



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



ANGÉLICA CARDOSO CARLOS

**MicroRNA no vírus Epstein-Barr: identificação,
predição de alvos e rede de proteínas**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

João Pessoa - PB

2017



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Centro de Ciências Exatas e da
Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



ANGÉLICA CARDOSO CARLOS

**MicroRNA no vírus Epstein-Barr: identificação,
predição de alvos e rede de proteínas**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Ciências Exatas e da
Natureza, da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos para
obtenção do título de MESTRE EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR.

Orientador: Prof. Dr. JOSE PINTO DE SIQUEIRA JUNIOR

Coorientador: Prof. Dr. SÁVIO TORRES DE FARIAS

João Pessoa - PB

2017

C284m Carlos, Angélica Cardoso.

MicroRNA no vírus Epstein-Barr: identificação, predição de alvos e rede de proteínas / Angélica Cardoso Carlos. - João Pessoa, 2017.

83 f. : il.

Orientador: Jose Pinto de Siqueira Junior.

Coorientador: Sávio Torres de Farias.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN

1. Biologia celular e molecular. 2. MicroRNA. 3. Vírus Epstein-Barr. I. Título.

UFPB/BC

CDU 576+577.2(043)



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Centro de Ciências Exatas e da
Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



ANGÉLICA CARDOSO CARLOS

Dissertação de Mestrado avaliada em 27 de outubro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. JOSE PINTO DE SIQUEIRA JUNIOR
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
da Paraíba
Orientador

Prof. Dr. Dr. SÁVIO TORRES DE FARIAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
da Paraíba
Coorientador

Prof. Dr. DAVI FELIPE FARIAS
Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Profa. Dra. PATRÍCIA MIRELLA DA SILVA SCARDUA
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal
da Paraíba
Examinadora Interna

DEDICO este trabalho aos meus pais, Agailton e Íria, por serem minha força e incentivo e que com muita compreensão e amor proporcionaram a conclusão desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu refúgio e fortaleza!

Aos meus irmãos, Aline e Alex por estarem sempre junto e na torcida.

A Caio, por toda ajuda, apoio, incentivo e por compreender minha ausência.

Aos meus amigos que souberam entender toda a minha falta de tempo.

Ao Prof. Dr. Jose Pinto de Siqueira Junior que mesmo sem me conhecer aceitou me orientar.

Ao Prof. Dr. Sávio Torres de Farias por sempre procurar meios de me ajudar. Obrigada pela confiança e paciência.

Ao Prof. Dr. Vinicius Ramos Henriques Maracaja Coutinho por toda ajuda.

Ao Prof. Dr. Rómulo Marino LLamoca Zárate pela troca de experiências, conversas e pelos muitos ensinamentos.

Aos meus colegas do laboratório de genética evolutiva Paulo Leminsk pelas conversas e ajuda. Em especial a Camila Eduarda, Joana Kästle, Vanessa Pontes e ao pós-doc. Victor Serrano por disponibilizarem do seu tempo para me ajudar.

Aos meus colegas de turma, em especial a turma dos “bancários” (Sarah, Vanessa, Laisa, Giulian, Alesson e Mayara) que se tornaram as melhores pessoas que conheci, onde encontrei apoio e incentivo para prosseguir. Não tenho dúvida de que esse laço de amizade nunca será desatado. Em especial a Larissa Rodrigues pela hospedagem, incentivo, conselhos e por toda ajuda, a Francielly Negreiros pelas conversas e a Diana Pontes pela convivência agradável.

Aos professores do Programa de Biologia Celular e Molecular pelos ensinamentos ao longo do mestrado. Em especial a professora Krystyna Lira e a Glaucia Faheina por toda ajuda.

A dona Regina Miranda, Ludmilla Maul, dona Geralda Santana e seu Bosco Carlos por serem tão prestativos.

Aos professores examinadores, membros da banca que foram tão solícitos em atenderem meu convite, desprendendo seu tempo na correção e avaliação desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

CARLOS, Angélica Cardoso. **MicroRNA no vírus Epstein-Barr: identificação, predição de alvos e rede de proteínas.** 2017. Dissertação (Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2017).

Os microRNAs são de grande interesse em estudos sobre infecções virais. No contexto do vírus Epstein-Barr (EBV), eles atuam como importantes reguladores da expressão de genes virais e celulares, facilitando a persistência viral e a oncogênese. O presente trabalho objetiva identificar microRNAs virais, seus mRNAs alvos e as proteínas alvos essenciais específicas para o *Human gammaherpesvirus 4 tipo 2*. Primeiramente, utilizamos os programas *StructRNAfinder* e o *IntaRNA* para realizar as tarefas de identificação de miRNAs e mRNAs alvos, respectivamente. Posteriormente, criamos uma rede de proteínas a partir dos dados obtidos da ferramenta *online virusmentha* e visualizamos no programa *cytoscape*. Além disso, realizamos uma análise topológica da rede de interação de proteínas com a ferramenta *cytoscape*. Encontramos 55 miRNAs virais e 46 mRNAs e identificamos 10 proteínas que se destacavam na rede de interação de proteínas. As proteínas BTRF1 e BSRF1 exercem um maior controle na rede de proteínas, embora sejam proteínas do tegumento com funções desconhecidas. Assim, sugerimos que as proteínas BTRF1 e BSRF1 sejam alvos potenciais para compreender e controlar as infecções por EBV.

Palavras-chave: microRNA, vírus Epstein-Barr, BTRF1 e BSRF1.

ABSTRACT

CARLOS, Angélica Cardoso. **MicroRNA in the Epstein-Barr virus: identification, target prediction and protein network**. 2017. Dissertation (Center for Exact and Nature Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa - PB, 2017).

The microRNAs are of great interest in studies on viral infections. In the context of the Epstein-Barr virus (EBV), they act as important regulators of the expression of viral and cellular genes, facilitating viral persistence and oncogenesis. The present work aims to identify viral microRNAs, their target mRNAs and the essential target proteins specifically for Human gammaherpesvirus 4 tipo 2. First, we used the StructRNAfinder and IntaRNA programs to perform the identification tasks of miRNAs and target mRNAs, respectively. Subsequently, we created a network of proteins from the data obtained from the tool online virusmentha and visualized in the program cytoscape. In addition, we performed a topological analysis of the protein interaction network with the cytoscape tool. We found 55 viral miRNAs and 46 mRNAs and identified 10 proteins that were prominent in the protein interaction network. The BTRF1 and BSFR1 proteins exert a greater control in the protein network, although they are proteins of the integument with unknown functions. Thus, we suggest that the BTRF1 and BSFR1 proteins are potential targets for understanding and controlling EBV infections.

Keywords: microRNA, Epstein-Barr virus, BTRF1 and BSFR1.

