078
- Wan S-W, Lin C-F, Yeh T-M, Liu C-C, Liu H-S, Wang S, Ling P, Anderson R, Lei H-Y and Lin Y-S (2013) Autoimmunity in dengue pathogenesis. *J Formos Med Assoc* 112:3–11. doi: 10.1016/j.jfma.2012.11.006
- Wang E, Ni H, Xu R, Barrett a D, Watowich SJ, Gubler DJ and Weaver SC (2000) Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol* 74:3227–34.

- Wang L, Chen R-F, Liu J-W, Lee I-K, Lee C-P, Kuo H-C, Huang S-K and Yang KD (2011) DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e934. doi: 10.1371/journal.pntd.0000934
- Wang X, Chen L, Jin H, Wang S, Zhang Y, Tang X and Tang G (2016) Screening miRNAs for early diagnosis of colorectal cancer by small RNA deep sequencing and evaluation in a Chinese patient population. *Onco Targets Ther* 9:1159–66. doi: 10.2147/OTT.S100427
- Wang Z (2009) *MicroRNA Interference Technologies*, 1st ed. Springer, Heidelberg
- Weaver SC and Reisen WK (2010) Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* 85:328–45. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008
- Weiskopf D and Sette A (2014) T-Cell Immunity to Infection with Dengue Virus in Humans. *Front Immunol* 5:93. doi: 10.3389/fimmu.2014.00093
- WHO (2009) *Dengue Guidelines for Disgnosis, Treatment, Prevention and Control*, New. World Health Organization, Geneva
- WHO (1997) *Dengue haemorrhagic fever: Diagnosis, treatment, prevention and control*, 2nd ed. Geneva
- Wojcicka A, Swierniak M, Kornasiewicz O, Gierlikowski W, Maciag M, Kolanowska M, Kotlarek M, Gornicka B, Koperski L, Niewinski G et al. (2014) Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Int J Biochem Cell Biol* 53:208–217. doi: 10.1016/j.biocel.2014.05.020
- Wu S, He L, Li Y, Wang T, Feng L, Jiang L, Zhang P and Huang X (2013) miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6. *J Infect* 67:329–41. doi: 10.1016/j.jinf.2013.05.003
- Ye E-A and Steinle JJ (2016) miR-146a Attenuates Inflammatory Pathways Mediated by TLR4/NF- $\kappa$ B and TNF $\alpha$  to Protect Primary Human Retinal Microvascular Endothelial Cells Grown in High Glucose. *Mediators Inflamm* 2016:3958453. doi: 10.1155/2016/3958453
- Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, Schein S and Zhou ZH (2013) CryoEM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol* 20:105–110. doi: 10.1038/nsmb.2463.CryoEM
- Zhao H, Gao A, Zhang Z, Tian R, Luo A, Li M, Zhao D, Fu L, Fu L, Dong JT et al. (2015) Genetic analysis and preliminary function study of miR-423 in breast cancer. *Tumor Biol* 36:4763–4771. doi: 10.1007/s13277-015-3126-7
- Zhou W, Yin H, Wang T, Liu T, Li Z, Yan W, Song D, Chen H, Chen J, Xu W et al. (2014) MiR-126-5p regulates osteolysis formation and stromal cell proliferation in giant cell tumor through inhibition of PTHrP. *Bone* 66:267–276. doi: 10.1016/j.bone.2014.06.021

## MATERIAL SUPLEMENTAR



**Figura Suplementar 1.** Gráfico MDS Plot bidimensional construído com base no logFC (fold change) das 15 amostras (10 dengue hemorrágica e 5 controles).



**Figura Suplementar 2.** Gráfico MDS Plot bidimensional construído com base no logFC (fold change) de 11 amostras (6 dengue hemorrágica e 5 controles). Em evidência a amostra DHF\_299, como *outlier* e o agrupamento das outras, baseado em óbito por dengue e controle em dengue.

**Tabela Suplementar 1.** Resultados do teste para comparação entre os grupos de dengue hemorrágica (DHF) com menos e mais de 30 anos de idade. logFC: log do Fold Change; GLM: General Linear Model; FDR: False Discovery Rate.

miRNA	logFC	Teste GLM		Indivíduos < que 30 anos				Indivíduos > que 30 anos				
		PValue	FDR	Dhf_140	Dhf_253	Dhf_884	Dhf_277	Dhf_173	Dhf_255	Dhf_236	Dhf_347	Dhf_198
hsa-miR-122-5p	-6,9823	0,000000000	0,000000000	108640,49	268542,48	725069,19	116539,25	4708,45	2216,66	1308,02	3798,97	10,68
hsa-miR-10b-5p	-6,4735	0,000000000	0,000000000	669982,36	2635,03	10019,86	5103,71	1993,82	1847,95	1564,75	1535,57	2732,88
hsa-miR-133a-3p	7,6001	0,000000000	0,000000000	45,06	27,17	36,39	25,74	17,01	32470,27	99,60	98,16	49,82
hsa-miR-204-5p	-5,8963	0,000000000	0,000000000	13153,47	117,72	109,18	61,12	63,42	72,87	50,90	60,30	32,03
hsa-miR-146a-5p	-2,5783	0,000175715	0,018500270	5297,43	9186,40	11196,53	7915,33	1299,31	1576,88	1038,00	988,66	2127,94
hsa-miR-374a-5p	-2,2505	0,001286709	0,102052859	419,25	1281,30	218,35	1069,64	191,80	129,71	135,01	145,84	185,04
hsa-miR-3613-5p	-2,2739	0,002866042	0,165668447	101,87	212,79	97,04	157,63	29,39	5,83	17,71	14,02	85,40
hsa-miR-126-5p	2,1013	0,002989019	0,168268485	4229,72	5319,87	4767,32	7423,14	25735,61	18201,13	35712,66	22650,77	14322,69
hsa-miR-374b-5p	-2,0646	0,003556063	0,187201312	407,49	371,26	24,26	601,57	137,66	75,78	50,90	100,97	56,93
hsa-miR-146b-5p	-1,8775	0,005118147	0,232127640	12493,25	34993,42	23157,28	38410,52	5401,42	5932,97	6267,86	6326,00	13173,32
hsa-miR-142-3p	1,9816	0,005711998	0,255135904	172,40	593,11	315,40	500,24	1481,83	717,03	1524,91	838,61	3259,52
hsa-miR-30a-5p	-1,8003	0,007167468	0,315368603	205914,23	49042,40	16291,37	71459,97	15675,24	22825,38	29535,54	20517,79	34452,74
hsa-miR-22-3p	1,8442	0,008417412	0,354493307	10951,43	10884,23	12615,81	14532,62	51695,50	66870,10	21395,28	38645,98	41249,35
hsa-miR-185-5p	-1,9110	0,011594010	0,466770835	80,32	40,75	36,39	255,75	10,83	30,60	15,49	29,45	56,93
hsa-let-7c-5p	-1,6974	0,012028360	0,472794733	2952,38	2449,40	4912,89	1618,13	1243,62	1230,02	765,78	1133,10	217,06
hsa-miR-27b-5p	2,1626	0,013083422	0,500908140	11,75	9,06	24,26	6,43	24,75	134,08	15,49	15,43	64,05
hsa-miR-24-3p	-1,6624	0,014838644	0,541688523	1022,66	842,12	1273,71	1383,29	352,67	427,01	385,10	457,17	160,13
hsa-miR-24-3p	-1,6637	0,014763684	0,541688523	1022,66	842,12	1273,71	1380,08	352,67	424,10	385,10	457,17	160,13
hsa-miR-10a-5p	-1,5634	0,018985244	0,606502704	198824,21	44184,35	24734,26	59661,77	36388,40	14149,63	33880,11	20332,68	33726,82
hsa-miR-145-5p	-1,5843	0,019657531	0,606502704	2041,39	1082,08	279,00	1457,28	303,17	623,76	473,63	535,70	92,52
hsa-miR-15b-3p	-1,6686	0,029342059	0,819841547	56,81	13,58	12,13	122,24	12,37	7,29	11,07	15,43	42,70
hsa-miR-4454	-1,4921	0,029589355	0,819841547	82,28	2426,77	84,91	313,65	68,06	531,94	66,40	401,07	224,18
hsa-miR-500a-3p	-1,6057	0,032755785	0,877855034	246,85	22,64	48,52	59,51	17,01	39,35	33,20	33,66	35,58
hsa-miR-98-5p	-1,4378	0,034001616	0,903033915	1408,60	1036,81	424,57	1700,16	686,78	460,53	314,28	295,90	355,84
hsa-miR-378a-5p	-1,5973	0,038594347	0,940298642	54,86	81,50	48,52	20,91	17,01	20,40	6,64	23,84	14,23

**Tabela Suplementar 2.** Dez grupos de anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs regulados positivamente no tecido hepático de indivíduos que faleceram de dengue hemorrágica. Presente as vias detectadas e os genes relacionados a cada uma com seus respectivos escores de enriquecimento, valores de p com ajuste de Benjamini.

Via	Count	Genes	Benjamini
<b>Annotation Cluster 1 - Enrichment Score: 2,8987</b>			
hsa05200:Pathways in cancer	16	EGFR, IL8, SMAD4, BRCA2, FADD, NFKB1, KIT, APPL1, CCDC6, IGF1R, CDKN1A, RAC1, RHOA, LAMC1, FAS, TRAF6	0,000027
GO:0043067~regulation of programmed cell death	19	EGFR, IRAK1, ROCK1, TLR2, BRCA2, FADD, NFKB1, TLR4, KIT, BRCA1, IGF1R, CDKN1A, CD40LG, HIPK3, RAC1, RHOA, FAF1, FAS, TRAF6	0,035849
GO:0010941~regulation of cell death	19	EGFR, IRAK1, ROCK1, TLR2, BRCA2, FADD, NFKB1, TLR4, KIT, BRCA1, IGF1R, CDKN1A, CD40LG, HIPK3, RAC1, RHOA, FAF1, FAS, TRAF6	0,018989
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	12	EGFR, IGF1R, IRAK1, CDKN1A, ROCK1, CD40LG, HIPK3, RHOA, NFKB1, KIT, FAS, TRAF6	0,033021
GO:0060548~negative regulation of cell death	12	EGFR, IGF1R, IRAK1, CDKN1A, ROCK1, CD40LG, HIPK3, RHOA, NFKB1, KIT, FAS, TRAF6	0,025489
GO:0042981~regulation of apoptosis	18	EGFR, IRAK1, ROCK1, TLR2, BRCA2, FADD, NFKB1, TLR4, BRCA1, IGF1R, CDKN1A, CD40LG, HIPK3, RAC1, RHOA, FAF1, FAS, TRAF6	0,018847
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	11	EGFR, IGF1R, IRAK1, CDKN1A, ROCK1, CD40LG, HIPK3, RHOA, NFKB1, FAS, TRAF6	0,032020
<b>Annotation Cluster 2 - Enrichment Score: 2,45557</b>			
GO:0010647~positive regulation of cell communication	11	EGFR, ERBB4, CDKN2AIP, RAC1, RHOA, SMAD4, FADD, TLR4, KIT, TRAF6, FLNA	0,025717
h_nfkbPathway:NF-kB Signaling Pathway	5	IRAK1, NFKB1, FADD, TLR4, TRAF6	0,125149
GO:0009967~positive regulation of signal transduction	9	CDKN2AIP, RAC1, RHOA, SMAD4, FADD, TLR4, KIT, TRAF6, FLNA	0,075479
GO:0051223~regulation of protein transport	6	CD40LG, RHOA, SMAD4, FAF1, TRAF6, FLNA	0,074189
GO:0043123~positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	5	RHOA, FADD, TLR4, TRAF6, FLNA	0,111252
GO:0043122~regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	5	RHOA, FADD, TLR4, TRAF6, FLNA	0,136083
GO:0010740~positive regulation of protein kinase cascade	5	RHOA, FADD, TLR4, TRAF6, FLNA	0,323119
GO:0010627~regulation of protein kinase cascade	6	HIPK3, RHOA, FADD, TLR4, TRAF6, FLNA	0,330829
<b>Annotation Cluster 3 - Enrichment Score: 2,349722</b>			
IPR000488:Death	5	IRAK2, IRAK1, NFKB1, FADD, FAS	0,020724
SM00005:DEATH	5	IRAK2, IRAK1, NFKB1, FADD, FAS	0,018212
domain:Death	4	IRAK2, NFKB1, FADD, FAS	0,189854

---

 Annotation Cluster 4 - Enrichment Score: 2,200633
 

---

GO:0032880~regulation of protein localization	8	SEPT2, CD40LG, RHOA, SMAD4, FAF1, TRAF6, APPL1, FLNA	0,021151
GO:0070201~regulation of establishment of protein localization	7	CD40LG, RHOA, SMAD4, FAF1, TRAF6, APPL1, FLNA	0,033177
<hr/> Annotation Cluster 5 - Enrichment Score: 2,089863			
GO:0031264~death-inducing signaling complex	3	FADD, FAF1, FAS	0,098835
Apoptosis	8	ROCK1, HIPK3, GZMB, NFKB1, FADD, FAF1, FAS, CCAR1	0,178631
h_fasPathway:FAS signaling pathway ( CD95 )	3	FADD, FAF1, FAS	0,900178
<hr/> Annotation Cluster 6 - Enrichment Score: 2,086000			
hsa04620:Toll-like receptor signaling pathway	8	IRAK1, IL8, RAC1, TLR2, NFKB1, FADD, TLR4, TRAF6	0,002280
GO:0007249~I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	6	IRAK2, IRAK1, TLR2, TLR4, FAF1, TRAF6	0,021038
GO:0002224~toll-like receptor signaling pathway	4	IRAK2, IRAK1, TLR2, TLR4	0,024736
GO:0002221~pattern recognition receptor signaling pathway	4	IRAK2, IRAK1, TLR2, TLR4	0,036166
GO:0002218~activation of innate immune response	4	IRAK2, IRAK1, TLR2, TLR4	0,034030
GO:0002758~innate immune response-activating signal transduction	4	IRAK2, IRAK1, TLR2, TLR4	0,034030
GO:0007243~protein kinase cascade	11	EGFR, IRAK2, IGF1R, IRAK1, CXCR4, TLR2, TLR4, FAF1, KIT, TRAF6, SLC9A1	0,036842
GO:0002757~immune response-activating signal transduction	5	IRAK2, IRAK1, TLR2, TLR4, TRAF6	0,046867
GO:0002253~activation of immune response	6	IRAK2, IRAK1, CFH, TLR2, TLR4, TRAF6	0,047374
<hr/> Annotation Cluster 7 - Enrichment Score: 2,008796			
GO:0031981~nuclear lumen	21	SEPT2, MTA2, SMAD4, BRCA2, NFKB1, KIT, APPL1, SRF, BRCA1, PA2G4, BRPF1, PAPOLA, CDKN1A, CDKN2AIP, JAZF1, ZNF540, POU3F2, GTF3C2, CCNA2, NOVA1, MED1	0,134747
GO:0070013~intracellular organelle lumen	23	SEPT2, MTA2, SMAD4, BRCA2, NFKB1, KIT, APPL1, SRF, BRCA1, PA2G4, BRPF1, PAPOLA, CDKN1A, P4HA1, PPM1K, CDKN2AIP, JAZF1, ZNF540, POU3F2, GTF3C2, CCNA2, NOVA1, MED1	0,218602
GO:0043233~organelle lumen	23	SEPT2, MTA2, SMAD4, BRCA2, NFKB1, KIT, APPL1, SRF, BRCA1, PA2G4, BRPF1, PAPOLA, CDKN1A, P4HA1, PPM1K, CDKN2AIP, JAZF1, ZNF540, POU3F2, GTF3C2, CCNA2, NOVA1, MED1	0,228781
GO:0031974~membrane-enclosed lumen	23	SEPT2, MTA2, SMAD4, BRCA2, NFKB1, KIT, APPL1, SRF, BRCA1, PA2G4, BRPF1, PAPOLA, CDKN1A, P4HA1, PPM1K, CDKN2AIP, JAZF1, ZNF540, POU3F2, GTF3C2, CCNA2, NOVA1, MED1	0,208620
GO:0005654~nucleoplasm	14	MTA2, SMAD4, BRCA2, NFKB1, APPL1, BRCA1, BRPF1, CDKN1A, CDKN2AIP, JAZF1, POU3F2, GTF3C2, CCNA2, MED1	0,193918
GO:0010628~positive regulation of gene expression	11	IRAK1, BRPF1, MTA2, SMAD4, NFKB1, POU3F2, KIT, SRF, CCNA2, BRCA1, MED1	0,159393
GO:0045941~positive regulation of transcription	10	IRAK1, BRPF1, MTA2, SMAD4, NFKB1, POU3F2, SRF, CCNA2, BRCA1, MED1	0,263939
GO:0005730~nucleolus	9	PAPOLA, PA2G4, SEPT2, MTA2, CDKN2AIP, ZNF540, KIT, SRF, NOVA1	0,608342



---

 Annotation Cluster 8 - Enrichment Score: 1,9924921
 

---

hsa04620:Toll-like receptor signaling pathway	8	IRAK1, IL8, RAC1, TLR2, NFKB1, FADD, TLR4, TRAF6	0,002280
h_nfkBPathway:NF-kB Signaling Pathway	5	IRAK1, NFKB1, FADD, TLR4, TRAF6	0,125149
hsa04722:Neurotrophin signaling pathway	6	IRAK2, IRAK1, RAC1, RHOA, NFKB1, TRAF6	0,122624
h_tollPathway:Toll-Like Receptor Pathway	5	IRAK1, TLR2, NFKB1, TLR4, TRAF6	0,274997
99,NF-kB_activation	4	IRAK1, NFKB1, FADD, TRAF6	0,343822
92,Ancient_Host_Defense_Pathways	3	IRAK1, NFKB1, TRAF6	0,394748
h_RELAPathway:Acetylation and Deacetylation of RelA in The Nucleus	3	NFKB1, FADD, TRAF6	0,564379
hsa04622:RIG-I-like receptor signaling pathway	4	IL8, NFKB1, FADD, TRAF6	0,207768
hsa04621:NOD-like receptor signaling pathway	3	IL8, NFKB1, TRAF6	0,427530
h_gsk3Pathway:Inactivation of Gsk3 by AKT	3	IRAK1, NFKB1, TLR4	0,900159

---

 Annotation Cluster 9 - Enrichment Score: 1,945966
 

---

GO:0042802~identical protein binding	15	EGFR, ALDOA, IRAK2, IRAK1, ROCK1, SMAD4, FADD, NFKB1, SRF, FLNA, BRCA1, FOXP2, IGF1R, POU3F2, FAS	0,054670
GO:0046983~protein dimerization activity	10	EGFR, IRAK2, IRAK1, BACH2, SMAD4, NFKB1, SRF, FLNA, CREBL2, FOXP2	0,512785
GO:0042803~protein homodimerization activity	7	IRAK2, IRAK1, SMAD4, NFKB1, SRF, FLNA, FOXP2	0,622882
GO:0046982~protein heterodimerization activity	4	EGFR, IRAK2, IRAK1, FOXP2	0,884506

---

 Annotation Cluster 10 - Enrichment Score: 1,840182
 

---

GO:0040012~regulation of locomotion	8	EGFR, IGF1R, ERBB4, IL8, CXCR4, CLIC4, RAC1, KIT	0,046841
GO:0042325~regulation of phosphorylation	12	EGFR, IRAK1, CDKN1A, CXCR4, HIPK3, RAC1, SMAD4, TLR4, KIT, TRAF6, CDKN3, CCNG1	0,049236
GO:0051174~regulation of phosphorus metabolic process	12	EGFR, IRAK1, CDKN1A, CXCR4, HIPK3, RAC1, SMAD4, TLR4, KIT, TRAF6, CDKN3, CCNG1	0,054009
GO:0019220~regulation of phosphate metabolic process	12	EGFR, IRAK1, CDKN1A, CXCR4, HIPK3, RAC1, SMAD4, TLR4, KIT, TRAF6, CDKN3, CCNG1	0,054009
GO:0043549~regulation of kinase activity	10	EGFR, IRAK1, CDKN1A, CXCR4, HIPK3, RAC1, KIT, TRAF6, CDKN3, CCNG1	0,071427
GO:0008283~cell proliferation	11	EGFR, PA2G4, ERBB4, CXCR4, CD40LG, NUMB, RAC1, BRCA2, POU3F2, KIT, APPL1	0,075369
GO:0030334~regulation of cell migration	7	EGFR, IGF1R, ERBB4, CXCR4, CLIC4, RAC1, KIT	0,068663
GO:0051338~regulation of transferase activity	10	EGFR, IRAK1, CDKN1A, CXCR4, HIPK3, RAC1, KIT, TRAF6, CDKN3, CCNG1	0,070515
GO:0051270~regulation of cell motion	7	EGFR, IGF1R, ERBB4, CXCR4, CLIC4, RAC1, KIT	0,087436
GO:0045859~regulation of protein kinase activity	9	EGFR, IRAK1, CDKN1A, CXCR4, HIPK3, KIT, TRAF6, CDKN3, CCNG1	0,103110
kinase	10	EGFR, IGF1R, IRAK1, CDKN1A, ERBB4, ROCK1, HIPK3, KIT, CDKN3, PIP4K2A	0,241484

GO:0033674~positive regulation of kinase activity	6	EGFR, IRAK1, CXCR4, RAC1, KIT, TRAF6	0,287890
GO:0044093~positive regulation of molecular function	10	EGFR, IRAK2, IRAK1, CXCR4, RAC1, TLR2, GNG13, TLR4, KIT, TRAF6	0,290031
GO:0051347~positive regulation of transferase activity	6	EGFR, IRAK1, CXCR4, RAC1, KIT, TRAF6	0,310224
hsa04144:Endocytosis	6	EGFR, IGF1R, ERBB4, CXCR4, KIT, TRAF6	0,201926
GO:0045860~positive regulation of protein kinase activity	5	EGFR, IRAK1, CXCR4, KIT, TRAF6	0,521061
GO:0043405~regulation of MAP kinase activity	4	EGFR, CXCR4, HIPK3, KIT	0,527495
GO:0006468~protein amino acid phosphorylation	9	EGFR, IRAK2, IGF1R, IRAK1, ERBB4, ROCK1, CXCR4, HIPK3, KIT	0,619938
GO:0043406~positive regulation of MAP kinase activity	3	EGFR, CXCR4, KIT	0,719839
GO:0043085~positive regulation of catalytic activity	7	EGFR, IRAK1, CXCR4, RAC1, GNG13, KIT, TRAF6	0,739688
GO:0032147~activation of protein kinase activity	3	EGFR, IRAK1, TRAF6	0,768653
GO:0048609~reproductive process in a multicellular organism	5	EGFR, CXCR4, BRCA2, KIT, STRBP	0,965453
GO:0032504~multicellular organism reproduction	5	EGFR, CXCR4, BRCA2, KIT, STRBP	0,965453

**Tabela Suplementar 3.** Dez grupos de anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs regulados negativamente no tecido hepático de indivíduos que faleceram de dengue hemorrágica. Presente as vias detectadas e os genes relacionados a cada uma com seus respectivos escores de enriquecimento, valores de  $p$  com ajuste de Benjamini.

Term	Count	Genes	Benjamini
Cluster 1 - Enrichment Score: 5,6477			
GO:0043067~regulation of programmed cell death	60	CADM1, TLR2, NFKB1, TLR4, ZFP91, BDNF, CDKN2A, TIAM1, RHOA, FAS, DAP, EGFR, ARHGEF4, IRAK1, ROCK1, ARHGEF18, TP53, FADD, ARHGEF12, BCL2L11, GRM4, NME2, CD40LG, IGF2R, HIPK3, FOXC1, NGFR, DCUN1D3, EIF2AK3, YWHAZ, BCLAF1, MCL1, PML, BCL2L2, NR3C1, KIT, CALR, SLC11A2, IGF1R, SOS1, BCL2, RB1CC1, RAC1, TGM2, TRAF6,	0,000006

		PTCRA, NACC1, TGFBR1, NF1, MUL1, BRCA2, BIRC2, SIRT1, BRCA1, NOTCH2, SON, NOTCH1, CDKN1A, FAF1, DNM2	
GO:0010941~regulation of cell death	60	CADM1, TLR2, NFKB1, TLR4, ZFP91, BDNF, CDKN2A, TIAM1, RHOA, FAS, DAP, EGFR, ARHGEF4, IRAK1, ROCK1, ARHGEF18, TP53, FADD, ARHGEF12, BCL2L11, GRM4, NME2, CD40LG, IGF2R, HIPK3, FOXC1, NGFR, DCUN1D3, EIF2AK3, YWHAZ, BCLAF1, MCL1, PML, BCL2L2, NR3C1, KIT, CALR, SLC11A2, IGF1R, SOS1, BCL2, RB1CC1, RAC1, TGM2, TRAF6, PTCRA, NACC1, TGFBR1, NF1, MUL1, BRCA2, BIRC2, SIRT1, BRCA1, NOTCH2, SON, NOTCH1, CDKN1A, FAF1, DNM2	0,0000003
GO:0042981~regulation of apoptosis	59	CADM1, TLR2, NFKB1, TLR4, ZFP91, BDNF, CDKN2A, TIAM1, RHOA, FAS, DAP, EGFR, ARHGEF4, IRAK1, ROCK1, ARHGEF18, TP53, FADD, ARHGEF12, BCL2L11, GRM4, NME2, CD40LG, IGF2R, HIPK3, FOXC1, NGFR, DCUN1D3, EIF2AK3, YWHAZ, BCLAF1, MCL1, PML, BCL2L2, NR3C1, CALR, SLC11A2, IGF1R, SOS1, BCL2, RB1CC1, RAC1, TGM2, TRAF6, PTCRA, NACC1, TGFBR1, NF1, MUL1, BRCA2, BIRC2, SIRT1, BRCA1, NOTCH2, SON, NOTCH1, CDKN1A, FAF1, DNM2	0,0000004
GO:0043065~positive regulation of apoptosis	34	BCLAF1, CADM1, TLR2, PML, TLR4, NR3C1, CDKN2A, TIAM1, BCL2, SOS1, RAC1, TGM2, FAS, DAP, TRAF6, ARHGEF4, NACC1, TGFBR1, ARHGEF18, NF1, TP53, BRCA2, MUL1, FADD, ARHGEF12, BRCA1, BCL2L11, NOTCH2, CDKN1A, NOTCH1, FAF1, NGFR, DCUN1D3, DNM2	0,0004233
GO:0043068~positive regulation of programmed cell death	34	BCLAF1, CADM1, TLR2, PML, TLR4, NR3C1, CDKN2A, TIAM1, BCL2, SOS1, RAC1, TGM2, FAS, DAP, TRAF6, ARHGEF4, NACC1, TGFBR1, ARHGEF18, NF1, TP53, BRCA2, MUL1, FADD, ARHGEF12, BRCA1, BCL2L11, NOTCH2, CDKN1A, NOTCH1, FAF1, NGFR, DCUN1D3, DNM2	0,0004031
GO:0010942~positive regulation of cell death	34	BCLAF1, CADM1, TLR2, PML, TLR4, NR3C1, CDKN2A, TIAM1, BCL2, SOS1, RAC1, TGM2, FAS, DAP, TRAF6, ARHGEF4, NACC1, TGFBR1, ARHGEF18, NF1, TP53, BRCA2, MUL1, FADD, ARHGEF12, BRCA1, BCL2L11, NOTCH2, CDKN1A, NOTCH1, FAF1, NGFR, DCUN1D3, DNM2	0,0003417
GO:0043069~negative regulation of programmed cell death	29	YWHAZ, MCL1, BCL2L2, NFKB1, KIT, ZFP91, IGF1R, BDNF, BCL2, RB1CC1, TGM2, RHOA, FAS, TRAF6, PTCRA, EGFR, IRAK1, ROCK1, TGFBR1, TP53, NOTCH2, NME2, CDKN1A, NOTCH1, SON, CD40LG, HIPK3, FOXC1, NGFR	0,0007724
GO:0060548~negative regulation of cell death	29	YWHAZ, MCL1, BCL2L2, NFKB1, KIT, ZFP91, IGF1R, BDNF, BCL2, RB1CC1, TGM2, RHOA, FAS, TRAF6, PTCRA, EGFR, IRAK1, ROCK1, TGFBR1, TP53, NOTCH2, NME2, CDKN1A, NOTCH1, SON, CD40LG, HIPK3, FOXC1, NGFR	0,0007619
GO:0043066~negative regulation of apoptosis	28	YWHAZ, MCL1, BCL2L2, NFKB1, ZFP91, IGF1R, BDNF, BCL2, RB1CC1, RHOA, TGM2, FAS, TRAF6, PTCRA, EGFR, IRAK1, ROCK1, TGFBR1, TP53, NOTCH2, NME2, CDKN1A, NOTCH1, SON, CD40LG, HIPK3, FOXC1, NGFR	0,0011612
GO:0006917~induction of apoptosis	26	ARHGEF4, NACC1, BCLAF1, CADM1, TGFBR1, ARHGEF18, TLR2, TP53, PML, MUL1, BRCA2, FADD, ARHGEF12, BRCA1, BCL2L11, NOTCH2, CDKN1A, CDKN2A, TIAM1, SOS1, RAC1, TGM2, NGFR, FAS, DAP, TRAF6	0,0013398
GO:0012502~induction of programmed cell death	26	ARHGEF4, NACC1, BCLAF1, CADM1, TGFBR1, ARHGEF18, TLR2, TP53, PML, MUL1, BRCA2, FADD, ARHGEF12, BRCA1, BCL2L11, NOTCH2, CDKN1A, CDKN2A, TIAM1, SOS1, RAC1, TGM2, NGFR, FAS, DAP, TRAF6	0,0013083

GO:0012501~programmed cell death	38	CADM1, MCL1, PML, BCL2L2, NFKB1, KIT, GREM1, SLC11A2, CDKN2A, CXCR4, TIAM1, SOS1, BCL2, RAC1, TGM2, FAS, DAP, TRAF6, CCAR1, ARHGEF4, ROCK1, ARHGEF18, KLF11, TP53, MUL1, GZMB, FADD, ARHGEF12, SIRT1, NTN1, BIRC2, BRCA1, BCL2L11, DNASE2, HIPK3, NGFR, FAF1, EIF2AK3	0,0022539
GO:0008219~cell death	42	CADM1, MCL1, PML, BCL2L2, NFKB1, KIT, GREM1, SLC11A2, CDKN2A, CXCR4, TIAM1, SOS1, BCL2, RAC1, TGM2, FAS, DAP, TRAF6, CCAR1, ARHGEF4, ROCK1, ARHGEF18, KLF11, TP53, MUL1, GZMB, FADD, REEP1, ARHGEF12, SIRT1, BIRC2, NTN1, BRCA1, BCL2L11, ITPR1, DNASE2, EIF4G2, HIPK3, PLA2G6, NGFR, FAF1, EIF2AK3	0,0031491
GO:0016265~death	42	CADM1, MCL1, PML, BCL2L2, NFKB1, KIT, GREM1, SLC11A2, CDKN2A, CXCR4, TIAM1, SOS1, BCL2, RAC1, TGM2, FAS, DAP, TRAF6, CCAR1, ARHGEF4, ROCK1, ARHGEF18, KLF11, TP53, MUL1, GZMB, FADD, REEP1, ARHGEF12, SIRT1, BIRC2, NTN1, BRCA1, BCL2L11, ITPR1, DNASE2, EIF4G2, HIPK3, PLA2G6, NGFR, FAF1, EIF2AK3	0,0035711
GO:0006915~apoptosis	36	CADM1, MCL1, PML, BCL2L2, NFKB1, GREM1, SLC11A2, CDKN2A, CXCR4, TIAM1, SOS1, BCL2, RAC1, FAS, DAP, TRAF6, CCAR1, ARHGEF4, ROCK1, ARHGEF18, KLF11, TP53, MUL1, GZMB, FADD, ARHGEF12, SIRT1, NTN1, BIRC2, BRCA1, BCL2L11, DNASE2, HIPK3, NGFR, FAF1, EIF2AK3	0,0059353
GO:0006916~anti-apoptosis	18	IRAK1, YWHAZ, MCL1, TGFBR1, BCL2L2, NFKB1, NOTCH2, IGF1R, BDNF, SON, CD40LG, HIPK3, BCL2, TGM2, FOXC1, FAS, NGFR, TRAF6	0,0063692
Apoptosis	23	CADM1, ROCK1, MCL1, KLF11, TP53, MUL1, BCL2L2, FADD, NFKB1, GZMB, NTN1, SIRT1, BIRC2, BCL2L11, DNASE2, CDKN2A, HIPK3, BCL2, FAF1, DAP, FAS, NGFR, CCAR1	0,0176305
<u>Cluster 2 - Enrichment Score: 4,49715</u>			
GO:0030528~transcription regulator activity	80	PPARA, BACH2, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, ZFP42, PAX6, NFKB1, DEK, ZEB1, RORA, ZNF253, CBFA2T3, HOXD10, BRPF1, CDKN2A, TBL1XR1, IRAK1, ZNF90, RREB1, MTA2, SOX12, TP53, UBE2I, SIX4, PPARGC1A, ELL2, FOXR2, PA2G4, NME2, VGLL3, FOXC1, PRDM2, TFAP2C, MED1, SUPT6H, BTAF1, BCLAF1, SCML2, PML, ZNF367, NR3C1, MYBL1, CALR, MYBL2, SRF, MEIS1, MEIS2, BCL2, HOXA10, POU2F1, HNRNPD, POU3F2, GTF3C2, ZNF423, CREBL2, NACC1, KLF12, KLF11, SMAD4, BRCA2, NR4A3, FOXP4, SIRT1, ATXN7L3, BRCA1, FOXP2, NOTCH2, NOTCH1, DMTF1, EBF2, SP4, JAZF1, ID4, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4, DNMT2	0,0004872
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	46	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, PAX6, ZNF367, NFKB1, DEK, RORA, ZEB1, CALR, SRF, HOXD10, MEIS2, POU2F1, RHOA, POU3F2, CHD3, TBL1XR1, KLF12, MTA2, SOX12, KLF11, TP53, SMAD4, SIX4, NR4A3, SNAI2, SIRT1, PPARGC1A, FOXP4, BRCA1, FOXP2, NOTCH1, SP4, JAZF1, FOXC1, ID4, TFAP2C, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4, MED1, SUPT6H	0,0007192
GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	37	PPARA, BTAF1, BCLAF1, CDX2, THRB, NR6A1, PML, NFKB1, ZEB1, CALR, HIC2, MEIS2, POU2F1, TNRC6A, ZNF423, CDC6, TBL1XR1, NACC1, KLF12, MTA2, KLF11, SMAD4, TP53, BRCA2, UBE2I, SNAI2, SIRT1, FOXP4, BRCA1, FOXP2, PA2G4, JAZF1, ID4, NFIC, EIF2AK3, KLF4, NCOR2	0,0012428
GO:0016481~negative regulation of transcription	33	PPARA, BTAF1, BCLAF1, CDX2, THRB, NR6A1, PML, NFKB1, ZEB1, CALR, HIC2, MEIS2, POU2F1, ZNF423, TBL1XR1, NACC1, KLF12, MTA2, KLF11, SMAD4, TP53, UBE2I, SNAI2, SIRT1, FOXP4, BRCA1, FOXP2, PA2G4, JAZF1, ID4, NFIC, KLF4, NCOR2	0,0011826

GO:0010629~negative regulation of gene expression	35	PPARA, BTAF1, BCLAF1, CDX2, THRB, NR6A1, PML, NFKB1, ZEB1, CALR, HIC2, MEIS2, POU2F1, TNRC6A, ZNF423, TBL1XR1, NACC1, KLF12, MTA2, KLF11, SMAD4, TP53, UBE2I, SNAI2, SIRT1, FOXP4, BRCA1, FOXP2, PA2G4, JAZF1, ID4, CELF1, NFIC, KLF4, NCOR2	0,0011277
GO:0045934~negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	35	PPARA, BTAF1, BCLAF1, CDX2, THRB, NR6A1, PML, NFKB1, ZEB1, CALR, HIC2, MEIS2, POU2F1, ZNF423, CDC6, TBL1XR1, NACC1, KLF12, MTA2, KLF11, SMAD4, TP53, BRCA2, UBE2I, SNAI2, SIRT1, FOXP4, BRCA1, FOXP2, PA2G4, JAZF1, ID4, NFIC, KLF4, NCOR2	0,0013911
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	37	PPARA, BTAF1, BCLAF1, CDX2, THRB, NR6A1, PML, NFKB1, ZEB1, CALR, HIC2, MEIS2, POU2F1, TNRC6A, ZNF423, CDC6, TBL1XR1, NACC1, KLF12, MTA2, KLF11, SMAD4, TP53, BRCA2, UBE2I, SNAI2, SIRT1, FOXP4, BRCA1, FOXP2, PA2G4, JAZF1, ID4, NFIC, EIF2AK3, KLF4, NCOR2	0,0013405
GO:0051172~negative regulation of nitrogen compound metabolic process	35	PPARA, BTAF1, BCLAF1, CDX2, THRB, NR6A1, PML, NFKB1, ZEB1, CALR, HIC2, MEIS2, POU2F1, ZNF423, CDC6, TBL1XR1, NACC1, KLF12, MTA2, KLF11, SMAD4, TP53, BRCA2, UBE2I, SNAI2, SIRT1, FOXP4, BRCA1, FOXP2, PA2G4, JAZF1, ID4, NFIC, KLF4, NCOR2	0,0014846
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	37	PPARA, BTAF1, BCLAF1, CDX2, THRB, NR6A1, PML, NFKB1, ZEB1, CALR, HIC2, MEIS2, POU2F1, TNRC6A, ZNF423, CDC6, TBL1XR1, NACC1, KLF12, MTA2, KLF11, SMAD4, TP53, BRCA2, UBE2I, SNAI2, SIRT1, FOXP4, BRCA1, FOXP2, PA2G4, JAZF1, ID4, NFIC, EIF2AK3, KLF4, NCOR2	0,0017362
GO:0010605~negative regulation of macromolecule metabolic process	41	BTAF1, PPARA, BCLAF1, CDX2, THRB, NR6A1, PML, NFKB1, FKBP1A, ZEB1, CALR, HIC2, MEIS2, CDKN2A, POU2F1, TNRC6A, ZNF423, CDC6, TBL1XR1, NACC1, KLF12, MTA2, KLF11, TP53, SMAD4, BRCA2, UBE2I, SNAI2, SIRT1, FOXP4, BRCA1, FLNA, FOXP2, PA2G4, JAZF1, CELF1, ID4, NFIC, EIF2AK3, KLF4, NCOR2	0,0071473
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-dependent	25	TBL1XR1, PPARA, CDX2, KLF12, MTA2, NR6A1, KLF11, TP53, SMAD4, NFKB1, UBE2I, ZEB1, SNAI2, CALR, SIRT1, FOXP4, FOXP2, HIC2, PA2G4, MEIS2, POU2F1, JAZF1, NFIC, NCOR2, KLF4	0,0071883
GO:0051253~negative regulation of RNA metabolic process	25	TBL1XR1, PPARA, CDX2, KLF12, MTA2, NR6A1, KLF11, TP53, SMAD4, NFKB1, UBE2I, ZEB1, SNAI2, CALR, SIRT1, FOXP4, FOXP2, HIC2, PA2G4, MEIS2, POU2F1, JAZF1, NFIC, NCOR2, KLF4	0,0088477
GO:0016564~transcription repressor activity	23	TBL1XR1, NACC1, BCLAF1, CDX2, KLF12, THRB, MTA2, PML, NFKB1, UBE2I, ZEB1, CALR, ZNF253, FOXP4, SIRT1, FOXP2, MEIS2, POU2F1, JAZF1, ID4, KLF4, NCOR2, ZNF423	0,0425488
GO:0000122~negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	18	PPARA, TBL1XR1, CDX2, KLF12, MTA2, NR6A1, KLF11, TP53, NFKB1, ZEB1, CALR, SNAI2, FOXP4, FOXP2, MEIS2, JAZF1, NFIC, NCOR2	0,0534878
Cluster 3 - Enrichment Score: 4,451934			
activator	39	PPARA, BACH2, CDX2, ELF4, PML, ZNF367, NFKB1, MYBL1, CPEB1, ZEB1, RORA, SRF, MEIS1, BZW1, BRPF1, POU2F1, POU3F2, ZNF423, CREBL2, TBL1XR1, RREB1, KLF11, TP53, NCOA7, ZNF521, PPARGC1A, ATXN7L3, NOTCH2, NME2, NOTCH1, DMTF1, EBF2, SP4, PRDM2, CELF1, TFAP2C, NFIC, KLF4, MED1	0,0000031

GO:0030528~transcription regulator activity	80	PPARA, BACH2, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, ZFP42, PAX6, NFKB1, DEK, ZEB1, RORA, ZNF253, CBFA2T3, HOXD10, BRPF1, CDKN2A, TBL1XR1, IRAK1, ZNF90, RREB1, MTA2, SOX12, TP53, UBE2I, SIX4, PPARGC1A, ELL2, FOXR2, PA2G4, NME2, VGLL3, FOXC1, PRDM2, TFAP2C, MED1, SUPT6H, BTAF1, BCLAF1, SCML2, PML, ZNF367, NR3C1, MYBL1, CALR, MYBL2, SRF, MEIS1, MEIS2, BCL2, HOXA10, POU2F1, HNRNPD, POU3F2, GTF3C2, ZNF423, CREBL2, NACC1, KLF12, KLF11, SMAD4, BRCA2, NR4A3, FOXP4, SIRT1, ATXN7L3, BRCA1, FOXP2, NOTCH2, NOTCH1, DMTF1, EBF2, SP4, JAZF1, ID4, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4, DNMT2	0,0004872
Transcription	91	PPARA, BACH2, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, ZFP42, NAA15, PAX6, BBX, NFKB1, ZEB1, RORA, ZNF253, CBFA2T3, HOXD10, BZW1, ZFP91, BRPF1, PCGF3, CDKN2A, PHTF2, ZNF540, CCAR1, TBL1XR1, KHDRBS3, ZNF90, RREB1, SOX12, TP53, ZNF649, NCOA7, PPARGC1A, ELL2, FOXR2, PA2G4, NME2, HIPK3, VGLL3, FOXC1, PRDM2, TFAP2C, MED1, SUV420H1, SUPT6H, BCLAF1, SCML2, PML, ZNF367, NR3C1, MYBL1, ZNF654, MYBL2, SRF, MEIS1, ZNF660, HIC2, RB1CC1, HOXA10, POU2F1, HNRNPD, POU3F2, GTF3C2, ZNF423, CHD3, CREBL2, SSRP1, NACC1, KLF12, WDR5, KLF11, SMAD4, ZNF521, NR4A3, SNAI2, FOXP4, SIRT1, ATXN7L3, FOXP2, NOTCH2, NOTCH1, BCORL1, DMTF1, EBF2, SP4, JAZF1, ZBTB2, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0001133
transcription regulation	89	PPARA, BACH2, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, ZFP42, NAA15, PAX6, BBX, NFKB1, ZEB1, RORA, ZNF253, CBFA2T3, HOXD10, BZW1, ZFP91, BRPF1, PCGF3, CDKN2A, PHTF2, ZNF540, CCAR1, TBL1XR1, KHDRBS3, ZNF90, RREB1, SOX12, TP53, ZNF649, NCOA7, PPARGC1A, ELL2, FOXR2, PA2G4, NME2, HIPK3, VGLL3, FOXC1, PRDM2, TFAP2C, MED1, SUV420H1, SUPT6H, BCLAF1, SCML2, PML, ZNF367, NR3C1, MYBL1, ZNF654, MYBL2, SRF, ZNF660, HIC2, RB1CC1, HOXA10, POU2F1, HNRNPD, POU3F2, ZNF423, CHD3, CREBL2, SSRP1, NACC1, KLF12, WDR5, KLF11, SMAD4, ZNF521, NR4A3, SNAI2, FOXP4, SIRT1, ATXN7L3, FOXP2, NOTCH2, NOTCH1, BCORL1, DMTF1, EBF2, SP4, JAZF1, ZBTB2, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0001013
GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	46	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, PAX6, ZNF367, NFKB1, DEK, RORA, ZEB1, CALR, SRF, HOXD10, MEIS2, POU2F1, RHOA, POU3F2, CHD3, TBL1XR1, KLF12, MTA2, SOX12, KLF11, TP53, SMAD4, SIX4, NR4A3, SNAI2, SIRT1, PPARGC1A, FOXP4, BRCA1, FOXP2, NOTCH1, SP4, JAZF1, FOXC1, ID4, TFAP2C, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4, MED1, SUPT6H	0,0007192
GO:0031328~positive regulation of cellular biosynthetic process	44	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, APOC2, TLR4, NFKB1, ZEB1, RORA, CALR, SRF, HOXD10, IGF1R, BRPF1, MEIS2, NPM2, POU2F1, POU3F2, SHC1, TRAF6, CCNA2, ZNF423, EGFR, IRAK1, TBL1XR1, KLF12, TGFB1, MTA2, SMAD4, TP53, SIX4, NR4A3, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, EBF2, FOXC1, NFIC, EIF5A2, KLF4, MED1	0,0007920
GO:0009891~positive regulation of biosynthetic process	44	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, APOC2, TLR4, NFKB1, ZEB1, RORA, CALR, SRF, HOXD10, IGF1R, BRPF1, MEIS2, NPM2, POU2F1, POU3F2, SHC1, TRAF6, CCNA2, ZNF423, EGFR, IRAK1, TBL1XR1, KLF12, TGFB1, MTA2, SMAD4, TP53, SIX4, NR4A3, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, EBF2, FOXC1, NFIC, EIF5A2, KLF4, MED1	0,0009189
GO:0010557~positive regulation of macromolecule biosynthetic process	42	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, TLR4, NFKB1, ZEB1, RORA, CALR, SRF, HOXD10, IGF1R, BRPF1, MEIS2, NPM2, POU2F1, POU3F2, SHC1, TRAF6, CCNA2, ZNF423, IRAK1,	0,0010586