LISTA DE ABREVIATURAS

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

DNA - Ácido desoxirribonucleico

RNA - Ácido ribonucleico

RdRP - RNA polimerase RNA dependente

RNAi - RNA de interferência

EBV - Vírus Epstein-Barr

miRNA - microRNA

pri-miRNA - microRNA primário

pré-miRNA – precursores de microRNA

dsRNA - RNA dupla fita

AGO – proteína Argonauta

RISC - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

KSHV - Vírus do Herpes associado ao Sarcoma de Kaposi

LAT - *Latency Associated Transcripts*

PPI - Interação Proteína-Proteína

NCBI - *National Center of Biotechnology Information*

SCFG - Contexto estocástico livre do contexto da gramática

WUSS - *Washington University Secondary Structure notation*

MFE - *Minimum Free Energy*

Uniprot - *Universal Protein Resource*

CDS - *Coding DNA Sequence*

mRNA - RNA mensageiro

nt - nucleotídeos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia viral.....	15
Figura 2 - Classificação de Baltimore.....	19
Figura 3 - Ciclo de replicação do vírus herpes simples (HSV) representante da família <i>Herpesviridae</i>	26
Figura 4 - Interação miRNA:mRNA e estrutura do pré-miRNA.....	31
Figura 5 - Visão geral da via canônica de biogênese dos miRNAs.....	32
Figura 6 - Variação no tamanho dos pré-miRNAs preditos.....	50
Figura 7 - Taxonomia da estrutura secundária dos miRNAs preditos.....	51
Figura 8 - Número de membros dos pré-miRNAs preditos em cada família de miRNA identificada.....	52
Figura 9 - Valores de energia mínima livre (MFE) encontradas para todos os genes do vírus Epstein-Barr.....	53
Figura 10 - Quantidade de miRNA para cada mRNA alvo.....	54
Figura 11 - Rede de interação de proteínas.....	58
Figura 12 - Rede randômica.....	59
Figura 13 - Porcentagem de proteínas pelo valor de <i>degree</i>	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proteínas estruturais conservadas nos herpesvírus.....	23
Tabela 2 - MicroRNAs e suas respectivas funções nos herpesvírus.....	35
Tabela 3 - Candidatos a miRNA de <i>Human gammaherpesvirus 4 tipo 2</i> que apresentaram similaridade com miRNAs presentes no banco de dados Rfam.....	45
Tabela 4 - mRNA alvo e a respectiva função da proteína.....	56
Tabela 5 - Proteínas reconhecidas pelo Vírus Mentha.....	57
Tabela 6 - Alguns dos parâmetros analisados na ferramenta <i>Network Analyzer</i>	60
Tabela 7 - Proteínas <i>hubs</i> e valores de centralidade.....	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. VÍRUS.....	13
1.2. INFECÇÃO VIRAL.....	16
1.2.1. Adsorção.....	16
1.2.2. Penetração.....	16
1.2.3. Síntese dos componentes virais.....	17
1.2.3.1. Síntese protéica.....	19
1.2.3.2. Replicação viral.....	20
1.2.4. Maturação.....	20
1.2.5. Liberação.....	20
1.3. HERPESVÍRUS.....	21
1.3.1. Vírus Epstein-Barr.....	22
1.3.2. Infecção do vírus Epstein-Barr.....	24
1.3.3. Latência.....	27
1.4. RNA DE INTERFERÊNCIA.....	28
1.5. MicroRNA.....	29
1.5.1. Descoberta dos miRNAs.....	29
1.5.2. Aspectos gerais dos miRNAs.....	30
1.5.3. Biogênese do miRNA viral.....	32
1.5.4. Função dos miRNAs virais.....	34
1.5.5. MicroRNA nos Herpesvírus.....	35
1.6. Alvos terapêuticos.....	37
2. OBJETIVOS.....	39
2.1. OBJETIVO GERAL.....	39
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. DADOS DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS.....	40
3.2. PREDIÇÃO DOS microRNAs VIRAIS.....	40
3.3. PREDIÇÃO DOS mRNAs ALVOS.....	42
3.4. CONSTRUÇÃO DA REDE DE PROTEÍNAS.....	42
4. RESULTADO E DISCUSSÃO.....	45
4.1. PREDIÇÃO DOS miRNAs.....	45

4.2. ALVOS DOS miRNAs VIRAIS.....	53
4.3. REDE DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	57
5. CONCLUSÃO.....	67
6. REFERENCIAS.....	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. VÍRUS

Até o final do século XIX, muitas doenças eram descritas como sendo causadas por venenos, termo que no latim significa “*virus*”. Portanto, os vírus frequentemente estavam relacionados com doenças infecciosas, tais como: varíola, raiva e poliomielite (FLINT *et al.*, 2015). Embora não fosse possível ver o agente infeccioso, devido ao seu tamanho diminuto, pesquisadores como Louis Pasteur que na época estudava a doença da raiva, considerou que o agente causador da infecção era muito pequeno, se reproduzia e podia ser transmitido (LWOFF, 1957).

Os vírus são considerados os menores agentes infecciosos, podendo medir entre 18 nm a 300 nm, sendo, portanto, visíveis apenas ao microscópio eletrônico (RÁCZ; MENCK, 2005). Entretanto, pesquisas recentes despontam a existência de vírus gigantes, que podem ser visto em microscópio óptico, sendo a maioria pertencente às famílias *Mimiviridae* e *Marseilleviridae*, além dos *Pandoravirus*, *Pithovirus*, *Faustovirus* e *Mollivirus* (KHALIL; ANDREANI; LA SCOLA, 2016). Para efeito de comparação, o Mimivirus representante da família *Mimiviridae*, possui aproximadamente 750 nm (CLAVERIE; ABERGEL, 2009).

Os vírus são seres presentes em todos os organismos celulares. Sendo, portanto, as entidades biológicas mais abundantes e diversas na biosfera terrestre (KRISTENSEN *et al.*, 2010; FORTERRE, 2012; MOKILI; ROHWER; DUTILH, 2012). Apesar disso, poucas espécies têm sido identificadas e catalogadas. De acordo com o relatório do comitê internacional de taxonomia de vírus – ICTV (2017) existem 4.404 espécies de vírus, distribuídos entre 735 gêneros, 35 subfamílias, 122 famílias e 8 ordens.

Desde a sua descoberta, os vírus têm fascinado os cientistas de todo o mundo, devido tanto à sua infecciosidade quanto às suas peculiaridades, o que os tornam diferentes de todos os outros seres vivos. Por exemplo, os vírus podem infectar todos os tipos de células e, em alguns casos, uma mesma célula pode ser infectada por diferentes vírus simultaneamente (GREBER; BARTENSCHLAGER, 2017). Além disso, recentemente foram descobertos os virófagos, ou seja, vírus que infectam vírus. O papel dos virófagos ainda não foi completamente compreendido, mas sabe-se da sua

importância na regulação da população de seus hospedeiros e dos hospedeiros celulares (WODARZ, 2013).

Os vírus demarcam a linha entre os seres vivos e os não vivos. Isso porque são seres que só exibem as propriedades normalmente associada aos sistemas vivos: reprodução; crescimento ou desenvolvimento; uso de energia e respostas a estímulos ambientais, quando infectam células hospedeiras (SNUSTAD; SIMMONS, 2012). Dessa forma, tratam-se de parasitas intracelulares obrigatórios, não possuindo qualquer uma dessas propriedades fora das células hospedeiras.

Além disso, os vírus apresentam-se em dois estilos de vida ou formas: na forma extracelular, como uma partícula diminuta, contendo ácido nucléico envolto por proteínas, conhecidos como partícula viral ou vírion; nessa forma, eles são metabolicamente inertes, o que possibilita sua fácil transmissão de um hospedeiro para outro; e, na forma intracelular, quando ocorre a replicação viral no interior da célula hospedeira (MADIGAN *et al.*, 2010).

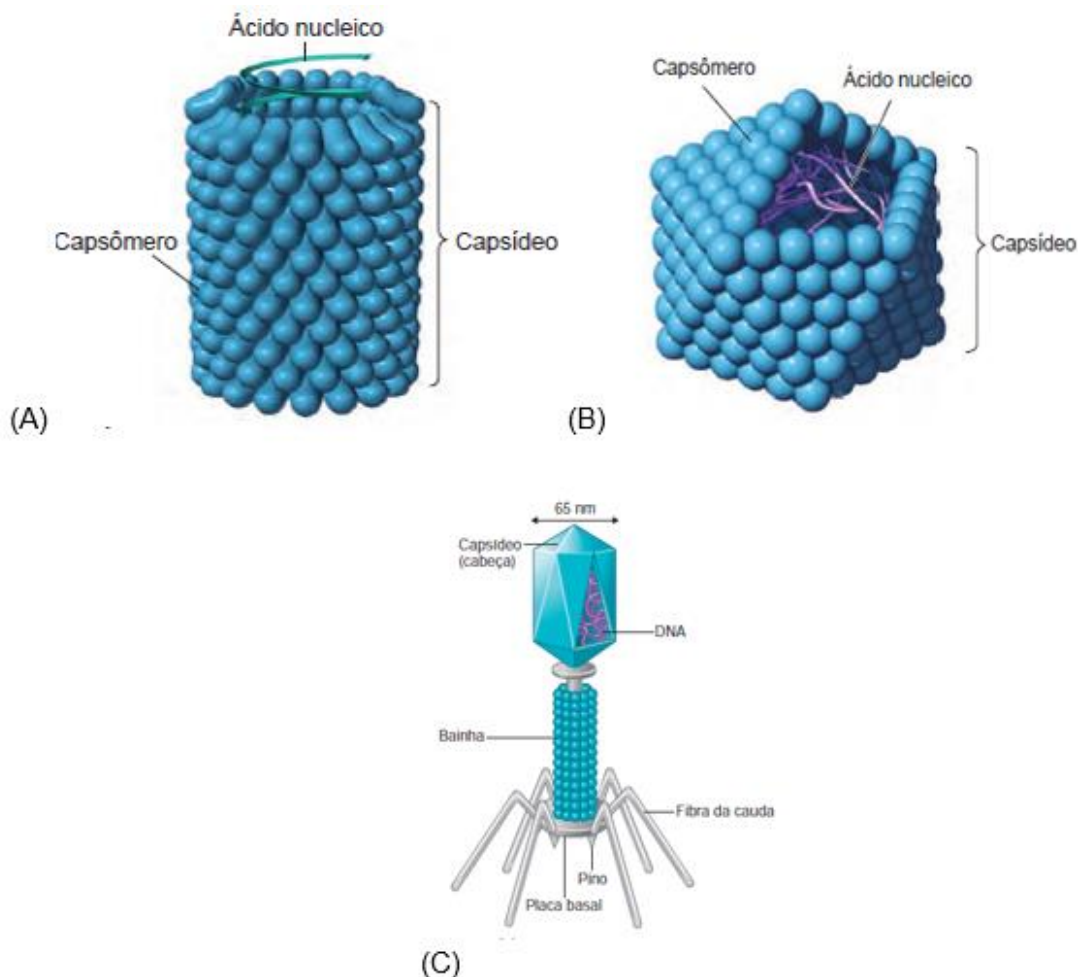
As partículas virais possuem uma grande diversidade de formas, podendo ser helicoidal, icosaédrica ou uma estrutura mais complexa, por exemplo, a encontrada nos bacteriófagos (**Figura 1**). As mais simples possuem o material genético protegido por uma capa protéica, denominada capsídeo. A formação dessas partículas virais ocorre espontaneamente por subunidades protéicas diferentes, unidas por ligações hidrofóbicas e interações eletrostáticas, fazendo da partícula viral uma estrutura estável. Funcionalmente, o capsídeo viral protege os ácidos nucléicos do ambiente extracelular e permite a ligação inicial vírus-célula (CANN, 2005).