		TBL1XR1, KLF12, TGFBR1, MTA2, SMAD4, TP53, SIX4, NR4A3, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, EBF2, FOXC1, NFIC, EIF5A2, KLF4, MED1	
dna-binding	81	KIF22, PPARA, BACH2, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, ZFP42, PAX6, BBX, NFKB1, DEK, ZEB1, RORA, ZNF253, HOXD10, ZFP91, BRPF1, CDKN2A, PHTF2, ZNF540, ZNF90, RREB1, MTA2, SOX12, TP53, ZNF649, SIX4, TOX3, ZFR, HNRNPU, FOXR2, NME2, HIST2H2BE, FOXC1, PRDM2, TFAP2C, XRN1, MED1, BTAF1, BCLAF1, PML, ZNF367, NR3C1, MYBL1, ZNF654, MYBL2, SRF, MEIS1, ZNF660, HIC2, MEIS2, HOXA10, POU2F1, HNRNPD, POU3F2, STRBP, ZNF423, CHD3, CREBL2, SSRP1, SMG6, KLF12, RFX7, KLF11, ZNF521, NR4A3, SNAI2, FOXP4, SNAI1, BRCA1, FOXP2, SON, DMTF1, EBF2, SP4, ZBTB2, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0004779
GO:0010604~positive regulation of macromolecule metabolic process	50	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PML, PAX6, NAA15, NFKB1, FKBP1A, TLR4, ZEB1, KIT, RORA, CALR, SRF, HOXD10, ZFP91, IGF1R, BRPF1, MEIS2, RB1CC1, BCL2, NPM2, POU2F1, POU3F2, FBXO4, SHC1, TRAF6, CCNA2, ZNF423, TBL1XR1, IRAK1, KLF12, MTA2, TGFBR1, TP53, SMAD4, NR4A3, SIX4, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, EBF2, FOXC1, SH3D19, NFIC, EIF5A2, KLF4, MED1	0,0012039
nucleus	154	SCAF1, CDX2, THRB, PNKD, BBX, NAA15, RBM6, INTS2, RORA, ZNF253, HOXD10, ZFP91, BRPF1, CDKN2A, PHTF2, CLK4, SPRED1, CCNA2, STAG2, RREB1, MTA2, ZNF649, SIX4, TOX3, PPARGC1A, CDKL2, HNRNPU, ELL2, NME2, PA2G4, CEP350, CAMK1, PRDM2, CELF1, VGLL3, TFAP2C, BIVM, FBXL3, SUPT6H, SUV420H1, MCL1, MYBL1, MYBL2, CCNG1, SRF, MEIS1, DAZAP1, FBXW7, MEIS2, NPM2, NUP50, HNRNPD, HOXA10, TRAF6, NOVA1, CREBL2, ZNF423, SMG6, KLF12, CLCC1, WDR5, RFX7, KLF11, SMAD4, ZNF521, NR4A3, FOXP4, RBMX, BRCA1, FOXP2, UBE2E3, NOTCH2, CDKN1A, NOTCH1, HNRNPH3, DMTF1, EBF2, CDKN2AIP, JAZF1, TCF12, KLF4, NCOR2, KIF22, PPARA, KDM6A, BACH2, ELF4, NR6A1, ZFP42, PAX6, DEK, NFKB1, ZEB1, CBFA2T3, CAMKK1, DIP2A, ZNF540, CDC6, TBL1XR1, KHDRBS3, ZNF90, SOX12, TP53, NCOA7, UBE2I, ZFR, RBBP6, FOXR2, HIST2H2BE, CLIC4, HIPK3, TPPP, FOXC1, EIF5A2, MED1, BTAF1, BCLAF1, FKBP5, SCML2, TRA2B, PML, ZNF367, NR3C1, ZNF654, ZNF660, SF3B1, HIC2, BCL2, RB1CC1, POU2F1, MSI1, POU3F2, GTF3C2, TNPO2, NMD3, CHD3, SSRP1, NACC1, APPL1, SNAI2, SNAI1, SIRT1, ATXN7L3, PAPOLA, SON, BCORL1, SP4, ZBTB2, ID4, SH3D19, FAF1, NFIC, DUSP8, RNF111	0,0007886
GO:0051173~positive regulation of nitrogen compound metabolic process	40	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, NFKB1, ZEB1, RORA, CALR, SRF, HOXD10, IGF1R, BRPF1, MEIS2, NPM2, POU2F1, POU3F2, SHC1, CCNA2, ZNF423, EGFR, IRAK1, TBL1XR1, KLF12, TGFBR1, MTA2, SMAD4, TP53, SIX4, NR4A3, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, EBF2, FOXC1, NFIC, KLF4, MED1	0,0017615
GO:0045935~positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic process	39	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, NFKB1, ZEB1, RORA, CALR, SRF, HOXD10, IGF1R, BRPF1, MEIS2, NPM2, POU2F1, POU3F2, SHC1, CCNA2, ZNF423, TBL1XR1, IRAK1, KLF12, TGFBR1, MTA2, SMAD4, TP53, SIX4, NR4A3, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, EBF2, FOXC1, NFIC, KLF4, MED1	0,0018376
GO:0045449~regulation of transcription	112	CDX2, THRB, TLR2, NAA15, BBX, TLR4, RORA, ZNF253, HOXD10, ZFP91, BRPF1, CDKN2A, PHTF2, CCNA2, CCAR1, RREB1, MTA2, ZNF649, SIX4, PPARGC1A, ELL2, PA2G4, NME2, VGLL3, TGFBRAP1, PRDM2, TFAP2C, ERC1, SUV420H1, SUPT6H, MYBL1, MYBL2, CALR, SRF,	0,0021625

		MEIS1, MEIS2, DMD, HNRNPD, HOXA10, CREBL2, ZNF423, KLF12, TGFBR1, RFX7, KLF11, SMAD4, BRCA2, ZNF521, NR4A3, FOXP4, BRCA1, FOXP2, NOTCH2, NOTCH1, DMTF1, EBF2, JAZF1, TCF12, KLF4, NCOR2, PPARA, BACH2, ELF4, ZFP42, NR6A1, PAX6, DEK, NFKB1, ZEB1, CBFA2T3, BZW1, PCGF3, RHOA, ZNF540, IRAK2, TBL1XR1, IRAK1, KHDRBS3, ZNF90, SOX12, TP53, NCOA7, UBE2I, FLNA, FOXR2, HIPK3, FOXC1, MED1, BTAF1, BCLAF1, SCML2, PML, ZNF367, NR3C1, ZNF654, ZNF660, HIC2, RB1CC1, POU2F1, POU3F2, CHD3, SSRP1, NACC1, SNAI2, SIRT1, ATXN7L3, BCORL1, SP4, ID4, ZBTB2, NFIC, DNM2	
GO:0010628~positive regulation of gene expression	36	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, NFKB1, KIT, ZEB1, RORA, SRF, HOXD10, BRPF1, MEIS2, POU2F1, POU3F2, CCNA2, ZNF423, TBL1XR1, IRAK1, KLF12, TGFBR1, MTA2, SMAD4, TP53, NR4A3, SIX4, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, EBF2, FOXC1, NFIC, KLF4, MED1	0,0034838
GO:0006350~transcription	93	SCAF1, PPARA, BACH2, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, ZFP42, NAA15, PAX6, BBX, NFKB1, ZEB1, RORA, ZNF253, CBFA2T3, HOXD10, BZW1, ZFP91, BRPF1, PCGF3, CDKN2A, PHTF2, ZNF540, CCAR1, TBL1XR1, KHDRBS3, ZNF90, RREB1, SOX12, TP53, ZNF649, NCOA7, PPARGC1A, ELL2, FOXR2, PA2G4, NME2, HIPK3, VGLL3, FOXC1, PRDM2, TFAP2C, MED1, SUV420H1, SUPT6H, BCLAF1, SCML2, PML, ZNF367, NR3C1, MYBL1, ZNF654, MYBL2, SRF, MEIS1, ZNF660, HIC2, TROVE2, RB1CC1, HOXA10, POU2F1, HNRNPD, POU3F2, GTF3C2, ZNF423, CHD3, CREBL2, SSRP1, NACC1, KLF12, KLF11, SMAD4, ZNF521, NR4A3, SNAI2, FOXP4, SIRT1, ATXN7L3, FOXP2, NOTCH2, PAPOLA, NOTCH1, BCORL1, DMTF1, EBF2, SP4, JAZF1, ZBTB2, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0039425
GO:0045941~positive regulation of transcription	35	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, NFKB1, ZEB1, RORA, SRF, HOXD10, BRPF1, MEIS2, POU2F1, POU3F2, CCNA2, ZNF423, TBL1XR1, IRAK1, KLF12, TGFBR1, MTA2, SMAD4, TP53, NR4A3, SIX4, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, EBF2, FOXC1, NFIC, KLF4, MED1	0,0040929
GO:0003700~transcription factor activity	50	PPARA, CDX2, BACH2, THRB, ELF4, NR6A1, ZFP42, PAX6, NFKB1, RORA, ZEB1, CBFA2T3, HOXD10, CDKN2A, ZNF90, MTA2, TP53, SIX4, FOXR2, NME2, PA2G4, PRDM2, FOXC1, TFAP2C, SUPT6H, BTAF1, SCML2, ZNF367, NR3C1, MYBL2, SRF, MEIS1, MEIS2, POU2F1, HOXA10, POU3F2, CREBL2, ZNF423, KLF12, KLF11, SMAD4, NR4A3, FOXP4, FOXP2, NOTCH1, DMTF1, SP4, NFIC, TCF12, KLF4	0,0411494
GO:0016563~transcription activator activity	27	PPARA, ELF4, PML, ZEB1, MYBL1, BRPF1, BCL2, HNRNPD, POU2F1, ZNF423, TBL1XR1, IRAK1, RREB1, MTA2, SMAD4, BRCA2, NR4A3, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, NOTCH1, SP4, FOXC1, TCF12, KLF4, DNM2, MED1	0,0353155
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	25	PPARA, THRB, ELF4, PAX6, NFKB1, ZEB1, RORA, SRF, HOXD10, MEIS2, POU2F1, POU3F2, TBL1XR1, KLF12, MTA2, SMAD4, TP53, NR4A3, SIX4, PPARGC1A, NOTCH1, FOXC1, NFIC, KLF4, MED1	0,0114797
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-dependent	29	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, NFKB1, ZEB1, RORA, SRF, HOXD10, MEIS2, POU2F1, POU3F2, TBL1XR1, KLF12, MTA2, SMAD4, TP53, NR4A3, SIX4, PPARGC1A, ATXN7L3, BRCA1, NOTCH1, FOXC1, NFIC, KLF4, MED1	0,0171215
GO:0051254~positive regulation of RNA metabolic process	29	PPARA, CDX2, THRB, ELF4, PAX6, NAA15, NFKB1, ZEB1, RORA, SRF, HOXD10, MEIS2, POU2F1, POU3F2, TBL1XR1, KLF12, MTA2, SMAD4, TP53, NR4A3, SIX4, PPARGC1A, ATXN7L3, BRCA1, NOTCH1, FOXC1, NFIC, KLF4, MED1	0,0192325



GO:0003677~DNA binding	97	CDX2, THRB, PRR12, BBX, RBM6, RORA, ZNF253, HOXD10, ZFP91, BRPF1, CDKN2A, PHTF2, EGFR, RREB1, MTA2, ZNF649, SIX4, PPARGC1A, TOX3, HNRNPU, PA2G4, NME2, PRDM2, TFAP2C, XRN1, SUPT6H, MYBL1, MYBL2, CALR, SRF, MEIS1, MEIS2, HOXA10, HNRNPD, STRBP, CREBL2, ZNF423, KLF12, SMG6, KLF11, RFX7, SMAD4, BRCA2, ZNF521, NR4A3, FOXP4, BRCA1, FOXP2, DNASE2, NOTCH1, DMTF1, EBF2, TCF12, NCOR2, KLF4, PPARA, KIF22, BACH2, ELF4, ZFP42, NR6A1, PAX6, DEK, NFKB1, ZEB1, CBFA2T3, ZNF540, TBL1XR1, ZNF90, SOX12, TP53, ZFR, FOXR2, HIST2H2BE, FOXC1, MED1, BTAF1, BCLAF1, SCML2, PML, ZNF367, NR3C1, ZNF654, ZNF660, HIC2, SOS1, POU2F1, POU3F2, GTF3C2, CHD3, SSRP1, SNAI2, SNAI1, SON, SP4, ZBTB2, NFIC	0,0661696
GO:0043565~sequence-specific DNA binding	34	PPARA, CDX2, BACH2, THRB, ELF4, NR6A1, PAX6, NFKB1, ZEB1, NR3C1, RORA, SRF, MEIS1, HOXD10, MEIS2, HNRNPD, POU2F1, HOXA10, POU3F2, CREBL2, TBL1XR1, SMG6, MTA2, SMAD4, TP53, SIX4, NR4A3, FOXP4, FOXR2, FOXP2, NOTCH1, FOXC1, TCF12, KLF4	0,0702640
GO:0006355~regulation of transcription, DNA-dependent	74	PPARA, BACH2, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, NAA15, PAX6, NFKB1, DEK, RORA, ZEB1, ZNF253, CBFA2T3, HOXD10, CDKN2A, RHOA, ZNF540, TBL1XR1, ZNF90, RREB1, MTA2, SOX12, TP53, ZNF649, UBE2I, SIX4, PPARGC1A, FOXR2, PA2G4, NME2, FOXC1, PRDM2, TFAP2C, ERC1, MED1, SUPT6H, ZNF367, MYBL1, NR3C1, CALR, SRF, MEIS1, HIC2, MEIS2, HOXA10, POU2F1, HNRNPD, POU3F2, CHD3, CREBL2, KLF12, RFX7, KLF11, SMAD4, BRCA2, NR4A3, SNAI2, FOXP4, SIRT1, ATXN7L3, BRCA1, FOXP2, NOTCH2, NOTCH1, DMTF1, EBF2, SP4, JAZF1, ID4, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0547518
GO:0051252~regulation of RNA metabolic process	75	PPARA, BACH2, CDX2, THRB, ELF4, NR6A1, NAA15, PAX6, NFKB1, DEK, ZEB1, RORA, ZNF253, CBFA2T3, HOXD10, CDKN2A, RHOA, ZNF540, TBL1XR1, ZNF90, RREB1, MTA2, SOX12, TP53, ZNF649, UBE2I, SIX4, PPARGC1A, HNRNPU, FOXR2, PA2G4, NME2, FOXC1, PRDM2, TFAP2C, ERC1, MED1, SUPT6H, ZNF367, MYBL1, NR3C1, CALR, SRF, MEIS1, HIC2, MEIS2, HOXA10, POU2F1, HNRNPD, POU3F2, CHD3, CREBL2, KLF12, RFX7, KLF11, SMAD4, BRCA2, NR4A3, SNAI2, FOXP4, SIRT1, ATXN7L3, BRCA1, FOXP2, NOTCH2, NOTCH1, DMTF1, EBF2, SP4, JAZF1, ID4, NFIC, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0618061
Cluster 4 - Enrichment Score: 4,119877			
GO:0008361~regulation of cell size	22	FGFR3, TGFBR1, TP53, SMAD4, PML, MUL1, SOCS5, GREM1, CCNG1, NTN1, ATP2B2, NOTCH2, ZFP91, CDKN1A, CDKN2A, NDRG3, CXCL16, CDKN2AIP, RB1CC1, BCL2, DCUN1D3, SLC9A1	0,0003145
GO:0032535~regulation of cellular component size	24	FGFR3, TGFBR1, TP53, SMAD4, PML, MUL1, SOCS5, GREM1, CCNG1, NTN1, ARPC1A, ATP2B2, NOTCH2, ZFP91, CDKN1A, CDKN2A, NDRG3, CXCL16, CDKN2AIP, RB1CC1, BCL2, RAC1, DCUN1D3, SLC9A1	0,0011282
GO:0030308~negative regulation of cell growth	12	CDKN1A, CDKN2A, NDRG3, BCL2, CDKN2AIP, PML, SMAD4, TP53, MUL1, DCUN1D3, GREM1, NTN1	0,0041050
GO:0045792~negative regulation of cell size	12	CDKN1A, CDKN2A, NDRG3, BCL2, CDKN2AIP, PML, SMAD4, TP53, MUL1, DCUN1D3, GREM1, NTN1	0,0069562

GO:0040008~regulation of growth	24	TGFBR1, TGFBR2, TP53, SMAD4, PML, MUL1, SOCS5, GREM1, CXADR, NTN1, BCL2L11, NRCAM, ZFP91, UBE2E3, CDKN1A, CDKN2A, NDRG3, CXCL16, CDKN2AIP, BCL2, POU3F2, FOXC1, SHC1, DCUN1D3	0,0091658
GO:0045926~negative regulation of growth	12	CDKN1A, CDKN2A, NDRG3, BCL2, CDKN2AIP, PML, SMAD4, TP53, MUL1, DCUN1D3, GREM1, NTN1	0,0144128
GO:0001558~regulation of cell growth	16	TGFBR1, TP53, SMAD4, PML, MUL1, GREM1, NTN1, NRCAM, ZFP91, CDKN1A, CDKN2A, NDRG3, CXCL16, CDKN2AIP, BCL2, DCUN1D3	0,0211964
Cluster 5 - Enrichment Score: 3,996915			
GO:0048667~cell morphogenesis involved in neuron differentiation	20	NRP2, WNT3A, PAX6, CELSR3, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, ATP2B2, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, CXCR4, CLIC5, BCL2, RAC1, NUMB, NGFR, SNAP25	0,0015093
GO:0048812~neuron projection morphogenesis	20	EGFR, NRP2, WNT3A, PAX6, CELSR3, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, CXCR4, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, NGFR, SNAP25	0,0017975
GO:0030182~neuron differentiation	31	NRP2, SEPT2, WNT3A, PAX6, RORA, SRF, HOXD10, NRCAM, ALCAM, ATP2B2, ZFP91, IGF1R, BDNF, CXCR4, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, POU3F2, SNAP25, EGFR, TGFBR1, SMAD4, CELSR3, NTN1, SLIT3, NOTCH1, SLITRK4, CLIC5, ID4, NGFR	0,0017651
GO:0032990~cell part morphogenesis	22	EGFR, NRP2, COX10, WNT3A, PAX6, CELSR3, MUL1, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, CXCR4, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, NGFR, SNAP25	0,0019510
GO:0048666~neuron development	26	NRP2, SEPT2, WNT3A, PAX6, SRF, HOXD10, NRCAM, ALCAM, IGF1R, ZFP91, ATP2B2, BDNF, CXCR4, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, SNAP25, EGFR, CELSR3, NTN1, SLIT3, NOTCH1, SLITRK4, CLIC5, NGFR	0,0020470
GO:0000904~cell morphogenesis involved in differentiation	21	NRP2, WNT3A, PAX6, CELSR3, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, ATP2B2, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, CXCR4, CLIC5, BCL2, RAC1, NUMB, NGFR, LAMC1, SNAP25	0,0026631
GO:0007409~axonogenesis	18	NRP2, WNT3A, PAX6, CELSR3, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, CXCR4, BCL2, RAC1, NUMB, NGFR, SNAP25	0,0034542
GO:0031175~neuron projection development	21	EGFR, NRP2, SEPT2, WNT3A, PAX6, CELSR3, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, CXCR4, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, NGFR, SNAP25	0,0041698
GO:0048858~cell projection morphogenesis	20	EGFR, NRP2, WNT3A, PAX6, CELSR3, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, CXCR4, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, NGFR, SNAP25	0,0061322
GO:0032989~cellular component morphogenesis	27	NRP2, COX10, WNT3A, PAX6, NRCAM, ALCAM, ATP2B2, IGF1R, BDNF, EZR, CXCR4, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, RHOA, SNAP25, EGFR, CELSR3, MUL1, NTN1, SLIT3, NOTCH1, SLITRK4, CLIC5, NGFR, LAMC1	0,0064783
GO:0000902~cell morphogenesis	25	EGFR, NRP2, WNT3A, PAX6, CELSR3, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, ATP2B2, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, EZR, CXCR4, CLIC5, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, RHOA, NGFR, LAMC1, SNAP25	0,0071883
GO:0030030~cell projection organization	25	EGFR, NRP2, CCDC88A, SEPT2, ROCK1, WNT3A, PAX6, CELSR3, NTN1, SLIT3, NRCAM, ALCAM, ATP2B2, IGF1R, SLITRK4, NOTCH1, BDNF, CXCR4, CLIC5, DMD, BCL2, RAC1, NUMB, NGFR, SNAP25	0,0107583
GO:0007411~axon guidance	9	NRP2, ALCAM, BDNF, CXCR4, RAC1, PAX6, NGFR, NTN1, SLIT3	0,1847677

Cluster 6 - Enrichment Score:  
3,723315

GO:0005626~insoluble fraction	45	NRP2, SEPT2, GCNT2, CADM1, SLC20A2, ADCY6, PTGS1, PML, FKBP1A, CALR, SYP, ATP2B2, IGF1R, BCL2, DMD, CYP7A1, RAC1, ELOVL2, SNPH, ACSL4, PLCB1, TRAF6, SLC4A3, NT5E, FRS2, SNAP25, SLC12A6, RAB8B, MAN1A2, CLCC1, TP53, CELSR3, GRIA3, APPL1, BCL2L11, ITPR1, SLIT3, NME2, H6PD, SLC7A2, IGF2R, CLIC5, CNTN1, VAMP2, SLC9A1	0,0039856
GO:0000267~cell fraction	51	NRP2, SEPT2, CADM1, SLC20A2, ADCY6, PTGS1, SYP, ATP2B2, GSR, CYP7A1, ELOVL2, SNPH, FAS, PLCB1, NT5E, FRS2, SLC4A3, SLC12A6, MAN1A2, TP53, BCL2L11, SLIT3, NME2, CLIC4, CD40LG, H6PD, TPPP, CLIC5, IGF2R, CNTN1, VAMP2, YWHAZ, GCNT2, PML, FKBP1A, CALR, IGF1R, BCL2, DMD, RAC1, ACSL4, TRAF6, SNAP25, RAB8B, CLCC1, CELSR3, GRIA3, APPL1, ITPR1, SLC7A2, SLC9A1	0,0127010
GO:0005624~membrane fraction	41	NRP2, GCNT2, SEPT2, CADM1, SLC20A2, ADCY6, PTGS1, FKBP1A, CALR, SYP, ATP2B2, IGF1R, CYP7A1, DMD, BCL2, RAC1, ELOVL2, SNPH, ACSL4, PLCB1, TRAF6, SLC4A3, NT5E, FRS2, SNAP25, SLC12A6, MAN1A2, CLCC1, CELSR3, GRIA3, APPL1, ITPR1, BCL2L11, SLIT3, NME2, H6PD, SLC7A2, IGF2R, CNTN1, VAMP2, SLC9A1	0,0116162