Adicionalmente, alguns vírus apresentam além do capsídeo, uma bicamada lipídica contendo proteínas, geralmente glicoproteínas, que são denominadas envelope ou envoltório. Essas camadas exteriores conferem proteção ao genoma viral de danos físicos, químicos ou enzimáticos e auxiliam a entrada do vírus na célula (MADIGAN *et al.*, 2010).

O genoma viral pode ser constituído por uma ou várias moléculas de ácidos nucléicos que podem ser: ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) ou por ambas (DNA e RNA) como ocorre no gênero citomegalovírus, embora esses RNAs sejam considerados mRNAs dando origem a proteínas precoces da replicação viral

(HUANG; JOHNSON, 2000). Além disso, o genoma viral pode ser cadeia de fita simples (ss) ou cadeia de fita dupla (ds), linear ou circular, segmentada ou não segmentada (RÁCZ; MENCK, 2005).

Figura 1. Morfologia viral.



Fonte: adaptada de TORTORA; FUNKE; CASE, 2012.

Nota: Os vírus apresentam diferentes morfologias, podemos distinguir pelo menos três: (A) vírus helicoidal, caracterizada pela reunião de subunidades proteicas (capsômeros) ao ácido nucleico viral enrolado em forma de hélice; (B) vírus icosaédrico, composto por dois tipos de capsômeros (hexâmeros e pentâmeros) e (C) vírus com estrutura complexa, não apresentam simetria cubica ou helicoidal simples, formados por estruturas complexas com cabeça e cauda.

O tamanho do genoma viral é extremamente reduzido, logo, não codificam todas as proteínas necessárias para sua replicação. Por isso, se faz necessário invadir células e utilizar a maquinaria celular para iniciar e completar seu ciclo de proliferação.

1.2. INFECÇÃO VIRAL

O processo de infecção viral ocorre quando um vírus interage com uma célula, introduz seu genoma e se replica. Algumas características são comuns a todas as infecções virais, embora existam diferenças quanto à sua interação vírus-célula. De todo modo, o genoma viral deve codificar para três funções: alterar a estrutura e/ou função da célula infectada; promover a replicação do genoma viral; e promover a formação de partículas virais (RÁCZ, 2005). Portanto, o processo de infecção viral pode ser dividido em cinco etapas: adsorção, penetração, síntese dos componentes virais, maturação e liberação (MADIGAN *et al.*, 2010):

1.2.1. ADSORÇÃO

Os vírus que infectam células animais devem primeiramente reconhecer a célula hospedeira ligando-se aos receptores da membrana plasmática. Em vírus envelopados, na dupla camada lipídica do envelope, encontram-se anti-receptores chamados de espículas que medeiam à ligação inicial vírus-célula; em vírus não envelopados, a função do anti-receptor é exercida pelas proteínas do capsídeo. Deste modo, as partículas virais colidem ao acaso com sítios na superfície celular do hospedeiro, levando a união complementar entre o sítio celular (receptor) e a proteína viral (anti-receptor) (RÁCZ, 2005).

Portanto, a ligação inicial vírus-célula demonstra especificidade estrutural, determinando assim, o tipo de célula que o vírus é capaz de infectar. Essa especificidade é coordenada pelos receptores celulares que na maioria das vezes são proteínas, algumas vezes carboidratos e raramente lipídeos (DIMMOCK; EASTON; LEPPARD, 2007). Além disso, uma família de vírus pode usar o mesmo receptor, enquanto outros vírus podem usar três receptores diferentes ou ter apenas um receptor específico (DIMMOCK; EASTON; LEPPARD, 2007). De todo modo, os vírus infectam células específicas que são determinadas pela expressão de diferentes proteínas nos diferentes tecidos ou órgãos, determinando o tropismo viral (MADIGAN *et al.*, 2010).

1.2.2. PENETRAÇÃO

A penetração do vírus no hospedeiro celular ocorre logo após a ligação do vírus com o receptor celular. A penetração é um processo dependente de energia e existem três mecanismos principais: (1) translocação da partícula viral através da membrana

citoplasmática, sendo considerado um processo raro e mal compreendido; (2) endocitose do vírus em vesículas intracelulares, auxiliados pelos receptores celulares; e (3) fusão do envelope viral com a membrana celular, com o auxílio de proteínas de fusão presentes no envelope viral, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma, ou após endocitose, o envelope viral sofre fusão com a membrana da vesícula citoplasmática, liberando em seguida o nucleocapsídeo no citoplasma (CANN, 2005).

1.2.3. SÍNTESE DOS COMPONENTES VIRAIS

Nessa fase, os genomas virais realizam o processo de transcrição, formando um mRNA que possa ser codificado pela maquinaria de tradução das células hospedeiras, originando as proteínas viras. Adicionalmente, também ocorre a replicação do genoma viral que será incorporado à progênie viral (RÁCZ, 2005).

No processo de transcrição, o mRNA viral pode ser sintetizado no núcleo ou no citoplasma de uma célula hospedeira dependendo do tipo do genoma viral. A formação do mRNA também depende do tipo do genoma viral, assim o DNA dupla fita pode ser definida como uma cadeia de sentido positivo, porque contém imediatamente informações traduzíveis. Por outro lado, o RNA e o DNA complementos de cadeias possuem sentido contrário ao mRNA, sendo, portanto, designados como de sentido negativo e devem primeiro transcrever uma fita complementar ao mRNA antes da sua tradução pela maquinaria celular do hospedeiro (FLINT *et al.*, 2015).

Cada genoma viral possui especificidade nos processos de transcrição e replicação. Por isso, David Baltimore (1971), elaborou uma classificação baseada na natureza dos seus genomas e seus modos de transcrição (**Figura 2**):

CLASSE I- VÍRUS DE DNA DUPLA FITA

São todos os vírus que possuem como material genético o DNA com cadeia dupla. A síntese do mRNA é produzido a partir de uma das fitas de DNA, atuando semelhante ao genoma da célula hospedeira (BALTIMORE, 1971).

CLASSE II- VÍRUS DE DNA FITA SIMPLES

São todos os vírus que possuem DNA fita simples. Antes do mRNA ser produzido, uma fita complementar de DNA deve ser sintetizada, formando um intermediário de DNA dupla fita, sendo esse intermediário transcrito (BALTIMORE, 1971).

CLASSE III- VÍRUS DE RNA DUPLA FITA

Todos os vírus conhecidos dessa classe possuem o genoma RNA dupla fita segmentado. Exibem uma fita com sentido positivo e a outra fita com sentido negativo. Assim, a fita negativa é utilizada como molde para a síntese do mRNA com o auxílio de uma RNA polimerase RNA dependente (RdRP), proveniente da síntese viral, que transcreve o genoma de cada segmento de RNA dupla fita (BALTIMORE, 1971).

CLASSE IV- VÍRUS DE RNA DE FITA SIMPLES DE SENTIDO POSITIVO

O mRNA é igual ao RNA da partícula viral, assim, com o auxílio da RdRP, o vírus produz uma cópia antisense do RNA viral, ou seja, uma fita complementar ao RNA viral, que será uma fita de RNA com sentido negativo. Depois ocorre a síntese do mRNA, utilizando a fita de RNA de sentido negativo como molde (FLINT *et al.*, 2015).

CLASSE V- VÍRUS DE RNA DE FITA SIMPLES NEGATIVA

O RNA que penetra na célula é complementar ao mRNA, portanto, o mRNA deve ser primeiramente sintetizado. A fita de RNA com sentido positivo complementar ao RNA viral é sintetizada pela RdRP, sendo, então, utilizada como mRNA. Esse mRNA de fita simples positiva é utilizado como molde para sintetizar genomas de RNA de fita simples com sentido negativo (DIMMOCK; EASTON; LEPPARD, 2007).

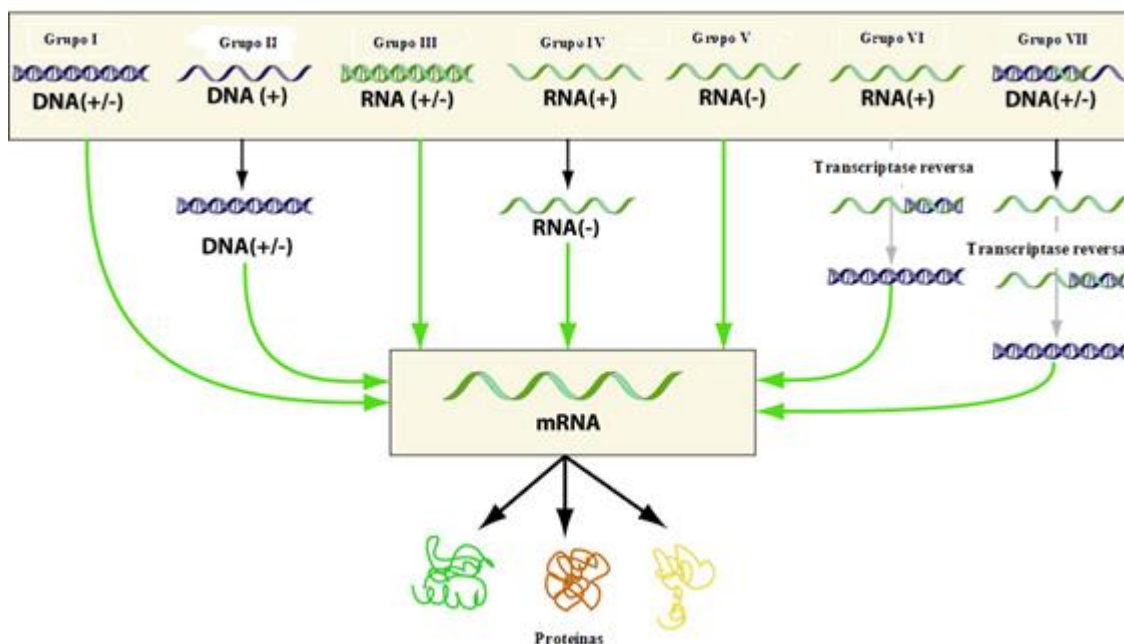
CLASSE VI- VÍRUS DE RNA FITA SIMPLES COM TRANSCRIPTASE REVERSA

São vírus de RNA de fita simples que codifica para um DNA de fita dupla com o auxílio da transcriptase reversa (DIMMOCK; EASTON; LEPPARD, 2007).

CLASSE VII- VÍRUS DE DNA DUPLA FITA COM TRANSCRIPTASE REVERSA

São vírus de DNA dupla fita que são convertidos em um RNA de fita simples com sentido positivo que será utilizado como molde para a síntese do DNA dupla fita, com o auxílio da transcriptase reversa (DIMMOCK; EASTON; LEPPARD, 2007).

Figura 2. Classificação de Baltimore.



Fonte: <http://viralzone.expasy.org/254> (2017).

Nota: A classificação de Baltimore é um sistema de classificação viral baseada na síntese do mRNA viral, agrupando os vírus em sete classes que dependem do seu genoma e da replicação do DNA.

1.2.3.1. SÍNTESE PROTÉICA

Esse processo pode progredir simultaneamente com a síntese das macromoléculas da célula hospedeira, embora, seja sintetizada uma grande quantidade de proteínas virais em vez de proteínas celulares (LODISH *et al.*, 2000). De modo geral, as primeiras proteínas sintetizadas são chamadas de proteínas não-estruturais e favorecem a síntese dos componentes virais e a replicação do genoma viral, assim, são produzidas antes do processo de replicação do genoma viral. Em fase posterior à replicação do genoma viral, acontece a síntese das proteínas estruturais que farão parte da cápside viral (DIMMOCK; EASTON; LEPPARD, 2007).

1.2.3.2. REPLICAÇÃO VIRAL

O mecanismo de replicação do genoma viral difere de acordo com a natureza do material genético e, na maioria dos casos, acontece no mesmo local onde ocorre a transcrição, podendo ser no citoplasma ou no núcleo. De modo geral, a replicação será conduzida pelo princípio de complementaridade de bases, com a participação de polimerases. No caso dos vírus de fita simples, se faz necessário à produção de uma fita complementar ao genoma viral que posteriormente atuará como molde para a síntese do novo genoma viral. Já os vírus de fita dupla, utilizam cada uma das fitas para gerar suas cópias complementares (DIMMOCK; EASTON; LEPPARD, 2007).

1.2.4. MATURAÇÃO

Após a síntese das proteínas virais e do genoma viral, ocorre a montagem das partículas virais. O capsídeo é composto por múltiplas cópias de uma ou mais proteínas, essas proteínas se associam entre si formando os capsômeros. Assim, a montagem dos capsídeos ocorre espontaneamente, por auto reunião de monômeros em capsômeros e de capsômeros em capsídeos. Em seguida, o genoma viral recém-sintetizado será empacotado no interior do capsídeo originando novas partículas virais (RÁCZ, 2005).

1.2.5. LIBERAÇÃO

Existem limites para a quantidade de vírus que podem ser acumulados em uma célula infectada, portanto, após a maturação a partícula viral deve ser liberada da célula infectada e penetrada em uma célula não-infectada (RÁCZ, 2005).

Existem dois tipos de liberação das partículas virais. Geralmente, os vírus não envelopados realizam a lise celular, liberando as partículas virais e outros componentes celulares para o meio extracelular, levando a célula à morte. Nos vírus envelopados, ocorre o brotamento através da membrana celular. Nesse tipo de liberação, durante o ciclo infeccioso as partículas virais acumulam-se na superfície interior da membrana plasmática. Deste modo, através da saída das partículas virais acontece o seu envelopamento com a membrana plasmática. Além do mais, o processo de brotamento parece não causar nenhum dano às membranas celulares que são rapidamente reparadas (MADIGAN *et al.*, 2010).

1.3. HERPESVÍRUS

O termo *herpes* tem sua origem na palavra grega “*herpein*” que significa “rastejar”. Assim, por estarem associadas às lesões que pareciam “rastejar” na superfície da pele dos hospedeiros infectados, esses vírus foram denominados de *Herpesviridae*, também conhecidos como herpesvírus (ROIZMAN; WHITLEY, 2001).

Os herpesvírus estão inseridos na ordem *Herpesvirales* e incluem mais de 100 espécies. A ordem *Herpesvirales* é classificada em três famílias: a família *Alloherpesviridae* que infecta peixes e anfíbios, a família *Malacoherpesviridae* que infecta os bivalves, e a família *Herpesviridae* que infecta mamíferos, aves e répteis. A família *Herpesviridae* pode ainda ser distribuída em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae* (α), *Betaherpesvirinae* (β) e *Gammapherpesvirinae* (γ) (DAVISON *et al.*, 2013; ICTV, 2017).

Embora estruturalmente semelhantes, essas subfamílias são altamente diferentes no tamanho, conteúdo e organização do genoma (FOSSUM *et al.*, 2009). Os vírus da subfamília *Alphaherpesvirinae* crescem rapidamente, lisam as células infectadas e estabelecem infecções latentes nos gânglios nervosos sensoriais. A subfamília *Betaherpesvirinae* possui o ciclo reprodutivo lento e o aumento das células infectadas, processo denominado de citomegalia, e as infecções latentes ocorrem nas glândulas secretoras, rins e outros tecidos (WHITE; FENNER, 1994; GUO *et al.*, 2010).