Cluster 7 - Enrichment Score:  
3,597052

GO:0045596~negative regulation of cell differentiation	24	PPARA, CDX2, TGFBR1, NF1, TP53, PAX6, TLR4, KIT, SOCS5, ZEB1, CALR, NTN1, SIRT1, NOTCH2, ZFP91, NME2, NOTCH1, BDNF, RHOA, GDF11, ID4, NGFR, KLF4, RC3H1	0,0000979
GO:0051960~regulation of nervous system development	21	NF1, NLGN1, TP53, PAX6, KIT, CDH2, CALR, NTN1, NRCAM, ZFP91, NOTCH1, BDNF, TIAM1, BCL2, NUMB, RHOA, POU3F2, ID4, NGFR, SNAP25, EIF2AK3	0,0003629
GO:0050767~regulation of neurogenesis	19	NF1, NLGN1, TP53, PAX6, KIT, CDH2, CALR, NTN1, NRCAM, ZFP91, NOTCH1, BDNF, TIAM1, BCL2, NUMB, RHOA, POU3F2, ID4, NGFR	0,0006270
GO:0045664~regulation of neuron differentiation	16	NLGN1, PAX6, CDH2, CALR, NTN1, NRCAM, ZFP91, NOTCH1, BDNF, TIAM1, BCL2, NUMB, RHOA, POU3F2, ID4, NGFR	0,0012172
GO:0060284~regulation of cell development	20	NF1, NLGN1, TP53, SMAD4, PAX6, KIT, CDH2, CALR, NTN1, NRCAM, ZFP91, NOTCH1, BDNF, TIAM1, BCL2, NUMB, RHOA, POU3F2, ID4, NGFR	0,0012666
GO:0045597~positive regulation of cell differentiation	21	CDX2, THRB, TGFBR2, SMAD4, PAX6, NFKB1, KIT, SOCS5, SRF, NTN1, NRCAM, ZFP91, NME2, NOTCH1, BDNF, TIAM1, BCL2, NUMB, RHOA, CAMK1, NGFR	0,0015935
GO:0051130~positive regulation of cellular component organization	18	TGFBR1, SMAD4, PML, APOC2, KIT, CALR, SRF, PPARGC1A, NTN1, ZFP91, TIAM1, TPPP, NUMB, RAC1, RHOA, FAF1, NGFR, EIF5A2	0,0019885
GO:0010720~positive regulation of cell development	11	ZFP91, NOTCH1, TIAM1, BCL2, NUMB, RHOA, PAX6, SMAD4, KIT, NGFR, NTN1	0,0021817
GO:0031346~positive regulation of cell projection organization	9	ZFP91, TIAM1, TGFBR1, NUMB, RAC1, RHOA, KIT, NGFR, NTN1	0,0035164
GO:0031344~regulation of cell projection organization	12	NRCAM, ZFP91, TIAM1, TGFBR1, NUMB, RAC1, RHOA, POU3F2, KIT, NGFR, CDH2, NTN1	0,0034091
GO:0051094~positive regulation of developmental process	21	CDX2, THRB, TGFBR2, SMAD4, PAX6, NFKB1, KIT, SOCS5, SRF, NTN1, NRCAM, ZFP91, NME2, NOTCH1, BDNF, TIAM1, BCL2, NUMB, RHOA, CAMK1, NGFR	0,0096938

GO:0050769~positive regulation of neurogenesis	9	ZFP91, NOTCH1, TIAM1, NUMB, RHOA, PAX6, KIT, NGFR, NTN1	0,0115157
GO:0010769~regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	10	NRCAM, ZFP91, TIAM1, NUMB, RHOA, SMAD4, POU3F2, NGFR, CDH2, NTN1	0,0147801
GO:0010975~regulation of neuron projection development	9	NRCAM, ZFP91, TIAM1, NUMB, RHOA, POU3F2, NGFR, CDH2, NTN1	0,0293886
GO:0050770~regulation of axonogenesis	8	NRCAM, ZFP91, TIAM1, RHOA, POU3F2, NGFR, CDH2, NTN1	0,0362622
GO:0022604~regulation of cell morphogenesis	12	NRCAM, ALDOA, ZFP91, EZR, TIAM1, NUMB, RHOA, SMAD4, POU3F2, NGFR, CDH2, NTN1	0,0422311
GO:0045665~negative regulation of neuron differentiation	6	ZFP91, NOTCH1, RHOA, PAX6, ID4, CALR	0,0533476
GO:0050772~positive regulation of axonogenesis	5	ZFP91, TIAM1, RHOA, NGFR, NTN1	0,0938521
GO:0050771~negative regulation of axonogenesis	3	RHOA, NGFR, NTN1	0,6986504
GO:0031345~negative regulation of cell projection organization	3	RHOA, NGFR, NTN1	0,7532896
GO:0051129~negative regulation of cellular component organization	7	RAC1, RHOA, APOC2, NGFR, MAPRE1, NTN1, BRCA1	0,8124174
Cluster 8 - Enrichment Score: 3,1698553			
GO:0005654~nucleoplasm	47	CDX2, MCL1, ELF4, NR6A1, PML, NAA15, INTS2, NFKB1, ZEB1, CBFA2T3, SF3B1, BRPF1, CDKN2A, NUP50, HOXA10, POU2F1, POU3F2, GTF3C2, CCNA2, NMD3, CHD3, SSRP1, CDC6, TBL1XR1, NACC1, RREB1, MTA2, SMAD4, TP53, BRCA2, UBE2I, APPL1, SIRT1, PPARGC1A, BRCA1, ATXN7L3, ELL2, SON, CDKN1A, CDKN2AIP, JAZF1, CALM3, NGFR, TCF12, KLF4, NCOR2, MED1	0,0050505
GO:0031981~nuclear lumen	67	KDM6A, CDX2, SEPT2, ELF4, NR6A1, NAA15, INTS2, NFKB1, ZEB1, CBFA2T3, BRPF1, CDKN2A, ZNF540, CCNA2, TBL1XR1, CDC6, KHDRBS3, RREB1, MTA2, TP53, UBE2I, ZFR, RBBP6, PPARGC1A, ELL2, PA2G4, NGFR, MED1, MCL1, TXN2, PML, MYBL1, NR3C1, KIT, SRF, DAZAP1, SF3B1, MEIS2, NUP50, HOXA10, POU2F1, POU3F2, GTF3C2, NOVA1, NMD3, CHD3, SSRP1, NACC1, SMG6, SMAD4, BRCA2, APPL1, FOXP4, SIRT1, ITPR1, ATXN7L3, BRCA1, PAPOLA, SON, CDKN1A, CDKN2AIP, JAZF1, CALM3, SH3D19, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0035802
GO:0044451~nucleoplasm part	32	CDX2, ELF4, NR6A1, PML, NAA15, INTS2, ZEB1, SF3B1, BRPF1, POU2F1, HOXA10, POU3F2, GTF3C2, CHD3, TBL1XR1, NACC1, RREB1, MTA2, SMAD4, TP53, UBE2I, APPL1, SIRT1, PPARGC1A, ATXN7L3, ELL2, SON, JAZF1, TCF12, KLF4, NCOR2, MED1	0,0101943
GO:0070013~intracellular organelle lumen	72	KDM6A, CDX2, SEPT2, ELF4, NR6A1, NAA15, INTS2, NFKB1, ZEB1, CBFA2T3, BRPF1, CDKN2A, P4HA1, ZNF540, CCNA2, TBL1XR1, CDC6, KHDRBS3, RREB1, MTA2, TP53, UBE2I,	0,0261367

		ZFR, PPARGC1A, RBBP6, ELL2, PA2G4, H6PD, PPM1K, NGFR, MED1, MCL1, TXN2, PML, MYBL1, NR3C1, KIT, CALR, SRF, DAZAP1, SF3B1, MEIS2, NUP50, HOXA10, POU2F1, POU3F2, GTF3C2, NOVA1, CHD3, NMD3, SSRP1, NACC1, SMG6, SMAD4, GOLIM4, BRCA2, APPL1, FOXP4, SIRT1, ITPR1, ATXN7L3, BRCA1, PAPOLA, SON, CDKN1A, CDKN2AIP, JAZF1, CALM3, SH3D19, TCF12, NCOR2, KLF4	
GO:0043233~organelle lumen	72	KDM6A, CDX2, SEPT2, ELF4, NR6A1, NAA15, INTS2, NFKB1, ZEB1, CBFA2T3, BRPF1, CDKN2A, P4HA1, ZNF540, CCNA2, TBL1XR1, CDC6, KHDRBS3, RREB1, MTA2, TP53, UBE2I, ZFR, PPARGC1A, RBBP6, ELL2, PA2G4, H6PD, PPM1K, NGFR, MED1, MCL1, TXN2, PML, MYBL1, NR3C1, KIT, CALR, SRF, DAZAP1, SF3B1, MEIS2, NUP50, HOXA10, POU2F1, POU3F2, GTF3C2, NOVA1, CHD3, NMD3, SSRP1, NACC1, SMG6, SMAD4, GOLIM4, BRCA2, APPL1, FOXP4, SIRT1, ITPR1, ATXN7L3, BRCA1, PAPOLA, SON, CDKN1A, CDKN2AIP, JAZF1, CALM3, SH3D19, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0374980
GO:0031974~membrane-enclosed lumen	73	KDM6A, CDX2, SEPT2, ELF4, NR6A1, NAA15, INTS2, NFKB1, ZEB1, CBFA2T3, BRPF1, CDKN2A, P4HA1, ZNF540, CCNA2, TBL1XR1, CDC6, KHDRBS3, RREB1, MTA2, TP53, UBE2I, ZFR, PPARGC1A, RBBP6, ELL2, PA2G4, H6PD, PPM1K, IGF2R, NGFR, MED1, MCL1, TXN2, PML, MYBL1, NR3C1, KIT, CALR, SRF, DAZAP1, SF3B1, MEIS2, NUP50, HOXA10, POU2F1, POU3F2, GTF3C2, NOVA1, CHD3, NMD3, SSRP1, NACC1, SMG6, SMAD4, GOLIM4, BRCA2, APPL1, FOXP4, SIRT1, ITPR1, ATXN7L3, BRCA1, PAPOLA, SON, CDKN1A, CDKN2AIP, JAZF1, CALM3, SH3D19, TCF12, NCOR2, KLF4	0,0373429
GO:0005730~nucleolus	31	KDM6A, SEPT2, TXN2, PML, KIT, NR3C1, MYBL1, CBFA2T3, SRF, DAZAP1, MEIS2, CDKN2A, ZNF540, NOVA1, NMD3, NACC1, KHDRBS3, SMG6, MTA2, TP53, SIRT1, ZFR, FOXP4, RBBP6, ITPR1, PAPOLA, PA2G4, CDKN2AIP, SH3D19, NCOR2, KLF4	0,1267692
Cluster 9 - Enrichment Score: 3,043012			
GO:0016192~vesicle-mediated transport	37	PACS1, YWHAZ, RIMS4, HOOK3, SYP, AP1S3, AP1S1, AP1S2, AP3M1, ACTR1A, RAC1, SNPH, SEC22C, SNAP25, SEC24D, RHOBTB3, FAM160A2, TGFBR2, NLGN1, MON2, FLNA, CORO1C, NME2, AP2A2, GAPVD1, FNBP1L, STXBP5, IGF2R, CXCL16, ARCN1, RAB22A, YIPF5, SH3D19, VAMP2, ERC1, GGA2, DNM2	0,0018360
GO:0016044~membrane organization	25	NRCAM, AP1S3, SYP, AP1S1, AP1S2, BCL2, RAC1, SEC24D, EGFR, CCDC88A, TGFBR2, TP53, REEP1, CORO1C, AP2A2, NME2, GAPVD1, FNBP1L, CXCL16, IGF2R, ARCN1, RAB22A, SH3D19, VAMP2, DNM2	0,0160333
GO:0006897~endocytosis	15	TGFBR2, AP1S3, CORO1C, SYP, AP2A2, NME2, AP1S1, AP1S2, GAPVD1, FNBP1L, CXCL16, IGF2R, RAB22A, RAC1, DNM2	0,1006163
GO:0010324~membrane invagination	15	TGFBR2, AP1S3, CORO1C, SYP, AP2A2, NME2, AP1S1, AP1S2, GAPVD1, FNBP1L, CXCL16, IGF2R, RAB22A, RAC1, DNM2	0,1006163

Cluster 10 - Enrichment Score:  
3,0075646

hsa05200:Pathways in cancer	26	FGFR3, WNT3A, PML, NFKB1, KIT, IGF1R, CDKN2A, BCL2, SOS1, RAC1, RHOA, FAS, TRAF6, EGFR, IL8, TGFBR1, TGFBR2, SMAD4, TP53, BRCA2, FADD, APPL1, BIRC2, CCDC6, CDKN1A, LAMC1	0,0084127
hsa05210:Colorectal cancer	10	EGFR, IGF1R, BCL2, SOS1, TGFBR1, TGFBR2, RAC1, SMAD4, TP53, APPL1	0,0937411
hsa05212:Pancreatic cancer	9	EGFR, CDKN2A, TGFBR1, TGFBR2, RAC1, SMAD4, TP53, BRCA2, NFKB1	0,0973067
Cluster 10 - Enrichment Score: 2,9346208			
GO:0051174~regulation of phosphorus metabolic process	33	CDK5R2, ADCY6, TLR4, FKBP1A, KIT, CCNG1, ZFP91, DUSP19, CDKN2A, CXCR4, BCL2, RB1CC1, RAC1, SHC1, SPRED1, TRAF6, FRS2, EGFR, CDC6, IRAK1, CCDC88A, SMG6, TGFBR1, NF1, TGFBR2, SMAD4, MUL1, CDKN3, GRM4, SPAG9, CDKN1A, HIPK3, DUSP8	0,0017924
GO:0019220~regulation of phosphate metabolic process	33	CDK5R2, ADCY6, TLR4, FKBP1A, KIT, CCNG1, ZFP91, DUSP19, CDKN2A, CXCR4, BCL2, RB1CC1, RAC1, SHC1, SPRED1, TRAF6, FRS2, EGFR, CDC6, IRAK1, CCDC88A, SMG6, TGFBR1, NF1, TGFBR2, SMAD4, MUL1, CDKN3, GRM4, SPAG9, CDKN1A, HIPK3, DUSP8	0,0017924
GO:0042325~regulation of phosphorylation	32	CDK5R2, ADCY6, FKBP1A, TLR4, KIT, CCNG1, ZFP91, DUSP19, CDKN2A, CXCR4, BCL2, RB1CC1, RAC1, SHC1, SPRED1, TRAF6, FRS2, EGFR, CDC6, IRAK1, CCDC88A, TGFBR1, NF1, TGFBR2, SMAD4, MUL1, CDKN3, GRM4, SPAG9, CDKN1A, HIPK3, DUSP8	0,0019275
GO:0051338~regulation of transferase activity	27	CDK5R2, ADCY6, KIT, CCNG1, SERINC5, DUSP19, CDKN2A, CXCR4, RAC1, SHC1, SPRED1, TRAF6, FRS2, EGFR, CDC6, IRAK1, CCDC88A, TGFBR1, NF1, TGFBR2, MUL1, CDKN3, GRM4, SPAG9, CDKN1A, HIPK3, DUSP8	0,0031767
GO:0043549~regulation of kinase activity	26	CDK5R2, ADCY6, KIT, CCNG1, DUSP19, CDKN2A, CXCR4, RAC1, SHC1, SPRED1, TRAF6, FRS2, EGFR, CDC6, IRAK1, CCDC88A, TGFBR1, NF1, TGFBR2, MUL1, CDKN3, GRM4, SPAG9, CDKN1A, HIPK3, DUSP8	0,0036793
GO:0045859~regulation of protein kinase activity	25	CDK5R2, ADCY6, KIT, CCNG1, DUSP19, CDKN2A, CXCR4, SHC1, SPRED1, TRAF6, FRS2, EGFR, CDC6, IRAK1, CCDC88A, TGFBR1, TGFBR2, NF1, MUL1, CDKN3, GRM4, SPAG9, CDKN1A, HIPK3, DUSP8	0,0051128
GO:0007243~protein kinase cascade	26	FGFR3, TLR2, MKNK2, TLR4, KIT, IGF1R, TMED7, DUSP19, CXCR4, RB1CC1, SHC1, SPRED1, TRAF6, FRS2, IRAK2, EGFR, IRAK1, TGFBR1, NF1, MUL1, SPAG9, GRM4, FAF1, ERC1, DUSP8, SLC9A1	0,0057762
GO:0044093~positive regulation of molecular function	34	ADCY6, GNG13, PML, TLR2, APOC2, TLR4, FKBP1A, KIT, SLC11A2, SERINC5, CDKN2A, CXCR4, BCL2, NPM2, RAC1, TGM2, SHC1, TRAF6, FRS2, IRAK2, EGFR, IRAK1, CCDC88A, TGFBR1, NF1, TGFBR2, TP53, MUL1, GRM4, SPAG9, NME2, CALM3, ERC1, EIF2AK3	0,0126331
GO:0043405~regulation of MAP kinase activity	13	EGFR, NF1, MUL1, KIT, SPAG9, GRM4, DUSP19, CXCR4, HIPK3, SHC1, SPRED1, DUSP8, FRS2	0,0289690

## ANEXO 1

Artigo referente à Tese de doutorado, que foi submetido à BMC Genome Biology (Qualis A1, fator de impacto: 11.31), com indicação para edição especial “Biology of Human Diseases”.

### **Hepatic miRNA profile might regulate apoptosis, vascular injury and inflammation in dengue hemorrhagic fever**

#### **Authors, institution:**

Layanna Freitas de Oliveira, Universidade Federal do Pará, Instituto Evandro Chagas.

João Vianez, Instituto Evandro Chagas.

Jedson Cardoso, Instituto Evandro Chagas.

André Teles, Universidade Federal do Pará.

Carla Pagliari, Universidade de São Paulo.

Taiana Silveira, Universidade de São Paulo.

Janaína Vasconcelos, Instituto Evandro Chagas.

Rodrigo Santos de Oliveira, Instituto Evandro Chagas.

Caroline Aquino, Universidade Federal do Ceará.

Rommel Burbano, Universidade Federal do Pará.

Eduardo Santos, Universidade Federal do Pará.

Márcio Nunes, Instituto Evandro Chagas.

#### **Abstract**

**Background:** Dengue is the most prevalent arbovirolosis in the world. It is caused by *Dengue virus* (DENV) and can often be fatal by causing dengue hemorrhagic fever (DHF). The liver is one of the most important tissues in DHF, due its intense viral replication and role in metabolism. The study of microRNAs (miRNA) during infection is crucial to understand the regulatory mechanisms of DENV infection, and can help in diagnostic and in the development of anti-viral therapies. We sequenced the miRNoma of ten fatal cases and five controls that died with no infections, to characterize the miRNAs expression profile of the human formalin fixed paraffin embedded liver tissue during DHF., ten DHF fatal cases were compared to five control cases.

**Results:** Eight miRNAs were differentially expressed: miR-126-5p (logFC 3.09;  $p < 0,001$ ), a regulatory molecule of endothelial cells, and miR-133a-3p (100-fold,  $p < 0,001$ ) were upregulated in DHF and miR-122-5p (a liver-specific miRNA; 100-fold,  $p < 0,001$ ), miR-146a-5p (Interferon regulator; logFC-2.6;  $p < 0,05$ ), miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-148a-5p ( $p < 0,01$ ) and miR-423-5p ( $p < 0,05$ ) were downregulated. Enrichment analysis of KEGG pathways and GO terms with predicted target genes of overexpressed miRNAs revealed regulatory pathways of apoptosis (*MAPK*, *RAS*, *CDK* and *FAS*) and immune response pathways (NF- $\kappa$ B, CC and CX families, IL and TLR). The enrichment analysis using target genes of downregulated miRNAs in DHF also identified in most pathways of apoptosis and biosynthetic pathways.

**Conclusions:** This is the first description of the human liver miRNA profile in DHF. Results showed a significant relationship of miR-126-5p, miR-122-5p and miR-146a-5p with DHF liver pathogenesis, involving endothelial repair and vascular permeability regulation, control of homeostasis and expression of inflammatory cytokines.

## Background

Dengue is the most prevalent arbovirus among humans, being caused by four serotypes of *Dengue virus* (DENV). The symptoms are primarily fever, arthralgia, myalgia, and rash. DENV is transmitted by *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes, which are widely distributed around the world. Present on every continent, the disease is endemic in more than 100 countries and about 300 million people worldwide are infected with *Dengue virus* each year, from which 25% develop dengue [1].

The clinical manifestations vary from milder forms, called Classical Dengue, to severe Dengue Hemorrhagic Fever (DHF), characterized by plasma leakage syndrome that can often lead to death. The factors leading to the development of asymptomatic infections or disease with different severity levels are still active targets of research, the cause of clinical differences might be in part due viral replication and mainly because the host response against viruses [2,3].

DENV cause injury in various organs and the liver is the most affected. Hepatic tissue is a site of intense replication and contributes significantly to the increase in viral load that occurs primarily in hepatocytes, with Kupffer cells being the most affected cell type during infection [4,5]. The most important changes in the liver during dengue are mediated by apoptosis and necrosis of hepatocytes [6]. In the histopathologic analysis of fatal cases was found edema, damage caused by metabolism and inflammatory reactions, steatosis and hyperplasia [7]. It is believed that hepatic inflammation develops for the purpose of protecting hepatocytes from damage, promoting tissue repair and reestablishing homeostasis [8].

Infection and inflammation in liver leads to development of an environment with multiple cells expressing IL-6 and TGF-beta, which may be related to apoptosis of hepatocytes [6]. Both IL-6 and TGF-beta are cytokines with key roles in inflammation and are probably associated to increased vascular permeability, plasma extravasation and consequent worsening of the symptoms of dengue [6]. In severe cases of dengue, unlike the effect in the first days of infection, it was observed an increased expression of pro inflammatory and vasoactive cytokines as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 IL-10, CCL2 (MCP-1) and CCL5 [9].

During the immune system action in infections, there is an increase in communication among cells and intense modification of the cytoplasmic microenvironment. The microRNAs (miRNA) are RNA molecules that act in this scenario through RNA interference (RNAi), regulating gene expression in order to develop protection against the infectious agent. The miRNAs are ~22 pb single-stranded molecules that associate to RNA-induced silencing complex (RISC). Gene expression regulation by miRNAs is achieved by binding to the RISC region between the base 2 and



8, called seed region and its target is miRNA recognition element (MRE) in the 3' UTR of mRNA [10]. The miRNAs can be used as biomarkers, disease therapy and are extremely useful in elucidating the pathogenic mechanisms.

The regulation by RNAi in dengue play a very important role; NS3 protein of DENV can interact with heat shock proteins and disrupt the formation of RISC preventing damper action of the compound [11]. Was also reported that miRNA transcription can be regulated by viral stimulation, as in the case of Epstein-Barr virus induces the expression of miR-146a through NF- $\kappa$ B pathway, inducing IFN suppression [12]. The DENV NS4B protein was also identified as a potent suppressor of RNAi by interfering in virus replicative capacity and with host RNAi pathways modulation [13].

The miR-146a has featured among regulatory miRNAs of the immune system. Its upregulation has been associated with increased replication of HCV, HBV and arboviruses as DENV and Japanese encephalitis virus, by negative regulation of interferon [14–17]. On the other hand, miR-146a-5p was found under-expressed in the serum of individuals in the viremic phase of dengue. In liver profiles, miR-122 has the highest levels, its liver specific and related to the maintenance of homeostasis, lipid, glucose and iron metabolism. miR-122 is strongly associated with liver diseases such as infections, steatohepatitis not alcoholic, fibrosis and cancer, has overall effects on both protection and the progression of the disease, depending on the etiology and cell type involved [18–25].

Thus, the aim of this study was to characterize the differential miRNA expression profile of human liver tissue from fatal cases of DHF and propose the regulatory mechanisms of these molecules in metabolic pathways related to the pathogenesis of the disease.

## **Results**

### *Sequencing*

All 15 sequenced libraries generated 77,367,198 reads in three runs on MiSeq (Illumina). Each library generated an average of 5,157,813 reads. After processing the raw data to remove adapters and sequences with N, the mean per sample was 2,724,497 reads suitable for the following analysis; in all samples, the highest frequency of read size was 22nt, consistent with the size relating to the most mature microRNAs (Table 1).

### *miRNA expression*

The reads dataset was mapped to the human miRNA database on miRBase v21 (containing 2588 mature miRNAs and 1881 precursors hairpins). We selected miRNAs with 18 to 26nt length, and an average of 0.88% of filtered reads was miRNA sequences, from those, 1129 mature miRNAs and 52 possible new miRNAs were identified, however, we do not perform novel miRNAs prediction. The top 30 highly expressed miRNAs in each group are detailed in Table 2, with expression values normalized in CPM

(counts per million). The miR-122-5p, specific of liver, has a high expression in control samples and it was not found among the top 30 DHF highly expressed miRNAs. In contrast, miR-143-3p was highly expressed in DHF samples group, and also appears in fifth position of control list with similar CPM values (CPM=93,950.57 and 96,662.51, respectively). Among highly expressed ones, we could detect the large number of 5p miRNAs, which is a complementary sequence to 3p sequence guide. Currently is known that 5p sequences could be functional and researchers around the world have been identified and analyzed their cellular effects.

#### *Differential Expression Analysis: DHF and Control samples*

Differential expression analysis was performed with edgeR package, aiming to define if the observed differences in miRNA expression between two groups of samples would be statistically significant. At this step, we excluded miRNAs that had less than five reads of coverage.

First, we performed analysis including all samples: ten DHF and five controls. This arrangement shows a substructure problem due to the large difference of ages among DHF samples, which are composed of very young and old people (19-62 years). On the other hand, in control samples we observed a highest homogeneity of ages (44-73 years). Although GLM test has generated significant differences in expression levels, the substructure problem was confirmed in the multidimensional scaling (MDS) analysis (Supplementary Figure 1), which was not able to cluster the samples by age or death condition.

The same analysis was repeated excluding four DHF samples that had less than 30 years old (Dhf\_140, 253, 277, 884). The MDS analysis graph showed a satisfactory grouping, separating samples by death condition in two groups: control and DHF. However, one of DHF samples, Dhf\_299 seemed to be an outgroup in comparison to formed groups (Supplementary Figure 2). We verified that this sample shows technical problems, because 6,633,703 reads were obtained in sequencing and after filter analysis, only 10% of data was useful. More than 89% of raw reads were composed only by "N", leaving only 717.805 reads to be analyzed. Therefore, Dhf\_299 was removed from the analysis.

Processing the same analysis with ten samples, five from DHF and five control libraries, it was identified a group of 38 differentially expressed miRNAs, considering a p-value < 0.01 (Table 3). After p-value adjustment, the results of FDR remained significant in eight miRNAs: miR-133a-3p, miR-122-5p, miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-126-5p, miR-148a-5p, miR-146a-5p and miR-423-5p.

Among them, two were upregulated in DHF liver tissues: miR-133a-3p and miR-126-5p. miR-133a-3p had a logFC = 6.77 and FDR < 0.00000001, corresponding to more than 100-fold increase in DHF liver tissue. Despite this result, the significant p-value is certainly due to the Dhf\_255 sample, that had a CPM value of 31,503.26, while the second sample with the highest expression of this group had CPM 96.63. The second upregulated miRNA in DHF was miR-126-5p, showing more homogeneity in the CPM values (logFC

= 3.09; FDR = 0.00675) and was increased almost 9-fold in DHF samples when compared to controls (Figure 1).

Most of the differentially expressed miRNAs were under-expressed in DHF libraries in comparison to the control condition. Among them, hsa-miR-122-5p is the molecule with the higher expression in all controls (logFC = -6.59; FDR < 0.00000001), with average CPM = 225,797.2 in controls and 2,336.4 in DHF, in other words, it is more than 100 times less expressed in DHF group (Figure 2). miR-10b-5p is the second with the highest expression level in the control group, decreased almost 100 times in DHF, following by miR-146a-5p, both of them have high CPM values, logFC = -6.1663 (FDR < 0.00000001) and logFC = -2.6476 (FDR = 0.0387), respectively (Figure 3). Sequences of miR-204-5p, miR-148a-5p, and miR-423-5p (respectively: logFC = -5.6317 and FDR < 0.000001; logFC = -3.1354 and FDR = 0.00722; logFC = -2.7806 and FDR = 0.04589) have lower CPM value compared to miRNAs described above, although shows significance in statistical tests together with logFC > 2. From these findings we can allege that there is a nonrandom association with DHF, those results are respectively: logFC = -5.6317 and FDR < 0.000001; logFC = -3.1354 and FDR = 0.00722; logFC = -2.7806 and FDR = 0.04589 (Figure 3).

Overall, we found more under expressed miRNA than overexpressed in the control samples, according to Heatmap analysis, carried out with the CPM values per sample/per miRNA, and we observed DHF and most controls clustered in distinct clades (Figure 4). Also, we detected higher expression of miRNAs mentioned above in the lower region of Figure 4.

This context highlights another discrepancy in Controle\_63 sample, shown different expression from other replicates and being as an external group; to solve this problem, a new analysis was performed excluding this and all other ones who had very low throughput in sequencing, and this exclusion has not identified any relevant changes in the statistically significant miRNAs list or even in logFC values. So, only FDR and p values had a slight increase, probably due to decreased statistical power caused by the smaller replicates number, so this sample was included in all tests.

MDS analysis generated a chart based on logFC (Figure 5) showing the dispersion of all samples in two-dimensional scaling and shows the clustering of two sample conditions. DHF samples is shown like a well consistent data, closer to each other than control samples, denoting the heterogeneity in the latter group. Nevertheless, clustering in different groups DHF and control samples was very clear.

It is interesting to note that two of DHF samples have a closer relationship in MDS analysis (Figure 5): Dhf\_255 and Dhf\_347. We identified a common characteristic between these samples, both samples had clinical findings for splenic involvement (splenomegaly and splenic congestion), opposite to other samples that did not have this condition as a cause of death.

#### *Differential Expression Analysis: DHF < 30 years old and DHF > 30 years' old*

Due to large differences in ages among DHF individuals, an analysis of differential expression in the DHF group were conducted in order to identify the influence

of age in liver miRNA expression. These groups were composed by samples from individuals who died with less than 30 years, called "< 30" and groups of individuals over 30 years, called "> 30" (Supplementary Table 1). With GLM test we identified five miRNAs with a statistically significant difference: miR-133a-5p, was upregulated in the group > 30 years (logFC = 7.6; FDR <0.0000001). Four molecules were overexpressed in the group < 30 years: miR-122-5p (logFC = -6.982; FDR <0.0000001), miR-10b-5p (logFC = -6.474; FDR <0.0000001) miR-204-5p (logFC = -5.896; FDR <0.0000001) and miR-146a-5p (logFC = -2.578; FDR = 0.0185). The MDS analysis shows a clear cluster of > 30 group from < 30 sample group (Figure 6). Between these groups was observed that Dhf\_884 sample is distanced from both groups, maybe the reason was the sex (male) or the number and diversity of symptoms on the death were greater than the other samples.

Heatmap analysis (Figure 7) shows the same results obtained by MDS with clear clustering in two clades: samples of less than 30 years Dhf\_140, Dhf\_253, Dhf\_277 and Dhf\_884; and another cluster > 30 years old: Dhf\_173, Dhf\_198, Dhf\_255, Dhf\_236 and Dhf\_347. MicroRNAs that appears repeated on the image are related to its isoforms, or similar sequences from the same pri-miRNA with a few nucleotide changes in its sequence.

#### *Target Genes Prediction and Functional Analysis*

The prediction targets for each differentially expressed miRNA was obtained from the three platforms TargetScan, miRTarBase and miRDB; the threshold to consider reliable and real prediction, was the value of context++ score < -0.2 in TargetScan and Score > 80 in miRDB. The list of identified target genes varied for each miRNA and between the three databases.

Then, a list of 224 target genes of overexpressed miRNA in liver, were subjected to functional annotation program in DAVID 6.7 [26]. Enrichment analysis identified 26 pathways with significant p-value < 0.05 after Benjamini adjustment: eight pathways of apoptosis and cell cycle regulation; eight related to the immune response including pathways activated by NF- $\kappa$ B, the other ten pathways are mainly related to cell signaling and signal transduction (Figure 8). Annotation groups were generated with enrichment scores > 1.3 and among then, we selected ten groups containing pathways with p <0.05 (Supplementary Table 2); the annotation group 1 contains seven pathways with p <0.05 and had the highest enrichment score = 2,898. The second highest score = 2,455 was NF- $\kappa$ B signaling pathways and the third group, with score = 2.349 contains three death pathways.

From the data identified by DAVID, based on KEGG database, (Figure 9), we can see that the pathways would be controlled by overexpressed miRNAs during DHF. However, the regulation can be negative by direct action on target gene or they may be positively regulated, i.e., the miRNA target is a pathway inhibitor thus preventing the inhibitors expression and activating the pathway.

It appears clearly the relationship of genes with each pathway and is explicitly the importance of apoptotic pathways and regulation of cell proliferation within the entire interaction context. Genes as Notch, MAPK, p53 and Wnt was identified and contain

links to a large number of other genes in cell control as cyclin-dependent kinases CDKN1A and death ligands FAS. The immune response-related pathways contain primarily cytokines, signalings, transcription factors such as NF- $\kappa$ B family and many CC chemokines and CX genes.

Functional analysis of target genes of under expressed miRNAs in DHF group was carried out with 570 target genes from all six miRNAs obtained in the three databases and resulted in 208 pathways, with the predominance of cell death pathways. For data organization purposes, the first 30 pathways with lowest p-values have been selected. The phosphoprotein pathway showed the highest enrichment rate in both analyzes of super and under expressed miRNAs and was excluded to eliminate noise (Figure 10). Among the 30 selected, ten are related to death control, with FDR < 0.05 (Supplementary table 3). The others pathways are related to various cellular functions and four biosynthetic pathways, what is expected in the case of liver sample with biological functions in metabolism.

## Discussion

The pathogenesis of dengue involves triggering responses to viral replication and the host immune response, together with genetic factors and complex regulatory networks. In dengue hemorrhagic fever, increased vascular permeability, plasma leakage, hypovolemic shock and bleeding can often lead to death. The sample group DHF showed heterogeneity regarding the cause of death and the symptoms presented. These differences were tested by MDS and Heatmap and do not clear clusters within DHF samples were observed. Maybe some difference could appear with a larger sample group analysis, however, the study of the liver is limited by invasiveness of the biopsy procedure and the fact that it is not a routine test in dengue patients, which limits the comparison between liver miRNAs expression in cases of classical and hemorrhagic fever. Thus, despite the small amount of clinical presentation data in this study, it may be stated that the analyzed sample groups of DHF and controls are consistent and can be compared, even with as so much variable and specific element as microRNAs. About the age and sex influence, Meder et al. identified a large difference of miRNA between young and old people, around 100 miRNA were differentially expressed in contrast with the little influence of sex in expression, both age and sex results was similarly observed here [27].

The miR-126-5p is located in the intronic *Egfl7* gene. This region encodes the guide sequence miRNA-126-3p (named miR-126) and the passenger 5p. Both *Egfl7* gene and miR-126-3p/5p are angiogenic factors involved in maintaining vascular integrity [28], being associated in several studies with vascular disease and cancer. Overall miR-126-5p appears associated with protection or milder cases in diseases, such as tumor suppressor in giant cells by down-regulation of parathyroid hormone [29]. Its downregulation is associated to severe acute lung injury in mice, due to increased vascular endothelial growth factor expression (VEGF) and increase in alveolar permeability [30]. miR-126-5p was also associated as protector of vascular injury by regulating endothelial cells, as identified by Schober et al. In this study, *Mir126*<sup>-/-</sup> mice had endothelial repair defects and increased lesion-induced hyperlipidemia, the mechanism of action has been

downregulation of *Dlk1* (inhibitor of Notch1 signaling pathway) by miR-126-5p (but not by miR-126-3p). Thus, there was Notch1 activation and increased endothelial proliferation through CDKN1A and HES5 regulation [31], in this same study, the treatment of mice with synthetic miR-126-5p mimics led to decreased vascular injury.

On the other hand, other studies have identified an opposite regulation effect of miR-126-5p, associating its overexpression with poor prognosis and increased malignant potential in acute myeloid leukemia (AML) [32], though those diseases have distinct etiologies, the result agrees with this study, where increase in miRNA expression is associated with DHF. About influence on cell proliferation, opposite effects were identified, being negative in stromal cells and positive in both endothelial cells replication and antiapoptosis in melanoma [29,31,33], this variety of effects highlight the importance of detailed analysis of miR-126-5p, individually in the disease and the cell type studied.

Some possible scenarios within the DHF pathogenic context in liver may explain miR-126-5p expression results. None of reviewed studies shows its behavior in any infection context, viral or bacterial disease, this is the first study to describe the association of miR-126-5p in infectious diseases, in addition is the first to describe the hepatic miRNA profile in dengue (*in vivo*). It is possible that vascular permeability in DHF be regulated by miR-126-5p, however due to the nature of diseases described, this occurs through a different mechanism besides that observed in vascular pathologies and cancer. Similar to miR-122-5p, which has negative influence on liver infections and positive in cancer and other non-infectious diseases [19–24].

The possibility is that the inhibition of cell proliferation is the key mechanism of action, once apoptosis is the hallmark of the hepatic dengue pathogenesis [9]. This situation is reinforced by the joint analysis of the KEGG pathways of two overexpressed miRNAs target genes (miR-133a-3p and miR-126-5p), which verified the presence of eight cell death pathways, including CDK genes Notch, MAPK, RAS, p53, Wnt and FAS being regulated these miRNAs in some degree. The cellular function of miR-133a-3p corroborates these statements: this molecule is classified as a myomiR, a miRNA closely involved in muscle development, several problems associated with structural development and potential biomarker in several cancers. Chung et al. described increased expression of miR133a-3p associated with apoptosis induction in mouse retinal cells, through caspase 9 and cyclin D2 regulation [34]; besides that, it is upregulated in osteoporosis and downregulated in colorectal cancer [35,36]. Was described that overexpressed synthetic miR-133a-3p suppress DENV replication *in vitro* [25], and this report by itself characterizes this miRNA as a potential molecule for investigation, even with the lack of concordance among DHF samples expression.

In addition to these arguments, it is also the enrichment analysis result of KEGG pathways from downregulated miRNA target genes in dengue: miR-122-5p, miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-148a-5p, miR -146a-5p and miR-423-5p; a total of 29 in 208 pathways found were of cell death regulation, among that ten cell death pathways are between in the 30 best scores with the lowest p value; this corroborate the possible involvement of these miRNAs in liver pathogenesis, in the sense of regulating apoptosis. In the same time cytokines released in dengue activate cytotoxic T lymphocytes to contain

and remove DENV, the rate of apoptosis increase can be beneficial for replication due to the bigger amount of membrane phospholipids supply to viral envelope production [37].

Among other possible situations of miR-126-5p regulation in dengue, it is possible that the high expression levels reflect another parallel stimulation, with purpose to repair vascular endothelial damage during DENV infection and in this scenario, the increase in vascular permeability would be induced by factors such as cytokine storm, immunocomplex precipitation, complement activation and induction of endothelial activation markers such as angiopoietin-2 (Ang-2), von Willebrand factor (vWF) and VEGF, these two last are miR-126-5p targets and VEGF was increased in consequence of miR-126-5p suppression in acute lung injury, leading to cellular permeability and aggravation of the disease in mice [30].

The growth and endothelial repair regulation by miR-126-5p (and miR-126-3p) is well established in literature, as well as the vascular permeability increase in dengue hemorrhagic pathogenesis, in this way is evident this potential relationship between miR-126-5p superexpression and DHF vascular symptoms. However, due the lack of data such as gene expression and cytokine profile from samples in this study, further experimental analysis is needed to elucidate the real mechanism that describe this association. It is necessary to understand the endothelial regulation that occurs in hepatic tissue, identify the exact gene target (or genes) and the pathways regulated by miR-126-5p and miR-133a-3p in DHF. The potential genes and proteins would be those related to cycle cell control and endothelial proliferation that are targeted by these miRNAs as CDK19, ADAM9, MMP7, VWC2, VEGF, DLK1 MAP3K2 e MAP3K7, indeed, MAPK signaling was identified as a liver apoptotic mediator in DENV infections, through TNF-alpha and caspases regulation [5].

Regard the downregulated miRNAs in DHF group, miR-122-5p is liver-specific and represents more than 50% of liver miRnome, it plays role in fat metabolism and homeostasis. Rats with this gene silenced developed fatty liver hepatitis, fibrosis and hepatocellular carcinoma [38], what agree with histopatologic results of steatosis, necrosis, hyperplasia and metabolic changes from DHF fatal cases [7]. In cancer cases, miR-122-5p expression has tumor suppressive effect while in *Leishmania* infections, hepatitis B and C, the presence of this molecule in culture was essential for viral replication and it is found under-expressed in asymptomatic carriers and non-responders to treatment [19–24].

When the MRE from miR-122 or miR-133a-3p is added to the 3' UTR region of DENV suppressed virus replication in culture. We found that miR-122-5p is downregulated in DHF liver with a large difference between the sample groups. The large diversity of effects reflects the need for more detailed research on the mechanism of action of this molecule and miR-146a-5p as well, that showed a decreased expression in dengue. This is different from the majority of cases reported in the literature, where miR-146a (-3p sequence) is described as a regulator of innate immunity, inflammatory responses and IFN inhibition through NF-kB regulation, which are involved in facilitating DENV (Wu et al., 2013) and HCV replication in cell culture [14]. Moreover, miR-146a-5p is related with a fibrosis decrease in non-alcoholic steatohepatitis [39] and has recently been detected also under-expressed in serum of patients with dengue fever [40].

The miR-146a effect can be extremely important in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. It is worth noting that the observed differences among the studies are expected, given the variety of experimental models and conduction of analysis in cell culture, which is out of the systemic context. For other infections where viral replication plays a central role in the pathogenesis, those culture models can be more accurate in resolution hypotheses. In dengue cases, is always necessary to considerate the whole pathogenesis characterized by intense unspecific reaction of the immune system induced by T lymphocytes cross reactive and antibodies. In severe dengue there is a clinical presentation classified as hypersensitivity reaction type V - characterized as accentuation of microbial infection IgG immunocomplex by cell Fc receptor (Halstead, 2014). It is important to considerate the activation of ineffective T lymphocytes in toxicity but highly competent activating chemokines release and low IFN- $\gamma$  induction, causing an exacerbated inflammation. On the other hand, as reviewed by John et al., increased IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, CCL2 (MCP-1) and CCL5 is detected as characteristic of severe dengue, which must be considerate in our results because they are samples of death by dengue hemorrhagic fever, the most severe point that the infection can rise [9].

The other four sub-expressed miRNAs miR-10b-5p, miR-204-5p, miR-148a-5p and miR-423-5p has variable association with cancer and other non-infectious diseases, nearly half of studies found suppressive tumor/beneficial effect and the other half has the opposite effect depending on the cell type and disease etiology [41–49]. Overall, they may also be related to cell proliferation control pathways, but have no clear relationship with dengue as the other miR-126-5p, miR122-5p and miR146a-5p, but showed statistically significant differences even with the stringent analysis criteria and deserve further studies to clarify this relationship.

## Conclusion

Among the eight miRNAs differentially expressed in DHF human liver with, we highlight miR-126-5p, miR-133a-3p (upregulated) and miR-122-5p, miR-146a-5p, (downregulated). The enrichment analysis of genes targeted by overexpressed miRNAs identified mainly apoptosis-related and immune activation regulating pathways; VEGF signaling pathway that controls endothelial cells proliferation was also identified. The targets and pathways reported in the sub-expressed miRNAs analysis were also more related to apoptosis regulation and other metabolic biosynthetic pathways, as expected in the liver tissue.

miRNAs miR-126-5p, miR-122-5p, miR-146a-5p and miR-133a-3p seem to have greater involvement in liver pathogenesis of DHF, because: i) can regulate growth and endothelial repair, key in vascular permeability presented in bleeding cases; ii) plays a central role in liver homeostasis, with the suppression *in vitro* associated with several pathologies such as steatosis and fibrosis, found in liver histopathological analysis of DHF fatal cases; iii) regulates the expression of interferon, an inflammatory cytokine associated with exacerbation of immune response that leads to severe dengue; and iv) regulate directly DENV replication in cell culture by viral genome interaction.



miRNAs seem promising agents to be used in anti-viral therapy and diagnostics, and then, more experimental studies are needed to identify target genes that are regulated by these miRNAs in liver during DENV infection, which may or may not differ from the identified genes and pathways proposed here.

## Methods

Liver tissue samples of DHF patients (n = 10), fixed in paraffin, were selected from Department of Pathology of Guilherme Álvaro Hospital (São Paulo, Brazil). These samples were obtained from fatal cases viscerotomy, during a dengue outbreak in 2010. All procedures followed the Institutional Ethics Committee standards [50]. The patient's ages ranged from 19 to 62 years with a mean of 39.5 years, divided in 7 women and 3 men.

Dengue diagnosis was confirmed by correlation between clinical, serological (IgM and NS1 antigen, detection by ELISA) and histologic examination (hematoxylin-eosin staining detection of viral antigens by immunohistochemistry assay) [50]. These individuals haven't any comorbidity.

The controls (n = 5) included species of liver tissue, fixed in paraffin, which had acute myocardial infarction as cause of death, died without any infection or hepatic injury, which was confirmed histologically (data not shown). The average age of the group was 55 years with 1 woman and 4 men. All collections of tissue samples were performed within 12 hours after the time of death.

### *miRNA Extraction and Sequencing*

The small RNAs, including microRNAs, were extracted from 5µm sections of liver tissue, using the High Pure miRNA Isolation Kit (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT, USA). After 16 hours of incubation with proteinase K, the extraction was carried out, according the manufacturer's protocol. The quality and quantity of RNA extracted was checked using, respectively, the Qubit Fluorometer 2.0 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and Small RNA Analysis kit in Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Samples were sent to Functional Genomics Center (Agriculture College Luiz de Queiroz - USP, Piracicaba, SP) for sequencing on Illumina MiSeq platform for small RNAs, according to the manufacturer's protocol.