Já os membros da subfamília *Gammapherpesvirinae* replicam-se em células linfoblásticas e são específicos de linfócitos T ou B. As infecções latentes são encontradas nas células linfoides, podendo causar latência somente em alguns tipos celulares epitelióides ou fibroblásticos (WHITE; FENNER, 1994; GUO *et al.*, 2010).

Os herpesvírus são encontrados em uma ampla gama de vertebrados e invertebrados. Assim, a importância do estudo dos herpesvírus ganha força por serem extremamente disseminados na natureza e em razão das numerosas patologias tanto em população humana como animal, causando impacto na saúde pública e importantes perdas econômicas. Embora essas doenças sejam assintomáticas na maioria dos indivíduos, as infecções por herpesvírus estão associadas a graves doenças em humanos e animais.

Dentre os vírus da família *Herpesviridae*, nove espécies infectam os seres humanos, são eles: vírus herpes simples 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), vírus varicela-zoster (VZV/HHV-3), vírus Epstein-Barr (EBV/HHV-4), citomegalovírus humano (HCMV/HHV-5), herpesvírus humanos 6A e 6B (HHV-6A, HHV-6B), herpesvírus humano 7 (HHV-7) e o vírus associado a sarcoma de Kaposi (KSHV/HHV-8) (GRINDE, 2013).

1.3.1. VÍRUS EPSTEIN-BARR

O vírus Epstein-Barr (EBV) (família *Herpesviridae*, subfamília *Gammaherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus*, espécie *herpesvirus humano 4*), descoberto em 1964, possui uma alta frequência na população humana, infectando cerca de 95% da população mundial adulta (COHEN, 2000). EBV é a causa da mononucleose infecciosa e também está associada a 1% de câncer em todo o mundo, como carcinoma nasofaríngeo, linfoma de Hodgkin e linfoma de Burkitt (HOULDCROFT; KELLAM, 2015; PARKIN, 2006).

O EBV, assim como os outros herpesvírus, possuem quatro elementos estruturais básicos: núcleo, capsídeo, tegumento e envelope. O núcleo contém o genoma viral que consiste em um DNA de cadeia dupla linear. Em EBV, existem dois tipos distintos, referidos como: EBV-1 (*Human gammaherpesvirus 4 tipo 1*) e EBV-2 (*Human gammaherpesvirus 4 tipo 2*), distintos principalmente com base na organização de quatro genes que codificam os antígenos nucleares de EBV (EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B e EBNA-3C) (DOLAN *et al.*, 2006).

As sequências genômicas dos dois tipos de EBV são muito parecidas e parecem possuir as mesmas propriedades biológicas (DOLAN *et al.*, 2006). O genoma de EBV-1 possui extensão de 184 mil pares de bases, codificando mais de 85 genes, contendo 60% de citosina e guanina (CG) (RICKINSON; KIEFF, 2007). O EBV-2 possui 172.764 pb de extensão do genoma, com 82 genes e conteúdo de CG de 59,5% (DOLAN *et al.*, 2006).

Além disso, o EBV-1 ocorre nas regiões ocidentais e o EBV-2 é mais frequentemente descrito na África. Apesar do EBV-1 ser mais prevalente na população, o EBV-2 é mais frequente em pacientes HIV positivo (BUISSON *et al.*, 1994).

O capsídeo dos herpesvírus possui forma icosaédrica, com 162 capsômeros e é montado no núcleo da célula infectada. Uma vez que circunda e protege o DNA do vírus, é transportado para o citoplasma da célula infectada. Os capsídeos dos herpesvírus são estruturalmente uniformes, robustos e simétricos (BROWN; NEWCOMB; 2011). O tamanho do capsídeo de EBV varia entre 150 a 180 nm de diâmetro. A variação no tamanho depende das proteínas do envelope e da espessura e composição das proteínas do tegumento (FRANCO; ROEHE, 2007).

O tegumento, localizado entre o capsídeo e o envoltório, é uma estrutura assimétrica, aparentemente fibrosa e composta por proteínas virais, chamadas de proteínas tegumentais. Sendo, provavelmente, originado do próprio vírus e não do hospedeiro. Pelo menos oito tipos de proteínas codificadas pelo genoma viral estão presentes no tegumento (FRANCO; ROEHE, 2007; GUO *et al.*, 2010).

As proteínas tegumentais são importantes para vários aspectos do ciclo de vida do herpesvírus. Acredita-se que tenha papel fundamental no início da infecção, na inserção do DNA no núcleo e na formação do envelope. Sendo, algumas proteínas conservadas em todos os membros dos herpesvírus (**Tabela 1**) (GUO *et al.*, 2010).

Tabela 1. Proteínas estruturais conservadas nos herpesvírus.

PROTEÍNA	HSV	HCMV	EBV	KSHV	FUNÇÃO
CAPSÍDEO					
MCP	UL19	UL86	BcLF1	ORF25	Estrutura do capsídeo, hexâmetro, pentâmetro
TRI1	UL38	UL46	BORF1	ORF62	TRI1 e TRI2 associado para formar o complexo TRI, estrutura do capsídeo
TRI2	UL18	UL85	BDLF1	ORF26	
SCP	UL35	UL48A	BFRF3	ORF65	Transporte do capsídeo
PORT	UL6	UL104	BBRF1	ORF43	Pentâmetro para encapsulação do DNA
PCP	UL25	UL77	BVRF1	ORF19	Cobertura do portal em virions maduros
TEGUMENTO E SAÍDA CITOPLASMATICA					
VPK	UL13	UL97	BGLF4	ORF36	Regulação de fosforilação
LTP	UL36	UL48	BPLF1	ORF64	Desencapsulamento, envoltório secundário
LTPbp	UL37	UL47	BOLF1	ORF63	
EEP	UL7	UL103	BBRF2	ORF42	Saída do núcleo
CETP	UL11	UL99	BBLF1	ORF38	Envelopamento secundário, saída citoplasmática.
CETPbp	UL16	UL94	BGLF2	ORF33	
CEF1	UL51	UL71	B5RF1	ORF55	Saída citoplasmática
ECP	UL14	UL95	BGLF3	ORF34	TERbp chaperone

Continuação da tabela 1.

PROTEÍNA	HSV	HCMV	EBV	KSHV	FUNÇÃO
CTTP	UL17	UL93	BGLF1	ORF32	Transporte do capsídeo no núcleo
CEF2	UL21	UL88	BTRF1	ORF23	Saída, interage com CETPbp
	UL24	UL76	BXRF1	ORF20	
ENVELOPE					
gB	UL27	UL55	BALF4	ORF8	Ligação com heparan, fusão
gH	UL22	UL75	BXLF2	ORF22	Associação gH, fusão
gL	UL1	UL115	BKRF2	ORF47	Associação gL, fusão
gM	UL10	UL100	BBRF3	ORF39	Associação gN
gN	UL49A	UL73	BLRF1	ORF53	Associação gM

Fonte: adaptado de ARVIN *et al.*, 2007.

Nota: HSV- vírus herpes simples; HCMV- citomegalovírus humano; EBV- vírus Epstein-Barr; KSHV- vírus associado a sarcoma de Kaposi. MCP- principal proteína do capsídeo; TRI1- monômero tríplex; TRI2- dímero tríplex; SCP- pequena proteína do capsídeo; PORT- proteína portal; PCP- proteína de nivelamento portal; VPK- proteína kinase do vírion; LTP- maior proteína do tegumento; LTPbp- proteína ligadora da LTP; EEP- encapsulação e saída da proteína; CETP- proteína do tegumento para saída citoplasmática; CETPbp- proteína ligadora de CETP; CEF1- mediador 1 de saída citoplasmática; ECP- proteína chaperone de encapsulação; CTTP- proteína tegumentar de transporte do capsídeo; CEF2- mediador 2 de saída citoplasmática; gB- glicoproteína B; gH- glicoproteína H; gL- glicoproteína L; gM- glicoproteína M e gN- glicoproteína N.

O envelope viral, derivado da membrana nuclear da célula hospedeira, é formado por uma bicamada lipídica contendo várias glicoproteínas virais que estão envolvidas na entrada do vírus na célula, fusão, penetração e transporte das partículas virais entre células e interações dos vírions com o sistema imunológico (FRANCO; ROEHE, 2007).