### *Sequencing data analysis*

After sequencing, the images generated by the instrument were analyzed and the first processing was basecalling, by Off-Line Basecaller (OLB v1.8.0, Illumina Inc., San Diego, CA, USA). The resulting reads were subjected to the following processes: (1) FastQC (Andrews, 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>) used to view the of reads parameters before and after the treatments applied; (2) remove 3' adapters sequences containing only N and run with FastXToll Kit

([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html)); (3) redundant sequences were collapsed and reads shorter than 17 nt were eliminated in mapper, a Perl script included in miRDeep2 [51], moreover, mapper performed the alignments of reads against the human genome v.hg19.

After this preprocessing, miRDeep2 program with bowtie v1.0 was used to generate the reads counts, annotated mature miRNAs at miRBase and predict novel miRNAs based on miRBase hairpins database v21 (available in <http://www.mirbase.org/>). miRBase is a widely used miRNA database, and stores integrated sequencing data, annotation and target genes data. In addition to the official nomenclature of miRNAs, some figures may appear the official miRBase nomenclature, added a prefix and a suffix, for example 281\_hsa-miR-142-3p\_MIMAT0000434, which means “*internal index\_hsa-miR-142-3p\_miRBase access number*”.

### *Differential Expression Analysis*

To compare the expression of miRNA between control group and DHF patients, counts results from miRDeep2 fed to edgeR package - Bioconductor [52]. The sampling normalization factor was obtained and the counts were normalized to counts per million (CPM) in order to perform the differential expression analysis. Exact Fisher and GLM (General Linear Model) statistical tests were applied with FDR (False Discovery Rate Benjamini-Hochberg) used to adjust the p value. miRNAs with less than five aligned reads were excluded from this process. The differentially expressed miRNAs were determined according to the criteria of fold change (FC), with  $\log_{2}FC \geq 2$  associated with the determination of significance by FDR value  $< 0.05$ .

### *miRNA Target Prediction*

The potential target genes of miRNAs differentially expressed were predicted by algorithms using three different approaches: (1) TargetScan (available [www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) computational method, reliability criterion: context score  $++ < -0.2$ ; (2) miRDB (available [www.miRDB.org](http://www.miRDB.org)) using artificial intelligence method, with selection criteria: miRDB score  $> 80$ ; and (3) miRTarBase (available [www.miRTarBase.mbc.nctu.edu.tw/](http://www.miRTarBase.mbc.nctu.edu.tw/)), a curated database based on experimental evidence, the criteria selection was the target must had been identified by at least two different methods.

### *Functional Analysis*

The web-based program DAVID 6.7 (available at <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) was used to perform functional annotation and enrichment analysis of target genes. It was based on three aspects: cellular component, biological process and molecular function. The p value with Bejamini correction was used as enrichment parameter to candidate target genes. The score  $> 1.3$  was adopted as relevant in the cluster generation of functional annotation [26]. The target gene and

pathways interaction network was built with Cytoscape 3.3 platform, available for free at: <http://www.cytoscape.org/>.

## References

1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496:504–7.
2. Sun P, Kochel TJ. The battle between infection and host immune responses of dengue virus and its implication in dengue disease pathogenesis. *ScientificWorldJournal*. [Internet]. 2013;2013:843469. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3582169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
3. Jain B, Chaturvedi UC, Jain A. Role of intracellular events in the pathogenesis of dengue; An overview. *Microb. Pathog.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 [cited 2014 Apr 28];69-70C:45–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24685697>
4. Hilgard P, Stockert R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. *Hepatology*. 2000;32:1069–77.
5. Sreekanth GP, Chuncharunee A, Sirimontaporn A, Panaampon J, Noisakran S, Yenchitsomanus P, et al. SB203580 Modulates p38 MAPK Signaling and Dengue Virus-Induced Liver Injury by Reducing MAPKAPK2, HSP27, and ATF2 Phosphorylation. *PLoS One* [Internet]. 2016;11:e0149486. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0149486>
6. Pagliari C, Quresma JAS, Fernandes ER, Stegun FW, Brasil RA, Andrade-Jr. HF de, et al. Immunopathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever: Contribution to the Study of Human Liver Lesions. *J. Med. Virol.* 2014;86:1193–7.
7. Póvoa TF, Alves AMB, Oliveira C a B, Nuovo GJ, Chagas VL a, Paes M V. The pathology of severe dengue in multiple organs of human fatal cases: Histopathology, ultrastructure and virus replication. *PLoS One*. 2014;9.
8. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J. Hepatol.* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2013;59:583–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.033>
9. John DV, Lin Y-S, Perng GC. Biomarkers of severe dengue disease - a review. *J. Biomed. Sci.* [Internet]. *Journal of Biomedical Science*; 2015;22:83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26462910> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4604634>
10. Dogini DB, Pascoal VDB, Avansini SH, Vieira AS, Pereira TC, Lopes-Cendes I. The new world of RNAs. *Genet. Mol. Biol.* [Internet]. 2014;37:285–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3983583&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
11. Kakumani PK, Rajgokul KS, Ponia SS, Kaur I, Mahanty S, Medigeshi GR, et al. Dengue NS3, an RNAi suppressor, modulates the human-miRNA pathways through its interacting partner. *Biochem. J.* [Internet]. 2015;89–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26221025>
12. Cameron JE, Yin Q, Fewell C, Lacey M, McBride J, Wang X, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J. Virol.* [Internet]. 2008;82:1946–58. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02136-07> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18057241> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2258704>

13. Kakumani PK, Ponia SS, S RK, Sood V, Chinnappan M, Banerjea AC, et al. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *J. Virol.* [Internet]. 2013 [cited 2014 Apr 28];87:8870–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3754049&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Bandiera S, Pernot S, El Saghire H, Durand SC, Thumann C, Crouchet E, et al. HCV-induced up-regulation of miR-146a-5p in hepatocytes promotes viral infection and deregulates metabolic pathways associated with liver disease pathogenesis. *J. Virol.* [Internet]. 2016;JVI.00619–16. Available from: <http://jvi.asm.org/lookup/doi/10.1128/JVI.00619-16>
15. Ye E-A, Steinle JJ. miR-146a Attenuates Inflammatory Pathways Mediated by TLR4/NF- $\kappa$ B and TNF $\alpha$  to Protect Primary Human Retinal Microvascular Endothelial Cells Grown in High Glucose. *Mediators Inflamm.* [Internet]. Hindawi Publishing Corporation; 2016;2016:3958453. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26997759>
16. Wu S, He L, Li Y, Wang T, Feng L, Jiang L, et al. miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6. *J. Infect.* [Internet]. 2013 [cited 2014 May 25];67:329–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685241>
17. Sharma N, Verma R, Kumawat KL, Basu A, Singh SK. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells. *J. Neuroinflammation* [Internet]. 2015;12:249. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4355369&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
18. Thakral S, Ghoshal K. miR-122 is a unique molecule with great potential in diagnosis, prognosis of liver disease, and therapy both as miRNA mimic and antimir. *Curr. Gene Ther.* [Internet]. 2015;15:142–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4439190&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
19. Brunetto MR, Cavallone D, Oliveri F, Moriconi F, Colombatto P, Coco B, et al. A serum microRNA signature is associated with the immune control of chronic hepatitis B virus infection. *PLoS One.* 2014;9.
20. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Gan J. A pilot study of serum micrornas panel as potential biomarkers for diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *PLoS One.* 2014;9:1–12.
21. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Chen L, Yu X, et al. A serum microRNA panel as potential biomarkers for hepatocellular carcinoma related with hepatitis B virus. *PLoS One.* 2014;9:e107986.
22. Tsubota A, Mogushi K, Aizaki H, Miyaguchi K, Nagatsuma K, Matsudaira H, et al. Involvement of MAP3K8 and miR-17-5p in poor virologic response to interferon-based combination therapy for chronic hepatitis C. *PLoS One.* 2014;9:1–10.
23. Liu Y, Chen X, Bian Q, Shi Y, Liu Q, Ding L, et al. Analysis of plasma microRNA expression profiles in a Chinese population occupationally exposed to benzene and in a population with chronic benzene poisoning. *J. Thorac. Dis.* [Internet]. 2016;8:403–14. Available from: <http://jtd.amegroups.com/article/view/6764/6485>
24. Dong H, Curran I, Williams A, Bondy G, Yauk CL, Wade MG. Hepatic miRNA profiles and thyroid hormone homeostasis in rats exposed to dietary potassium perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2016;41:201–10.

25. Castillo JA, Castrillón JC, Dioso-Toro M, Betancur JG, St Laurent G, Smit JM, et al. Complex interaction between dengue virus replication and expression of miRNA-133a. *BMC Infect. Dis.* [Internet]. *BMC Infectious Diseases*; 2015;16:29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1364-y>
26. Huang DW, Lempicki R a, Sherman BT. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009;4:44–57.
27. Meder B, Backes C, Haas J, Leidinger P, St?hler C, Gro?mann T, et al. Influence of the confounding factors age and sex on microRNA profiles from peripheral blood. *Clin. Chem.* 2014;60:1200–8.
28. Nikolic I, Plate K-H, Schmidt MH. EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance. *J. Angiogenes. Res.* [Internet]. 2010;2:9. Available from: <http://vascularcell.biomedcentral.com/articles/10.1186/2040-2384-2-9>
29. Zhou W, Yin H, Wang T, Liu T, Li Z, Yan W, et al. MiR-126-5p regulates osteolysis formation and stromal cell proliferation in giant cell tumor through inhibition of PTHrP. *Bone* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;66:267–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.06.021>
30. Tang R, Pei L, Bai T, Wang J. Down-regulation of microRNA-126-5p contributes to overexpression of VEGFA in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Biotechnol. Lett.* [Internet]. Springer Netherlands; 2016; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-016-2107-2>
31. Schober A, Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Bidzhekov K, Gremse F, Grommes J, et al. MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat. Med.* [Internet]. 2014;20:368–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3487>
32. Shibayama Y, Kondo T, Ohya H, Fujisawa SI, Teshima T, Iseki K. Upregulation of microRNA-126-5p is associated with drug resistance to cytarabine and poor prognosis in AML patients. *Oncol. Rep.* 2015;33:2176–82.
33. Felli N, Felicetti F, Lustrì AM, Errico MC, Bottero L, Cannistraci A, et al. miR-126&126\* Restored Expressions Play a Tumor Suppressor Role by Directly Regulating ADAM9 and MMP7 in Melanoma. *PLoS One.* 2013;8.
34. Chung SH, Gillies M, Sugiyama Y, Zhu L, Lee SR, Shen W. Profiling of Micro RNAs Involved in Retinal Degeneration Caused by Selective M??ller Cell Ablation. *PLoS One.* 2015;10:1–18.
35. Hao L, Li J, Tian Y, Wu J. Changes in the MicroRNA Profile of the Mandible of Ovariectomized Mice. *Cell. Physiol. Biochem.* [Internet]. 2016;1267–87. Available from: <http://www.karger.com/?doi=10.1159/000443074>
36. Wang X, Chen L, Jin H, Wang S, Zhang Y, Tang X, et al. Screening miRNAs for early diagnosis of colorectal cancer by small RNA deep sequencing and evaluation in a Chinese patient population. *Onco. Targets. Ther.* 2016;9:1159–66.
37. Lin C-F, Wan S-W, Chen M-C, Lin S-C, Cheng C-C, Chiu S-C, et al. Liver injury caused by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1 in a murine model. *Lab. Invest.* 2008;88:1079–89.
38. Tsai WC, Hsu S Da, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, et al. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J. Clin. Invest.* 2012;122:2884–97.
39. Du J, Niu X, Wang Y, Kong L, Wang R, Zhang Y, et al. MiR-146a-5p suppresses activation and proliferation of hepatic stellate cells in nonalcoholic fibrosing steatohepatitis through directly targeting Wnt1 and Wnt5a. *Sci. Rep.* [Internet]. Nature Publishing Group; 2015;5:16163. Available from: <http://www.nature.com/articles/srep16163>

40. Ouyang X, Jiang X, Gu D, Zhang Y, Kong SK, Jiang C, et al. Dysregulated Serum MiRNA Profile and Promising Biomarkers in Dengue-infected Patients. *Int. J. Med. Sci.* [Internet]. 2016;13:195–205. Available from: <http://www.medsci.org/v13p0195.htm>
41. Hoss AG, Kartha VK, Dong X, Latourelle JC, Dumitriu A, Hadzi TC, et al. MicroRNAs Located in the Hox Gene Clusters Are Implicated in Huntington's Disease Pathogenesis. *PLoS Genet.* 2014;10.
42. Wojcicka A, Swierniak M, Kornasiewicz O, Gierlikowski W, Maciag M, Kolanowska M, et al. Next generation sequencing reveals microRNA isoforms in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;53:208–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2014.05.020>
43. Hoss AG, Labadorf A, Beach TG, Latourelle JC, Myers RH. microRNA Profiles in Parkinson's Disease Prefrontal Cortex. *Front. Aging Neurosci.* [Internet]. 2016;8:1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2016.00036>
44. Liu L, Wang J, Li X, Ma J, Shi C, Zhu H, et al. MiR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;457:621–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.037>
45. Han J-W, Zheng H-F, Cui Y, Sun L-D, Ye D-Q, Hu Z, et al. Genome-wide association study in a Chinese Han population identifies nine new susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* [Internet]. 2009 [cited 2011 Jul 7];41:1234–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19838193>
46. He H, Chen K, Wang F, Zhao L, Wan X, Wang L, et al. miR-204-5p promotes the adipogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by modulating DVL3 expression and suppressing Wnt/beta-catenin signaling. *Int. J. Mol. Med.* 2015;35:1587–95.
47. Long XR, He Y, Huang C, Li J. MicroRNA-148a is silenced by hypermethylation and interacts with DNA methyltransferase 1 in hepatocellular carcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 2014;45:1915–22.
48. Miyamoto S, Usami S, Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Hakuno D, et al. Expression Patterns of miRNA-423-5p in the Serum and Pericardial Fluid in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *PLoS One* [Internet]. 2015;10:e0142904. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0142904>
49. Zhao H, Gao A, Zhang Z, Tian R, Luo A, Li M, et al. Genetic analysis and preliminary function study of miR-423 in breast cancer. *Tumor Biol.* 2015;36:4763–71.
50. Pagliari C, Simões Quaresma JA, Kanashiro-Galo L, de Carvalho LV, Vitoria WO, da Silva WLF, et al. Human kidney damage in fatal dengue hemorrhagic fever results of glomeruli injury mainly induced by IL17. *J. Clin. Virol.* [Internet]. 2016;75:16–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653215007982>
51. Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res.* [Internet]. 2012 [cited 2014 Apr 29];40:37–52. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3245920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
52. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2009;26:139–40.

**Table 1.** Clinical data and sequencing results per sample. MI: acute myocardial infarction; Dhf: dengue hemorrhagic fever

Sample ID	Clinical			Dados Sequenciamento			Quality
	Age	Sex	Cause of death	Raw reads	Processed reads	Processed reads (%)	
Control-63	44	M	MI, aterosclerose	1.565.618	724.999	46,3	37
Control-81	48	M	Edema agudo de pulmão, IAM, aterosclerose sistêmica	4.212.073	2.793.822	66,3	37
Control-94	56	M	IAM, aterosclerose	6.192.749	5.263.821	85,0	37
Control-13	58	M	Nulo	1.498.026	938.826	62,7	37
Control-14	73	F	Nulo	5.280.226	3.885.399	73,6	37
Dhf-140	19	F	Derrame pleural, ascite, edema cerebral	5.086.952	3.627.180	71,3	37
Dhf-173	52	M	Derrame pleural, hepatite transinfecçiosa	7.644.988	3.787.025	49,5	37
Dhf-193	52	F	Derrame pleural e peritoneal, hepatite transinfecçiosa, hematêmese	3.001.348	864.836	28,8	37
Dhf-236	41	F	Derrame pleural, ascite	6.079.568	2.349.387	38,6	37
Dhf-253	25	F	Hemorragia esplênica, hepatite aguda	5.464.911	2.514.411	46,0	37
Dhf-255	62	M	Esplenomegalia	7.225.149	3.923.213	54,3	37
Dhf-277	28	F	Hepatite aguda, ascite volumosa,	5.268.565	3.475.088	66,0	37
Dhf-299	43	F	Hepatite aguda, edema cerebral	6.633.706	717.805	10,8	37
Dhf-347	47	F	Congestão esplênica, com focos de hemorragia, esteatose hepática	8.315.347	4.154.626	50,0	37
Dhf-884	26	M	Derrame pleural, edema, congestão cerebral, petéquias, equimose cutânea	3.897.972	1.847.021	47,4	37

**Table 2.** Top 30 microRNAs most expressed in hepatic tissue of dengue hemorrhagic fever (DHF) and controls, expression is presented by counts per million (CPM).

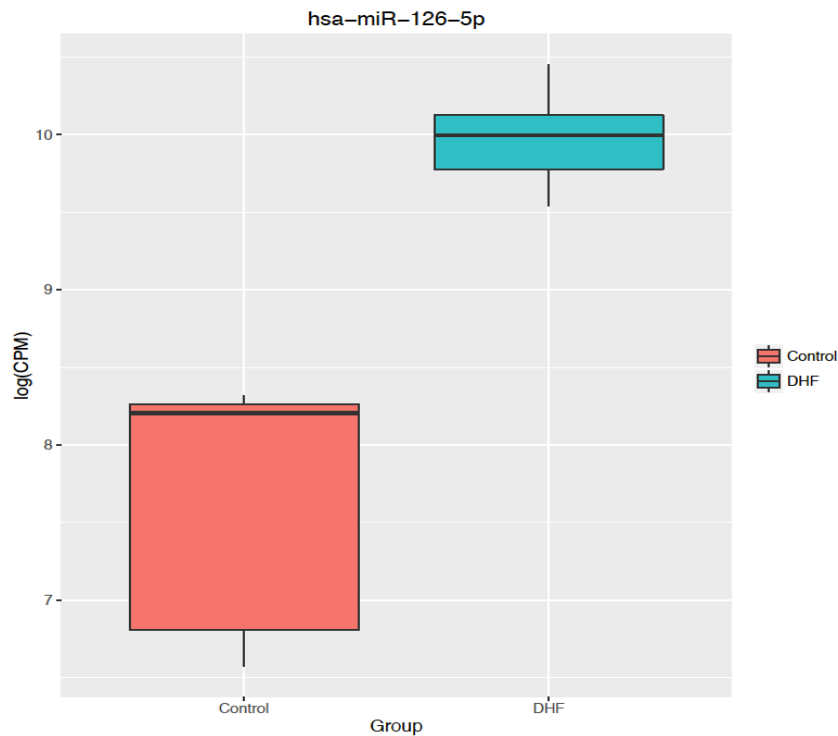
<i>Ranking</i>	<i>miRNA</i>	<b>Control (average CPM)</b>	<i>miRNA</i>	<b>DHF (average CPM)</b>
1	hsa-miR-122-5p*	225797,54	hsa-miR-143-3p	93950,57
2	hsa-miR-192-5p	142361,14	hsa-miR-192-5p	60231,03
3	hsa-miR-10b-5p*	134833,23	hsa-miR-27b-3p	42784,48
4	hsa-miR-22-3p	99530,51	hsa-miR-22-3p	42661,72
5	hsa-miR-143-3p	96662,53	hsa-miR-21-5p	37702,97
6	hsa-miR-10a-5p	87218,63	hsa-miR-10a-5p	26870,72
7	hsa-miR-30a-5p	65286,96	hsa-miR-30a-5p	23868,67
8	hsa-miR-26a-5p	46657,54	hsa-miR-126-5p*	22629,93
9	hsa-miR-27b-3p	39069,49	hsa-miR-26a-5p	22190,67
10	hsa-miR-148a-3p	32382,40	hsa-miR-451a	18251,66
11	hsa-miR-486-5p	29730,49	hsa-miR-486-5p	16815,22
12	hsa-miR-146b-5p	26265,61	hsa-let-7f-5p	12382,60
13	hsa-miR-21-5p	17553,78	hsa-miR-181a-5p	11090,36
14	hsa-miR-30e-5p	16693,45	hsa-let-7i-5p	10764,92
15	hsa-miR-451a	13438,83	hsa-miR-148a-3p	10506,86
16	hsa-let-7f-5p	13017,50	hsa-miR-30e-5p	9277,09
17	hsa-miR-30d-5p	12961,10	hsa-miR-16-5p	8057,48
18	hsa-miR-378a-3p	9132,45	hsa-miR-146b-5p	7199,33
19	hsa-miR-92a-3p	8745,08	hsa-miR-101-3p	6530,05
20	hsa-miR-146a-5p*	8548,37	hsa-miR-133a-3p*	6351,99
21	hsa-let-7i-5p	8317,40	hsa-miR-30d-5p	6051,11
22	hsa-let-7a-5p	7247,17	hsa-miR-186-5p	5738,95
23	hsa-miR-92a-3p	7076,30	hsa-miR-26b-5p	5689,11
24	hsa-miR-26b-5p	6166,08	hsa-miR-92a-3p	5455,07
25	hsa-miR-181a-5p	5357,57	hsa-let-7a-5p	5146,89
26	hsa-let-7g-5p	4898,23	hsa-miR-92a-3p	4914,85
27	hsa-miR-186-5p	4652,75	hsa-miR-126-3p	4757,55
28	hsa-miR-16-5p	4275,93	hsa-let-7g-5p	4154,16
29	hsa-miR-100-5p	3979,56	hsa-miR-142-5p	3984,70
30	hsa-miR-99a-5p	3712,07	hsa-miR-141-3p	3859,45

\* Statistically significant.

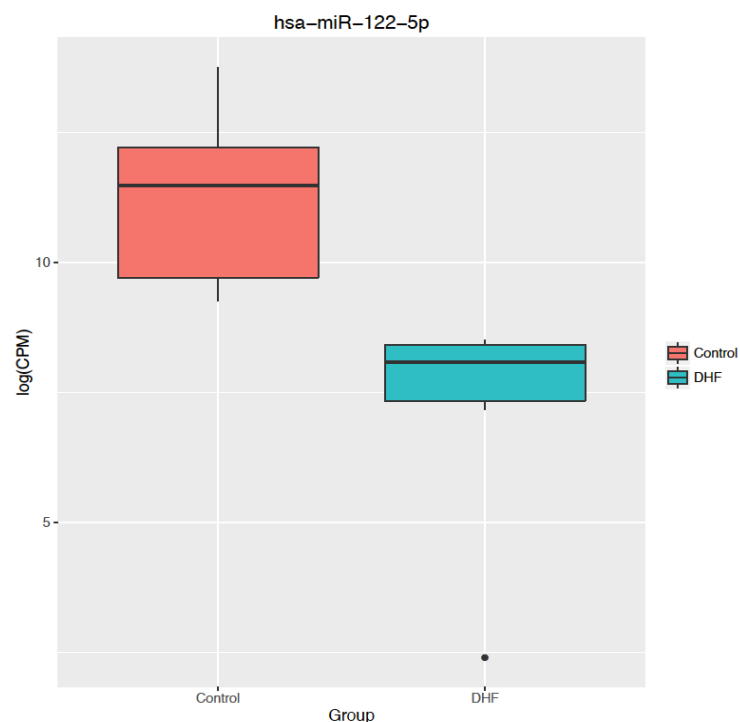


**Table 3.** Resume of differential expression analysis, showing the first microRNAs with p value < 0,05. Expression data are in counts per million (C

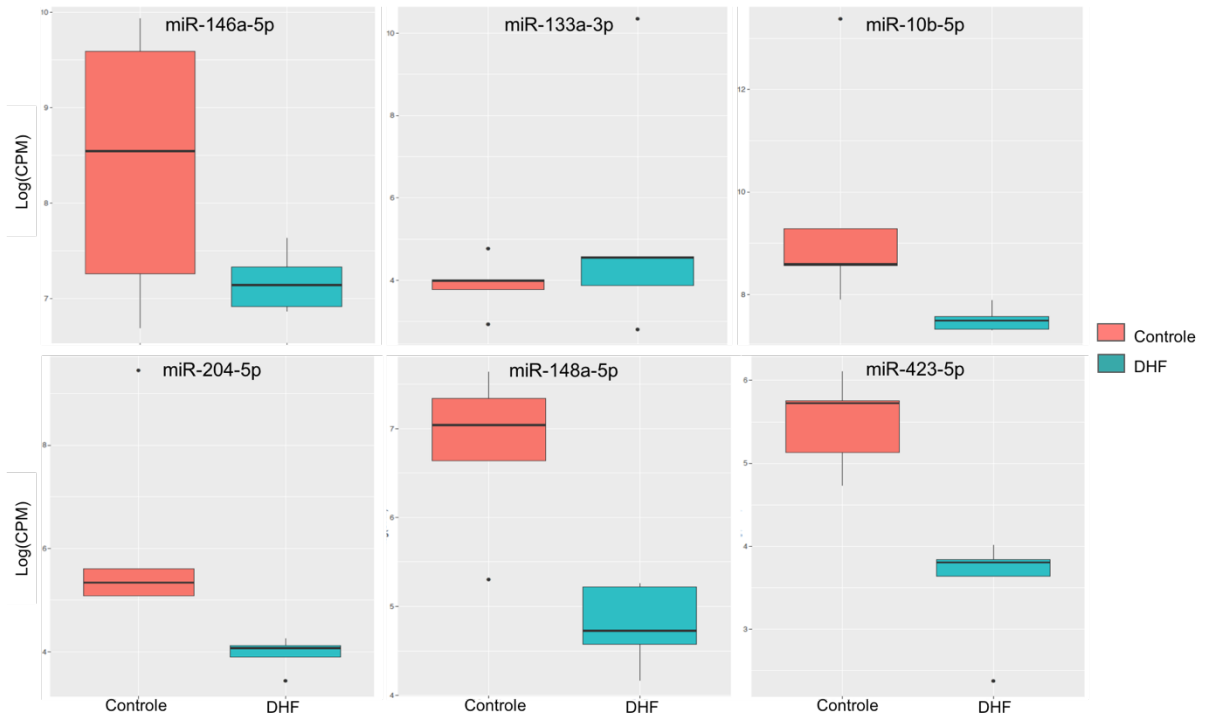
miRNA ID	logFC	logCPM	GLM Test		Controls (CPM expression)					Dengue Hemorrhagic Fever (CPM expression)				D
			PValue	FDR	Control 63	Control 81	Control 94	Control 13	Control 14	Dhf_173	Dhf_198	Dhf_236	Dhf_255	
<b>hsa-miR-133a-3p</b>	<b>6,7767</b>	<b>11,6553</b>	<b>0,00000000</b>	<b>0,00000000</b>	<b>43,72</b>	<b>118,21</b>	<b>54,42</b>	<b>55,28</b>	<b>18,91</b>	<b>16,51</b>	<b>48,33</b>	<b>96,63</b>	<b>31503,26</b>	
<b>hsa-miR-122-5p</b>	<b>-6,5937</b>	<b>16,7992</b>	<b>0,00000000</b>	<b>0,00000000</b>	<b>105405,02</b>	<b>10267,63</b>	<b>15628,35</b>	<b>726378,27</b>	<b>271308,42</b>	<b>4568,23</b>	<b>10,36</b>	<b>1269,06</b>	<b>2150,65</b>	
<b>hsa-miR-10b-5p</b>	<b>-6,1663</b>	<b>16,0610</b>	<b>0,00000000</b>	<b>0,00000001</b>	<b>650029,31</b>	<b>5401,20</b>	<b>2727,72</b>	<b>10745,30</b>	<b>5262,59</b>	<b>1934,44</b>	<b>2651,49</b>	<b>1518,15</b>	<b>1792,91</b>	
<b>hsa-miR-204-5p</b>	<b>-5,6317</b>	<b>10,4449</b>	<b>0,00000000</b>	<b>0,00000013</b>	<b>12761,74</b>	<b>208,28</b>	<b>161,09</b>	<b>160,83</b>	<b>272,59</b>	<b>61,53</b>	<b>31,07</b>	<b>49,39</b>	<b>70,70</b>	
<b>hsa-miR-126-5p</b>	<b>3,0933</b>	<b>13,6270</b>	<b>0,00007561</b>	<b>0,00675425</b>	<b>4103,75</b>	<b>903,48</b>	<b>3657,28</b>	<b>713,67</b>	<b>3874,07</b>	<b>24969,17</b>	<b>13896,14</b>	<b>34649,08</b>	<b>17659,07</b>	<b>2</b>
<b>hsa-miR-148a-5p</b>	<b>-3,1354</b>	<b>9,3225</b>	<b>0,00008324</b>	<b>0,00721739</b>	<b>201,48</b>	<b>1548,03</b>	<b>766,29</b>	<b>1140,87</b>	<b>2082,79</b>	<b>184,59</b>	<b>96,67</b>	<b>64,42</b>	<b>192,30</b>	
<b>hsa-miR-146a-5p</b>	<b>-2,6476</b>	<b>12,2746</b>	<b>0,00057794</b>	<b>0,03872188</b>	<b>5139,67</b>	<b>1415,74</b>	<b>803,30</b>	<b>14655,42</b>	<b>20727,72</b>	<b>1260,61</b>	<b>2064,57</b>	<b>1007,09</b>	<b>1529,92</b>	
<b>hsa-miR-423-5p</b>	<b>-2,7806</b>	<b>7,2592</b>	<b>0,00070059</b>	<b>0,04589619</b>	<b>114,05</b>	<b>315,23</b>	<b>450,63</b>	<b>306,58</b>	<b>169,12</b>	<b>46,52</b>	<b>37,98</b>	<b>10,74</b>	<b>55,14</b>	
hsa-miR-223-3p	2,5945	7,4584	0,00134798	0,07497797	38,02	19,70	84,90	25,13	70,09	415,70	307,27	446,64	134,33	
hsa-miR-142-3p	2,3451	9,8276	0,00226425	0,10942615	167,27	481,30	182,86	291,50	369,38	1437,70	3162,45	1479,50	695,67	
hsa-miR-338-3p	2,3752	8,1973	0,00257502	0,12243787	205,28	64,74	41,36	80,41	70,09	267,13	324,53	1056,48	257,34	
hsa-miR-193b-3p	-2,3916	6,9823	0,00332657	0,14002844	55,12	543,22	315,66	50,26	90,12	49,52	24,17	19,33	56,56	
hsa-miR-378a-5p	-2,5167	5,9155	0,00337246	0,14002844	53,22	92,88	84,90	45,23	186,92	16,51	13,81	6,44	19,80	
hsa-miR-144-5p	2,1186	9,4112	0,00554004	0,21489512	606,34	53,48	422,33	100,52	87,90	313,65	2606,61	1294,83	709,81	
hsa-miR-15a-5p	2,0464	9,4565	0,00716388	0,26733075	389,66	70,36	468,05	75,39	338,23	1134,55	417,75	1533,18	957,26	
hsa-miR-320a	-1,9509	8,9860	0,01069315	0,37222214	243,30	1967,40	1179,91	532,74	130,17	348,17	283,10	94,48	131,50	
hsa-miR-7641	2,0813	6,4534	0,01161616	0,37222214	100,74	8,44	6,53	15,08	21,14	219,11	138,10	88,04	69,28	
hsa-miR-146b-5p	-1,8673	14,0306	0,01222926	0,38100765	12121,18	5533,49	3574,56	34839,30	75259,55	5240,55	12781,00	6081,20	5756,27	
hsa-miR-500a-3p	-2,0466	6,3821	0,01309387	0,39084339	239,50	84,44	95,79	80,41	136,85	16,51	34,52	32,21	38,18	
hsa-miR-218-5p	1,9802	6,3473	0,01670700	0,42828028	66,53	28,15	17,42	30,16	18,91	25,51	248,58	212,58	63,63	
hsa-miR-199b-5p	1,8547	7,9577	0,01706409	0,43366336	125,45	140,73	71,84	145,75	50,07	132,06	583,47	418,73	329,46	
hsa-miR-218-5p	1,9670	6,3365	0,01744434	0,43581286	66,53	28,15	17,42	30,16	18,91	24,01	248,58	208,29	63,63	
hsa-miR-374b-5p	-1,8475	7,6385	0,01788233	0,43930932	395,36	36,59	100,14	165,85	778,82	133,57	55,24	49,39	73,53	
hsa-miR-30c-2-3p	-1,9744	5,9885	0,01870760	0,45578510	159,66	112,58	39,19	135,70	63,42	19,51	55,24	12,88	26,87	
hsa-miR-10a-5p	-1,6986	15,7999	0,02199444	0,50655939	192902,94	40437,23	44867,03	75056,27	82829,67	35304,70	32722,39	32871,11	13728,24	<b>1</b>
hsa-miR-148a-3p	-1,6238	14,3892	0,02815700	0,58108723	8283,53	10912,17	42391,83	16268,73	84055,76	14728,18	2585,89	4713,36	19419,47	<b>1</b>
hsa-miR-409-3p	-1,7391	6,6107	0,03149254	0,62308739	15,21	298,35	176,33	155,80	114,60	21,01	65,60	32,21	60,80	
hsa-miR-335-5p	-1,7118	6,8524	0,03215285	0,63191072	106,44	14,07	84,90	145,75	470,63	61,53	41,43	42,95	35,35	
hsa-miR-378a-3p	-1,5799	12,5734	0,03278822	0,64001420	3371,96	16625,79	11557,45	7106,57	7000,47	2582,76	897,64	1090,84	7994,59	
hsa-miR-144-3p	1,5483	10,8107	0,03749770	0,70409695	3138,16	106,95	659,62	417,15	248,11	697,84	6128,11	2890,29	1716,56	
hsa-miR-374a-5p	-1,5795	8,2924	0,03871920	0,70897023	406,76	39,40	71,84	392,02	1369,61	186,09	179,53	130,99	125,84	
hsa-miR-141-3p	1,5114	11,3514	0,04163799	0,74141550	4662,58	244,87	400,56	1065,48	392,75	397,69	3804,61	6723,25	2270,84	
hsa-miR-98-5p	-1,5176	9,6444	0,04225163	0,74141550	1366,65	166,06	574,72	1015,22	2748,12	666,32	345,25	304,92	446,81	
hsa-let-7f-2-3p	-1,7226	5,0514	0,04197370	0,74141550	38,02	25,33	39,19	60,31	65,64	21,01	6,90	8,59	18,38	
hsa-miR-92b-3p	1,5835	7,1985	0,04409139	0,76012525	150,16	53,48	93,61	15,08	30,04	91,54	110,48	171,79	500,55	
hsa-miR-27a-3p	1,4795	9,9809	0,04714703	0,76789743	657,66	185,76	711,86	246,27	840,01	1229,10	1491,46	1893,93	1600,61	
hsa-miR-30a-5p	-1,4517	15,4442	0,04867298	0,78839536	199781,80	18477,79	20108,53	37050,68	51016,01	15208,41	33426,69	28655,93	22145,60	<b>1</b>



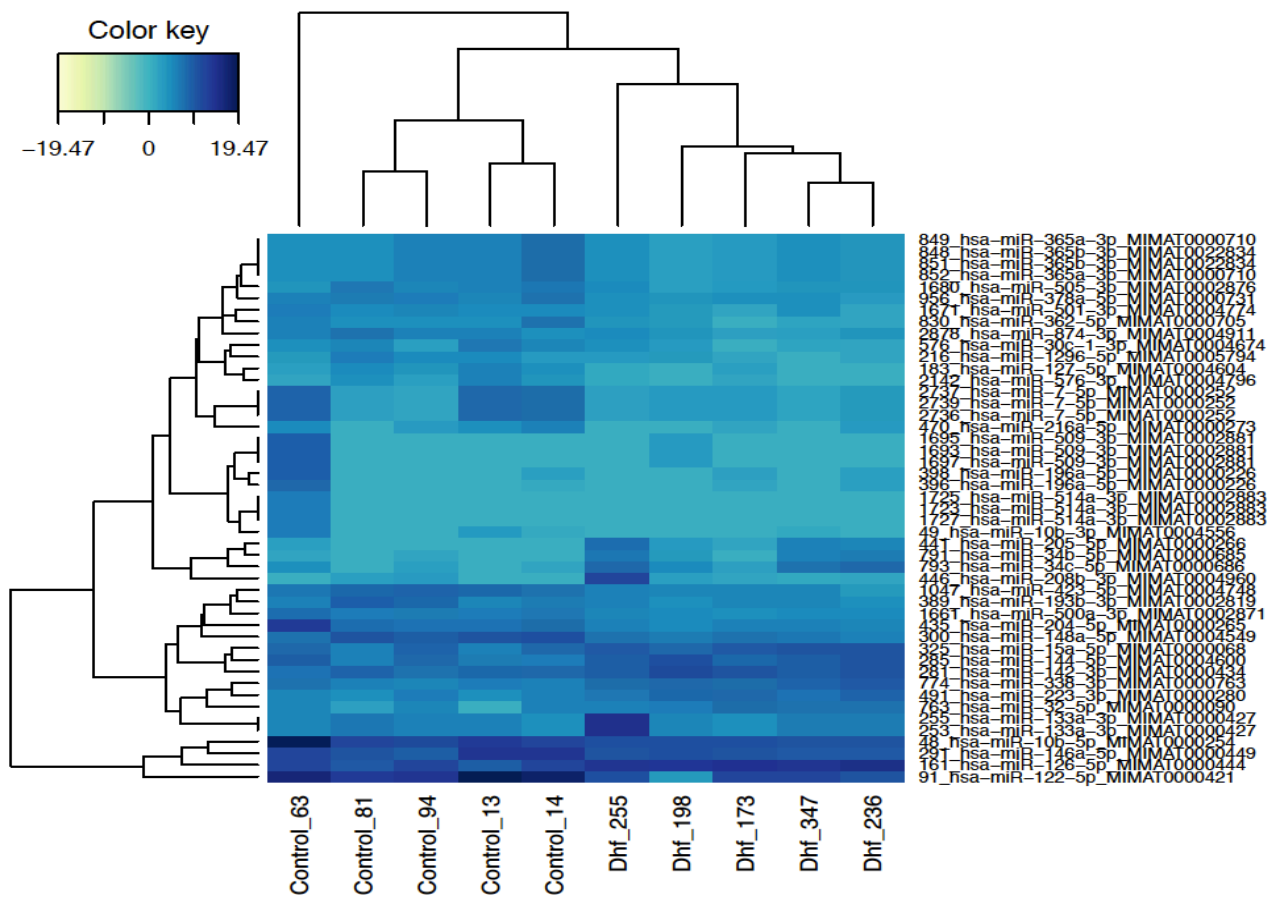
**Figure 1.** Expression of hsa-miR-126-5p in human hepatic tissue from dengue hemorrhagic fever (Dhf) fata cases and controls. Showing the strong positive regulation in Dhf group (logFC = 3,09; FDR = 0,00675).



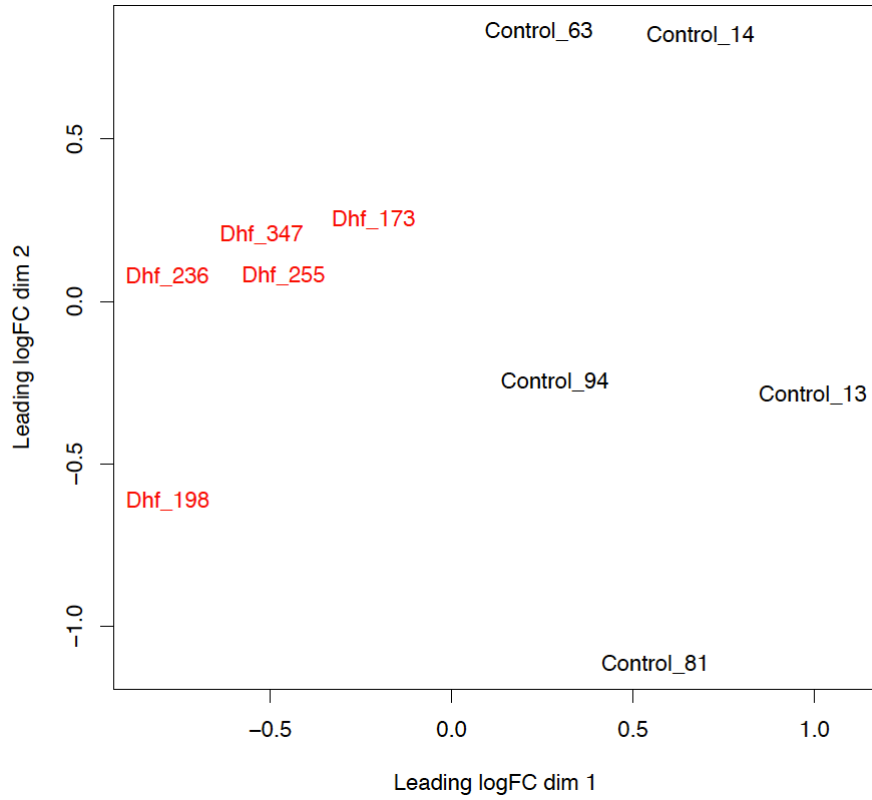
**Figure 2.** Expression of hsa-miR-122-5p in human hepatic tissue from dengue hemorrhagic fever (Dhf) fata cases and controls. Showing the strong negative regulation in Dhf group. Expression values in log(CPM), logFC = -6,59; FDR < 0,00000001.



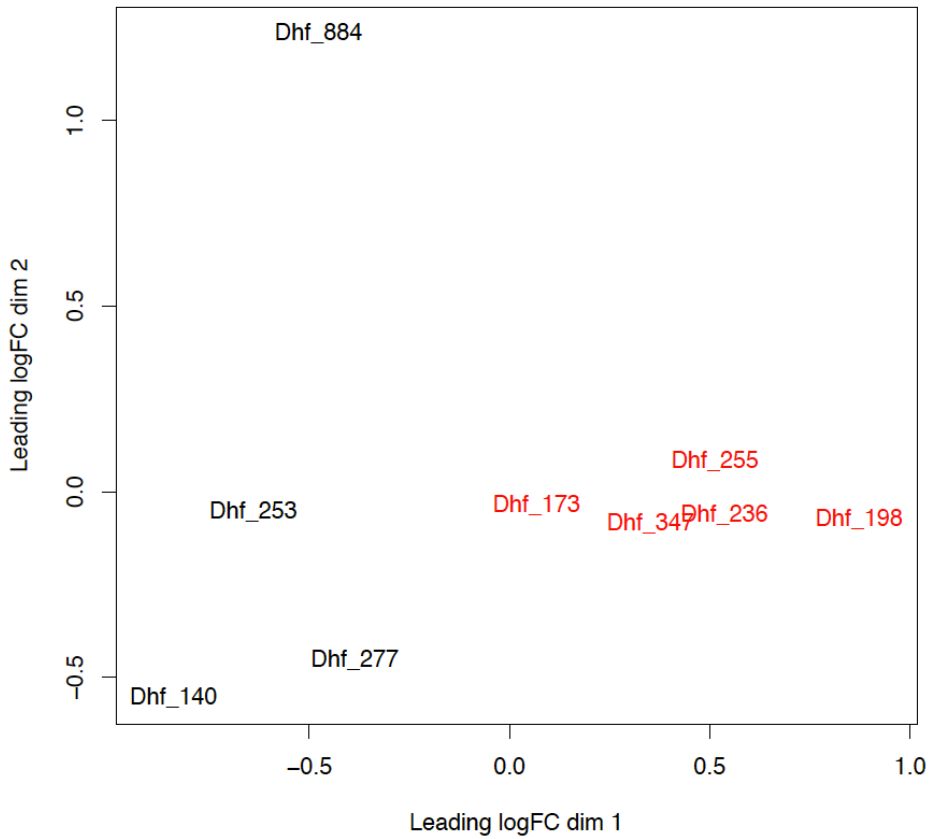
**Figure 3.** Boxplot of six differentially expressed miRNAs in liver of dengue hemorrhagic fever (DHF) fatal cases. miR-146a-5p: logFC = -2,6476 e FDR = 0,0387; miR-10b-5p: logFC = -6,1663 e FDR < 0,00000001; miR-204-5p: logFC = -5,6317 e FDR < 0,000001; miR-148a-5p: logFC = -3,1354 e FDR = 0,00722; miR-423-5p: logFC = -2,7806 e FDR = 0,04589.