Muitas proteínas do envelope são específicas para cada tipo de herpesvírus, entretanto, cinco são amplamente conservadas, são as glicoproteínas estruturais: gB, gH, gL, gM e gN. A interação específica entre gH e gL sugere que sejam chaperonas moleculares e parceiras funcionais. Interessantemente, os complexos gH: gL e gM: gN associam-se a membranas celulares e são incorporados no invólucro viral durante a saída das partículas virais. Nas subfamílias *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* os complexos gH: gL podem ser modificadas por glicoproteínas virais adicionais que influenciam o tropismo celular (GUO *et al.*, 2010).

1.3.2. INFECÇÃO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR

O vírus Epstein-Barr, infecta dois tipos celulares: linfócitos B e células epiteliais. O processo de infecção dos herpesvírus inicia-se com a interação das glicoproteínas virais com os receptores da superfície celular. Esse reconhecimento é restrito devido ao tropismo viral (ROIZMAN; GU; MANDEL, 2005) (**Figura 3**).

Nas células B, a infecção por EBV inicia-se com a interação da glicoproteína membrana de EBV gp350/220 com o receptor viral CD21 na superfície das células B. Além disso, o receptor da superfície celular da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) serve como cofator para a infecção das células B interagindo com a glicoproteína viral membrana gp85/42, possibilitando a fusão do envelope viral (THOMPSON; KURZROCK, 2004).

Através da fusão do envelope viral com a membrana plasmática o nucleocapsídeo viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira. Por meio do sistema de microtúbulos, o nucleocapsídeo é direcionado à membrana nuclear, onde libera o genoma viral no interior do núcleo através dos poros nucleares (ROIZMAN; GU; MANDEL, 2005; JOHNSON; BAINES, 2011). O DNA de EBV se circulariza formando o episomo ou incorpora-se ao genoma da célula hospedeira, sendo transcrito e replicado no núcleo (MORISSETTE; FLAMAND, 2010).

Assim, o processo de transcrição do genoma viral inicia-se, e a síntese das proteínas virais ocorrem de maneira coordenada em três fases: em primeiro lugar, ocorre a síntese das proteínas precoces imediatas que consistem em proteínas de ligação do DNA, importantes para a regulação da transcrição gênica. Em seguida, é realizada a síntese de proteínas precoces, que consistem em fatores de transcrição e enzimas, incluindo a DNA polimerase. Por fim, ocorre a síntese de proteínas tardias, constituída principalmente por proteínas estruturais. Posteriormente, ocorre o processo de replicação do genoma viral que é realizado pela DNA polimerase, codificada pelo vírus (PALUDAN *et al.*, 2011).

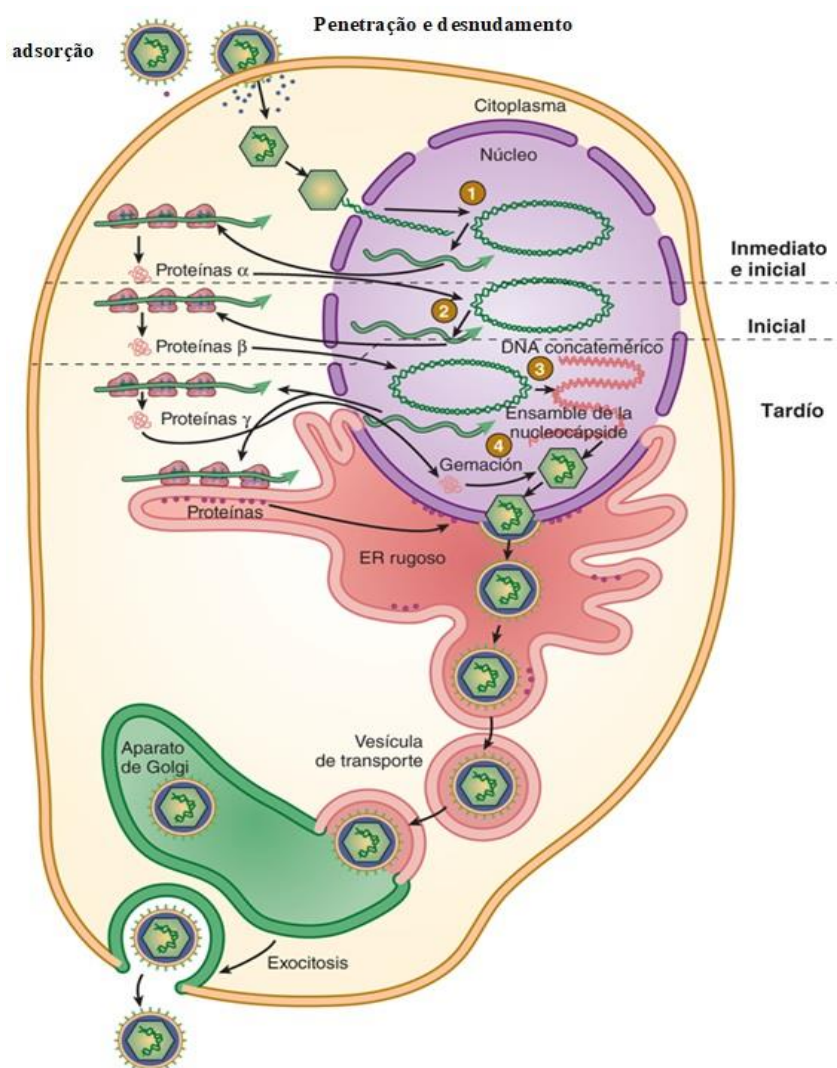
Em EBV, o primeiro gene a ser expresso é o BZLF que age como disparo para a replicação viral o que resulta na produção de outras proteínas como BHRF1, que é responsável pela produção da enzima DNA polimerase e timidina quinase (TK). Outras proteínas são produzidas, tais como os antígenos do capsídeo viral e os antígenos precoces, capazes de romper células infectadas na fase latente e iniciar a fase lítica, ou seja, de replicação viral (RICKINSON; KIEFF, 2007).

No núcleo, quando uma quantidade suficiente de proteínas tardias está disponível, os capsídeos vazios são preenchidos com o DNA viral, formando os nucleocapsídeos. As glicoproteínas são sintetizadas e, em seguida, difundem-se para a membrana nuclear. Os

nucleocapsídeos brotam a partir de porções da membrana nuclear modificadas pelas glicoproteínas virais (JOHNSON; BAINES, 2011).

No citoplasma, os núcleocapsídeos são revestidos por uma camada de proteínas que formam o tegumento, em seguida, são submetidos ao envelopamento por membranas do complexo de Golgi ou em endossomas, produzindo partículas virais infecciosas no interior dessas vesículas celulares, com glicoproteínas virais específicas na superfície dos seus envelopes. Estas vesículas citoplasmáticas transportam as partículas virais até a superfície celular, onde se fundem com a membrana plasmática da célula hospedeira liberando os vírus da célula (JOHNSON; BAINES, 2011).

Figura 3. Ciclo de replicação do vírus herpes simples (HSV), representante da família *Herpesviridae*.



Fonte: adaptado de PRESCOTT; HARLEY; KLEIN'S, 2008.

1.3.3. LATÊNCIA

Uma das principais características apresentadas pelos herpesvírus é a capacidade de permanecerem como uma infecção latente durante toda a vida do hospedeiro (PIEIDADE; AZEVEDO-PEREIRA, 2016). A latência torna-se necessária para a propagação do vírus de célula para célula em um indivíduo e de indivíduo para indivíduo em uma população (FRANCO; ROEHE, 2007).

A infecção latente caracteriza-se por apresentar: (1) restrição da replicação viral no núcleo da célula infectada; (2) mínima expressão de genes virais, permitindo a sobrevivência viral e celular através dos genes de latência; (3) monitoramento e manipulação do ambiente da célula hospedeira para criar condições adequadas para a reativação da replicação viral; (4) sobrevivência da célula infectada, já que a morte da célula resultaria na perda do seu genoma; (5) presença do genoma viral no núcleo da célula infectada na forma do episssomo/DNA circular extracromossômico; (GREY, 2015). Curiosamente, alguns herpesvírus como o vírus da doença de Marek (MDV), Epstein-Barr (EBV) e HHV-6 podem ser encontrados com o DNA integrado nos cromossomos da célula hospedeira (MORISSETTE; FLAMAND, 2010).

Na infecção latente o vírus permanece dentro das células em uma forma não patogênica, porém apresentam períodos intermitentes de reativação da infecção lítica sob diversos estímulos, tais como: estresse, variações hormonais, exposição à luz ultravioleta e imunossupressão (MADIGAN *et al.*, 2010). Assim, os herpesvírus são reativados a partir da expressão de genes iniciais imediatos, desencadeando uma cascata de sinalização lítica, acarretando na produção de vírus (JUNG *et al.*, 2014).