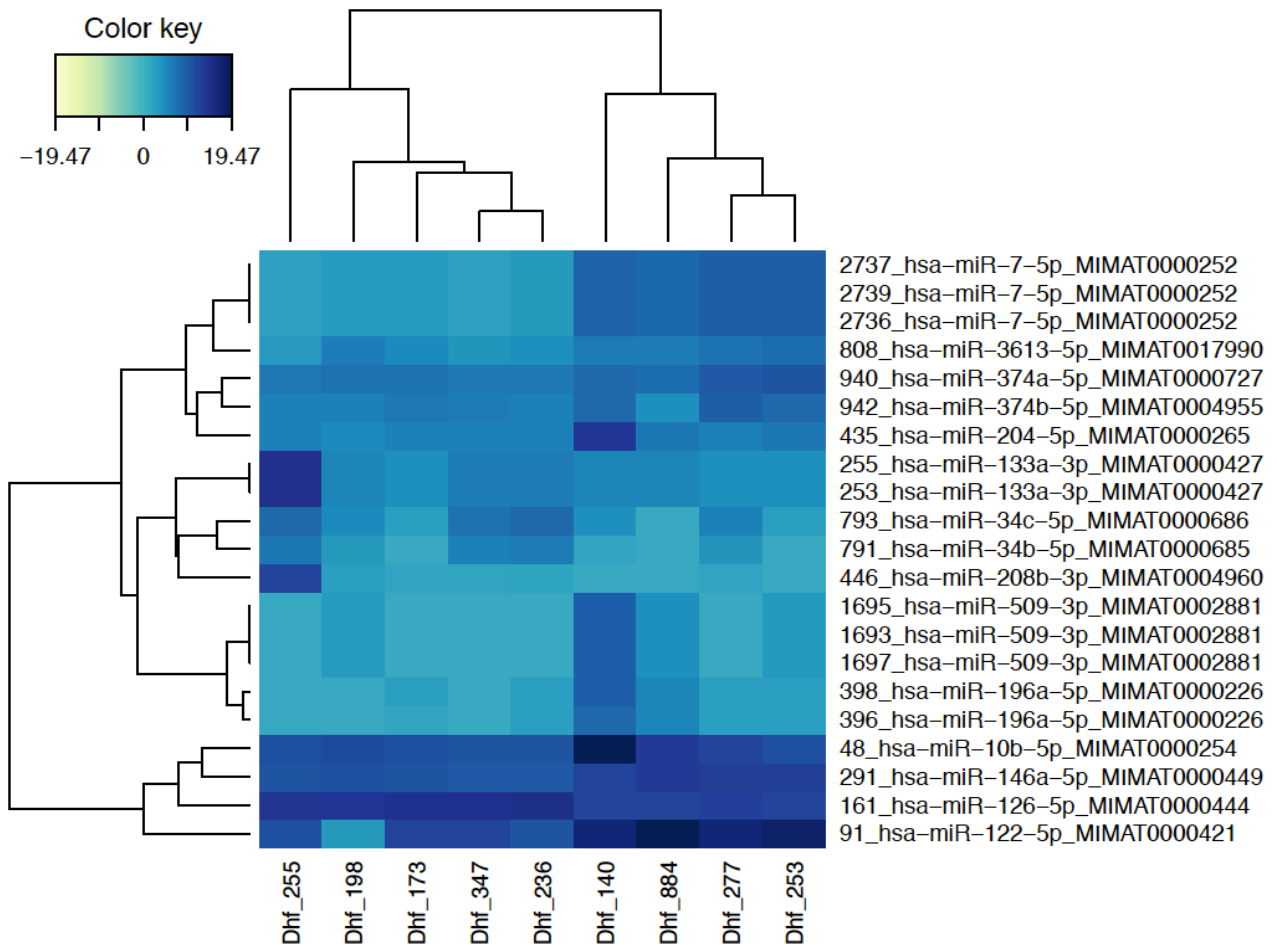
**Figure 4.** Heatmap analysis of CPM values from differentially expressed microRNAs with the lowest FDR values in Fisher Exact Test. (DHF - dengue hemorrhagic fever).



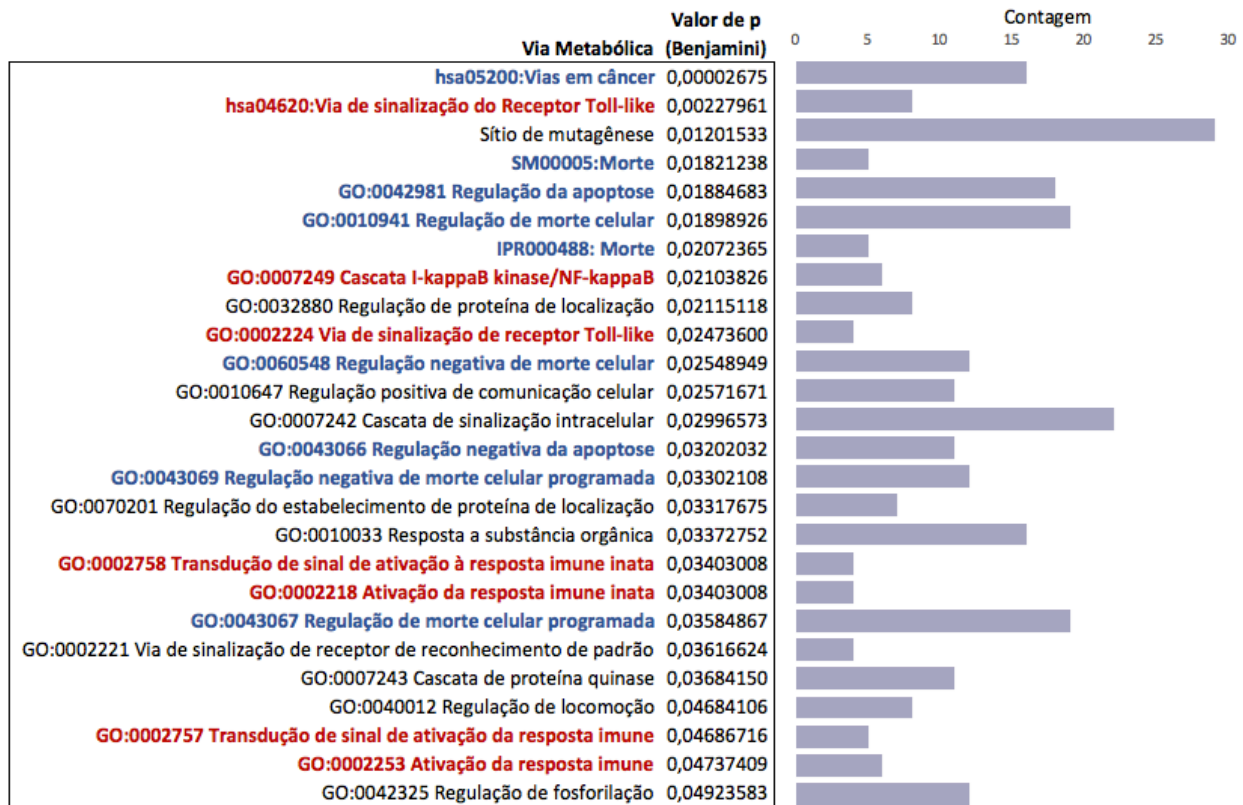
**Figure 5.** Bidimensional MDS analysis, with logFC (fold change) values, highlighting the DHF (dengue hemorrhagic fever) samples clustering and apart from control samples.



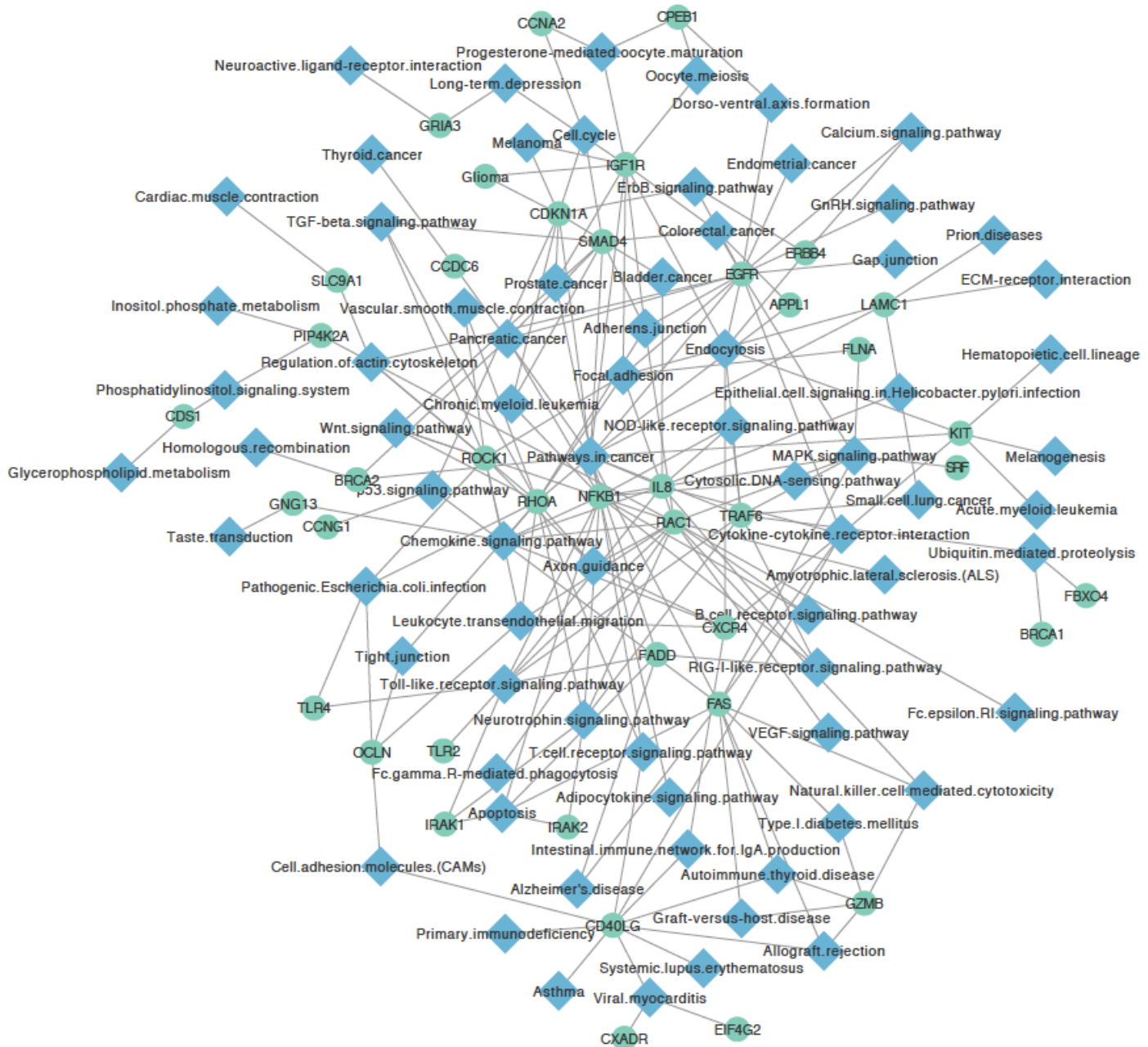
**Figure 6.** Bidimensional MDS analysis, with logFC (fold change) values, from DHF (dengue hemorrhagic fever) samples. Observe the clustering of samples less than 30 years old (black) and samples more than 30 years old (red coloured).



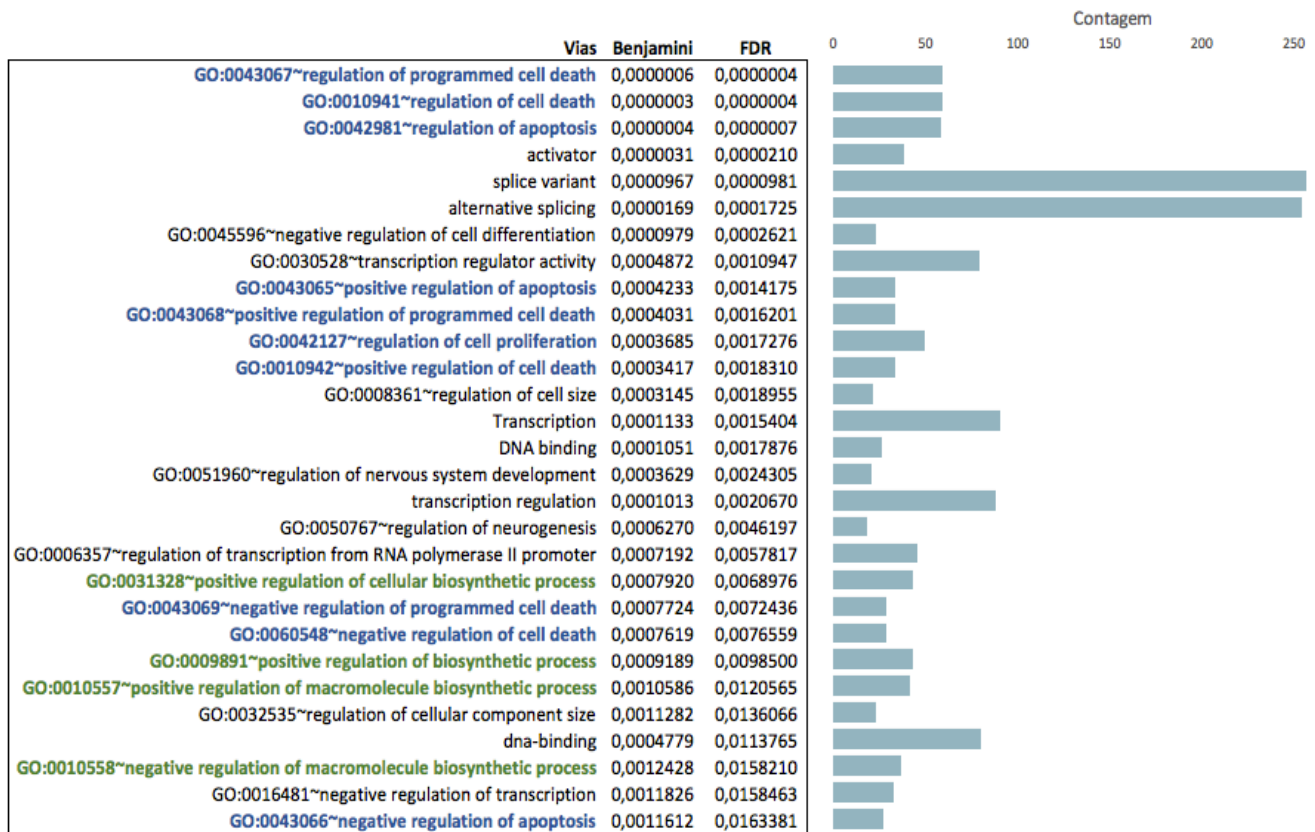
**Figure 7.** Heatmap analysis of CPM values shows samples clustering and differentially expressed microRNAs with the lowest FDR values in Fisher Exact Test in dengue hemorrhagic fever (Dhf). Two groups were constituted of less than 30 years old (Dhf\_140, Dhf\_253, Dhf\_277 e Dhf\_884) and more than 30 yearsold (Dhf\_173, Dhf\_198, Dhf\_255, Dhf\_236 e Dhf\_347).



**Figura 8.** Anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos, regulados positivamente no tecido hepático do grupo de dengue hemorrágica, lista de vias mais os resultados estatísticos. Azul: vias de morte celular; vermelho: vias de resposta imune.



**Figura 9.** Rede de interações entre genes alvo dos miRNAs superexpressos na dengue hemorrágica com vias metabólicas obtidas na análise funcional do banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Termos das vias em azul e símbolo oficial do gene em verde.



**Figura 10.** Anotação funcional dos genes alvo dos miRNAs diferencialmente expressos, regulados negativamente no tecido hepático do grupo de dengue hemorrágica, lista de vias mais os resultados estatísticos das 30 primeiras vias com menor valor de p ajustado pelo método Benjamini-Hochberg (FDR). Azul: vias de morte celular; verde: vias biossintéticas.



## ANEXO 2

Artigos publicados em revistas científicas internacionais por meio de colaborações estabelecidas ao longo dos quatro anos de doutorado (2012 a 2016). Os trabalhos desenvolvidos são da mesma área de estudo do projeto de doutorado desenvolvido e contribuíram significativamente para meu amadurecimento intelectual na área de genômica, virologia e arbovirologia. Abaixo a lista por ordem de relevância e os artigos completos estão anexados a seguir:

Faria, N. R. Azevedo, R. D. S. D. S. Kraemer, M. U. G. Souza, R. Cunha, M. S. Hill, S. C. Theze, J. Bonsall, M. B. Bowden, T. A. Rissanen, I. Rocco, I. M. Nogueira, J. S. Maeda, A. Y. Vasami, F. G. D. S. Macedo, F. L. D. L. Suzuki, A. Rodrigues, S. G. Cruz, A. C. R. Nunes, B. T. Medeiros, D. B. D. A. Rodrigues, D. S. G. Nunes Queiroz, A. L. Silva, E. V. P. D. Henriques, D. F. Travassos Da Rosa, E. S. , Oliveira, L. F., et al. ; Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science** (New York, N.Y.), v. 351, p. 1, 2016.

Nunes, M. R. T. ; Faria, N. R. ; Vasconcelos, Jm. ; Golding, N. ; Kraemer, M. U. G. ; Oliveira, Layanna Freitas De ; Azevedo, R. S. ; Silva, D. E. A. ; Pinto, E. V. ; Silva, S. P. ; Carvalho, V. L. ; Coelho, G. E. ; Cruz, A. C. R. ; Rodrigues, S. G. ; Vianez Junior, J. L. S. G. ; Nunes, B. T. D. ; Cardoso, J. F. ; Tesh, R. ; Hay, S. I. ; Pybus, O. G. ; Vasconcelos, P. F. . Emergence and potential for spread of Chikungunya virus in Brazil. **BMC Medicine**, v. 13, p. 102, 2015.

Lemos, Poliana Da Silva; Monteiro, Hamilton Antônio De Oliveira ; Castro, Francisco Corrêa ; Lima, Clayton Pereira Silva De ; Silva, Daisy Elaine Andrade Da ; Vasconcelos, Janaína Mota De ; Oliveira, Layanna Freitas De ; Silva, Sandro Patroca Da ; Cardoso, Jedson Ferreira ; Vianez Júnior, João Lídio Da Silva Gonçalves ; Nunes, Márcio Roberto Teixeira . Characterization of mitochondrial genome of *Haemagogus janthinomys* (Diptera: Culicidae). **Mitochondrial DNA**, v. 4, p. 1-2, 2015.

Oliveira, L. F.; Lima, Cps.; Azevedo, R. S.; Mendonca, D. S. F. ; Rodrigues, S. G. ; Carvalho, V. L. ; Pinto, E. V. ; Maia, A.L. ; Maia, M. H. ; Vasconcelos, Jm. ; Silva, A. L. S. ; Nunes, M. R. T. ; Sena, L. ; Vasconcelos, P. F. ; Santos, Ejm. . Polymorphism of DC-SIGN (CD209) Promoter in Association with Clinical Symptoms of Dengue Fever. **Viral Immunology**, v. 27, p. 140505082141006, 2014.

Vasconcelos, Janaina Mota De ; Mória, Lizomar De Jesus Maués Pereira ; Amaral, Ivanete Do Socorro Abraçado ; Miranda, Esther Castello Branco Mello ; Cicalisetakeshita, Louise Yukari ; Oliveira, Layanna Freitas De ; Mendes, Lilian De Araújo Melo ; Sastre, Danuta ; Tamegão-Lopes, Bruna Pedrosa ; Pedroza, Larysse Santa Rosa De Aquino ; Santos, Sidney Emanuel Batista Dos ; Soares, Manoel Do Carmo Pereira ; Araújo, Marialva Tereza Ferreira De ; Bandeira, Camila Lucas ; Silva, Adriana Maria Paixão De Sousa Da ; Medeiros, Zilene Lameira De ; Sena, Leonardo ; Demachki, Samia ; Santos, Eduardo José Melo Dos . Association of killer cell immunoglobulin-like receptor polymorphisms with chronic hepatitis C and responses to therapy in Brazil. **Genetics and Molecular Biology (Impresso)**, v. 36, p. 022-027, 2013.

Wanzeller, A. L. M. ; Martins, L. C. ; Diniz Junior, J. A. P. ; De Almeida Medeiros, D. B. ; Cardoso, J. F. ; Da Silva, D. E. A. ; De Oliveira, L. F. ; De Vasconcelos, J. M. ; Nunes, M. R. T. ; Vianez Junior, J. L. D. S. G. ; Vasconcelos, P. F. C. . Xiburema Virus, a Hitherto Undescribed Virus within the Family Rhabdoviridae Isolated in the Brazilian Amazon Region. **Genome Announcements**, v. 2, p. e00454-14-e00454-14, 2014.

Medeiros, D. B. D. A. ; Diniz Junior, J. A. P. ; Cardoso, J. F. ; Silva, S. P. ; Da Silva, D. E. A. ; De Oliveira, L. F. ; E Vasconcelos, J. M. ; Chiang, J. O. ; Dias, A. A. ; Nunes, M. R. T. ; Vianez Junior, J. L. D. S. G. ; Vasconcelos, P. F. C. . Nearly Complete Genome Sequence of Curionópolis Virus, a

Culicoides-Related Rhabdovirus Isolated in the Brazilian Amazon Region. **Genome Announcements**, v. 2, p. e01158-14-e01158-14, 2014.

Rodrigues, D. S. G. ; Medeiros, D. B. D. A. ; Rodrigues, S. G. ; Martins, L. C. ; De Lima, C. P. S. ; De Oliveira, L. F. ; De Vasconcelos, J. M. ; Da Silva, D. E. ; Cardoso, J. F. ; Da Silva, S. P. ; Vianez-Junior, J. L. D. S. G. ; Nunes, M. R. T. ; Vasconcelos, P. F. D. C. . Pacui Virus, Rio Preto da Eva Virus, and Tapirape Virus, Three Distinct Viruses within the Family Bunyaviridae. **Genome Announcements**, v. 2, p. e00923-14-e00923-14, 2014.

Nunes, M. R. T. ; Chiang, J. O. ; De Lima, C. P. S. ; Martins, L. C. ; Aragao Dias, A. ; Cardoso, J. F. ; Silva, S. P. ; Da Silva, D. E. A. ; Oliveira, L. F. ; Vasconcelos, J. M. ; Ferreira, J. P. C. ; Travassos Da Rosa, A. P. A. ; Guzman, H. ; Tesh, R. B. ; Vasconcelos, P. F. C. . New Genome Sequences of Gamboa Viruses (Family Bunyaviridae, Genus Orthobunyavirus) Isolated in Panama and Argentina. **Genome Announcements**, v. 2, p. e00940-14-e00940-14, 2014.

Mcculloch, J. A. ; De Oliveira, V. M. ; De Almeida Pina, A. V. ; Perez-Chaparro, P. J. ; De Almeida, L. M. ; De Vasconcelos, J. M. ; De Oliveira, L. F. ; Da Silva, D. E. A. ; Rogez, H. L. G. ; Cretenet, M. ; Mamizuka, E. M. ; Nunes, M. R. T. . Complete Genome Sequence of Lactococcus lactis Strain AI06, an Endophyte of the Amazonian Acai Palm. **Genome Announcements**, v. 2, p. e01225-14-e01225-14, 2014.

Nunes, Márcio R. T. ; Silva, Sandro P. ; Carvalho, Valéria L. ; Vasconcelos, Janaina M. ; Da Silva, Daisy E. A. ; Oliveira, Layanna F. ; Nunes Neto, Joaquim P. ; Rodrigues, Sueli G. ; Azevedo, Raimunda S. S. ; Monteiro, Hamilton A. O. ; Cardoso, Jedson F. ; Guzman, Hilda ; Tesh, Robert ; Vasconcelos, Pedro F. C. ; Vianez-Júnior, João L. S. G. ; Martins, Lívia C. . Emergence of New Insect-Restrictive Viruses in the Amazon Region. **Genome Announcements**, v. 3, p. e00131-15, 2015.

Wanzeller, Ana Lucia M. ; Nunes, Márcio R. T. ; Tavares, Fernando N. ; Pinto, Walber V. M. ; Júnior, Edivaldo C. ; De Lima, Clayton P. S. ; De Oliveira, Layanna F. ; Júnior, João Lídio S. G. V. ; Cardoso, Jedson F. ; Vasconcelos, Pedro F. C. . Inhangapi Virus: Genome Sequencing of a Brazilian Ungrouped Rhabdovirus Isolated in the Amazon Region. **Genome Announcements**, v. 4, p. e01525-15, 2016.