Durante o período da latência, apenas uma parte do genoma permanece sendo transcrito sob o comando do promotor LAT (*Latency Associated Transcripts*) que, provavelmente, parece estar envolvido na manutenção e reativação da infecção latente (FRANCO; ROEHE, 2007). Em EBV, nas infecções *in vitro* de células B, ocorre a expressão de cerca de dez genes do ciclo latente: seis são proteínas de antígenos nucleares (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C e EBNA-LP); duas são proteínas de membrana latente (LMP-1 e LMP-2) e duas pequenas sequências de RNAs não traduzidas (EBER-1 e EBER-2) (KIEFF; RICKINSON, 2007).

Os microRNAs (miRNAs) são importantes durante a latência, pois sua expressão está associada a vírus que estabelecem infecção latente. Além disso, são geneticamente econômicos e não imunogênicos, podendo direcionar os transcritos celulares de modo a gerar um ambiente propício a reativação (GREY, 2015).

O processo de reativação da infecção lítica pode ser crítico para os vírus, pois uma replicação ativa tende a induzir vários mecanismos do sistema imunológico do hospedeiro, o que leva à morte da célula infectada (GRINDE, 2013). Sendo assim, vários genomas virais, provavelmente, iniciaram esse processo e não obtiveram êxito, logo, poucos conseguem produzir com sucesso a progênie infecciosa (GRINDE, 2013).

A habilidade de estabelecer a latência torna os herpesvírus altamente patogênicos. Adicionalmente, os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento, manutenção e reativação da latência são mal compreendidos (GREY, 2015). Portanto, alcançar uma latência bem-sucedida, envolve uma interação complexa entre fatores virais e celulares, possivelmente, auxiliados pelos miRNAs virais (GREY, 2015).

1.4. RNA DE INTERFERÊNCIA

Embora os vírus não produzam todas as proteínas necessárias para completar seu ciclo de vida, sua interação com proteínas celulares possibilita: adquirir atividades por ele não codificada, impedir as defesas imunes do hospedeiro e manipular as vias celulares (KHADKA *et al.*, 2011). Por outro lado, sua presença ativa o sistema imune das células hospedeiras produzindo proteínas que se ligam e degradam ou inibem as proteínas virais (KHADKA *et al.*, 2011).

Assim, os vírus desenvolveram uma estratégia para evitar o reconhecimento e a eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro e, portanto, conseguir a infecção viral. Essas estratégias dependem de produtos virais que não codificam proteínas, como os microRNAs que regulam os transcritos celulares do hospedeiro e os transcritos virais (FRUCI; ROTA; GALLO, 2017).

De acordo com o dogma central da biologia proposto por Francis Crick em 1958 (publicado em 1970), a informação genética era passada do DNA para o RNA e do RNA para as proteínas. Nesse conceito, o RNA ribossomal (rRNA) e o RNA transportador

(tRNA) eram os únicos RNAs não codificantes conhecidos, e o RNA mensageiro (mRNA) o único RNA codificante, por ser traduzido em proteínas.

Apenas no início do século XXI, descobriu-se que grande parte do genoma humano apesar de ser transcrito não era traduzido em proteínas, sendo, os RNAs não codificantes (ncRNAs) representantes de cerca de 98% do genoma humano (MATTICK, 2001). Os vírus apesar de apresentarem genoma compactado também produzem ncRNAs, mas ao contrário do genoma humano, nos herpesvírus, apenas 10 a 20% do genoma é composto por ncRNAs (GUO; STEITZ, 2014).

Os ncRNAs virais, maior parte adquirido pelos herpesvírus, desempenham papéis importantes no aumento do ciclo de vida viral ou neutralizando os agentes antivirais do hospedeiro, a fim de garantir uma infecção bem-sucedida (STEITZ *et al.*, 2010). Um motivo aceitável para os vírus utilizarem os ncRNAs ao invés de proteínas para desempenharem essas funções, possivelmente, está relacionado ao fato dos RNAs serem menos imunogênicos e, assim, escaparem mais facilmente das respostas imune do hospedeiro (TYCOWSKI *et al.*, 2015).

Dentre uma variedade de ncRNAs identificados, os miRNAs vêm sendo estudados como pequenas moléculas de RNA, intermediária de um processo conhecido como RNA de interferência (RNAi), ou seja, no mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional (SNUSTAD; SIMMONS, 2012).

Nesse contexto, os miRNAs produzidos tanto pelos vírus quanto pelas células, ganham destaque em diversos processos biológicos. Surge assim, um novo ponto de vista para estudos sobre a interação vírus-célula durante o processo de infecção. Embora esses miRNAs atuem associados à mRNAs celulares ou virais, pouco se sabe sobre o efeito dessas interações.

1.5. MicroRNA

1.5.1. DESCOBERTA DOS miRNAs

Inicialmente, os efeitos do RNAi foram observados em plantas, mas a compreensão do mecanismo que levava ao silenciamento gênico, só foi confirmada quando Rosalind Lee e colaboradores em 1993, estudando a função do gene *lin-4* em *Caenorhabditis elegans*, cuja função é conhecida no controle negativo da proteína *lin-14*,

observaram que ao invés de proteínas, lin-4 codificava dois pequenos RNAs, entre eles o lin-4S.

Nesse estudo, descobriram que a extremidade 5' da molécula de RNA lin-4S tinha complementaridade anti-sentido a sete locais na 3' UTR do mRNA lin-14. Em seguida, sugeriram que o pequeno RNA lin-4S pareado com a região 3' UTR do mRNA lin-14, reprimiam a tradução. Assim, lin 4-S tornou-se o fundador da classe dos miRNAs (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993).

Nos vírus, os primeiros miRNAs identificados foram relatados em 2004 no vírus Epstein-Barr (EBV), membro da família *Herpesviridae* (PFEFFER *et al.*, 2004). Atualmente, diferentes membros da família *Herpesviridae* e outras famílias virais são conhecidas por expressarem miRNAs.

1.5.2. ASPECTOS GERAIS DOS miRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas endógenas de ncRNAs que possuem aproximadamente 22 nucleotídeos (nt) de comprimento (XIE; STEITZ, 2014). Esses miRNAs participam da regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional por pareamento com o mRNA alvo, modulando vários processos celulares fundamentais (SKALSKY; CULLEN, 2010), incluindo: desenvolvimento, diferenciação celular, proliferação e apoptose (BARTEL, 2009). Atualmente, os miRNAs já foram identificados em metazoários e plantas (BARTEL, 2009) e em famílias de vírus de DNA e RNA (KINCAID; SULLIVAN, 2012).

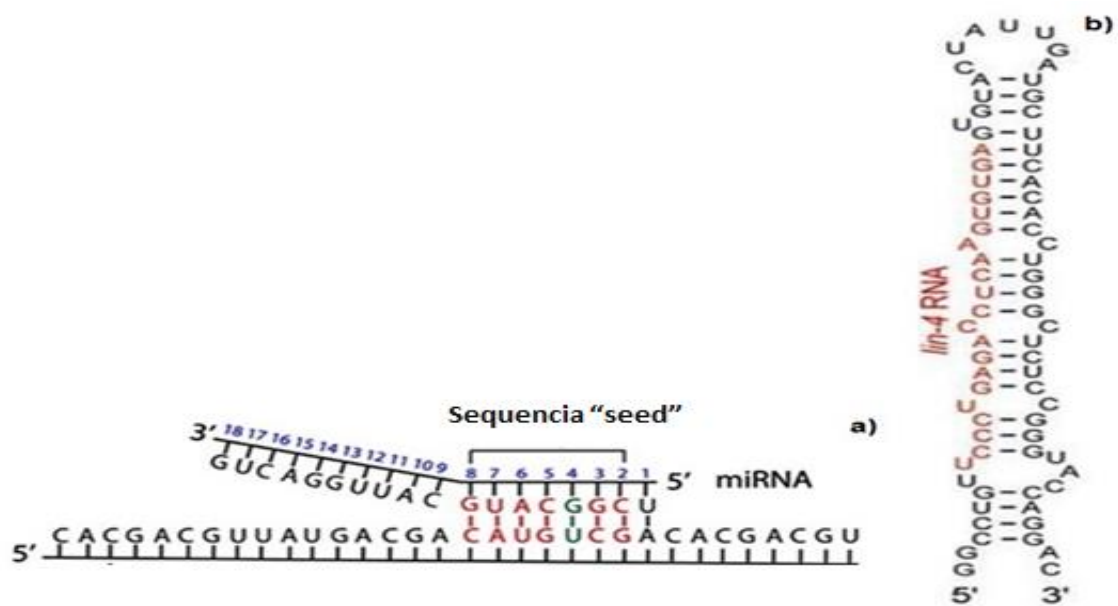
De acordo com a última versão (versão 21) do banco de dados de miRNAs, denominado miRBase (2017), existem 28.645 miRNAs identificados em todos os domínios, incluindo os vírus. Destes, 462 miRNAs são codificados por vírus, sendo 136 miRNAs codificados pelos herpesvírus. Apesar disso, uma compreensão funcional de todos esses miRNAs virais ainda não foi elucidada.

Geralmente, os vírus com maior probabilidade de codificarem miRNAs possuem genoma de DNA no seu ciclo de vida, replicam-se no núcleo e possuem capacidade de estabelecer infecções latentes. No entanto, nem todos os vírus que atendem esses critérios codificam miRNAs (KINCAID; SULLIVAN, 2012). Assim, já foram identificados miRNAs nas famílias *Herpesviridae*, *Polyomaviridae*, *Retroviridae*, *Ascoviridae*,

Adenoviridae e *Baculoviridae* (GHOSH; MALLICK; CHAKRABARTI, 2009; SKALSKY; CULLEN, 2010; GRUNDHOFF; SULLIVAN, 2011).

De modo geral, os miRNAs regulam a expressão gênica em nível pós-transcricional, através do reconhecimento da região semente ou “seed” que possui de 2 a 7 bases na região 3' não traduzida (3' UTR) de um mRNA alvo, podendo inibir a tradução ou induzir a degradação do mRNA alvo (BARTEL, 2009) (**Figura 4**).

Figura 4. Interação miRNA:mRNA e estrutura do pré-miRNA.



Fonte: (a) adaptada de PETERSON *et al.*, 2014. (b) adaptada de BARTEL, 2004.

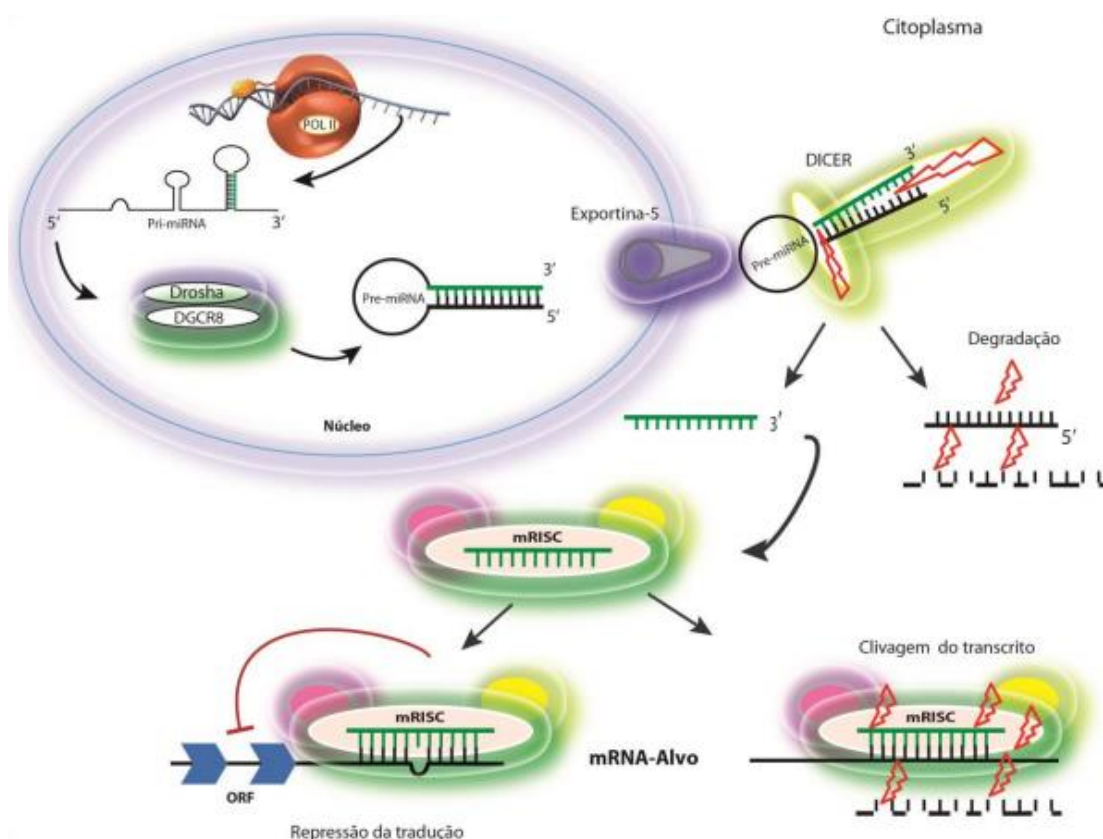
Nota: (a) Visão geral da interação do microRNA com o mRNA alvo, enfatizando a região “seed”. Em azul são os nucleotídeos do miRNA e em vermelho os nucleotídeos responsáveis pelo reconhecimento da região “seed”. (b) provável pré-miRNA lin-4 de *C. elegans*. A sequência madura do miRNA está representada em vermelho.

Essa sequência “seed” confere a um único miRNA a capacidade de regular centenas de mRNAs (GUO; STEITZ, 2014). Assim, um mesmo mRNA pode ser inibido por distintos miRNAs (FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008). Além disso, a falta de conservação da sequência “seed” do miRNA permite que um único miRNA atinja diferentes regiões do mesmo mRNA alvo (UMBACH; CULLEN, 2009).

1.5.3. BIOGÊNESE DO miRNA VIRAL

A maioria dos miRNAs celulares e virais são produzidos pela via canônica (**Figura 5**). Entretanto, a biogênese de alguns miRNAs celulares e virais não adotam a via canônica, adotando mecanismos independentes de Drosha ou Dicer. Contudo, não foi identificada nenhuma via da biogênese não canônica que possa ser compartilhada entre os miRNAs celulares e virais (TYCOWSKI *et al.*, 2015).

Figura 5. Visão geral da via canônica na biogênese dos miRNAs.



Fonte: LAPA, 2014.

Nota: A biogênese dos miRNAs ocorre no núcleo com a ação da RNA pol II, formando o transcrito primário (pri-miRNA), posteriormente o pri-miRNA será clivado pela Drosha formando o pré-miRNA. O pré-miRNA é exportado para o citoplasma e clivado pela Dicer, gerando duas fitas simples de RNA. Uma das fitas será degradada e a outra incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que posteriormente interage com a porção 3' UTR do transcrito alvo, podendo degradar ou reprimir a tradução do transcrito.

Na via canônica, os miRNAs são formados a partir de longos transcritos compostos por estrutura secundária de RNA dupla fita (dsRNA) em forma de grampo, ou seja, apresentando trecho de nucleotídeos repetidos em orientações opostas na base de

uma estrutura unifilamentar, denominados de miRNAs primários (pri-miRNAs). Esses pri-miRNAs, geralmente transcritos pela RNA polimerase II, possuem uma extremidade com cap 5' e a outra com a cauda poli-A e podem codificar um único ou vários microRNAs (TYCOWSKI *et al.*, 2015).

No núcleo da célula hospedeira, esses pri-miRNAs são clivados por uma RNase III chamada de Drosha, liberando um pré-miRNA em forma de grampo que será exportado para o citoplasma pela exportina-5 através do complexo de poros nucleares. No citoplasma, o pré-miRNA será clivado por uma segunda RNase III denominada Dicer, formando o miRNA maduro (XIE; STEITZ, 2014; TYCOWSKI *et al.*, 2015).

A região “seed” ou semente na extremidade 5' dos miRNAs maduros determina a qual mRNA o miRNA se ligará. Do duplex do miRNA uma fita é preferencialmente selecionada pela proteína Argonauta (AGO) para ser incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), enquanto a outra fita é preferencialmente degradada (TYCOWSKI *et al.*, 2015). Em organismos diferentes, RISC pode variar em tamanho e composição, mas todos contêm pelo menos uma molécula da proteína Argonauta (PRATT; MACRAE, 2009).

A biogênese do vírus Epstein-Barr (EBV) é similar a biogênese dos miRNAs celulares, adotando a via canônica. Todos os miRNAs em EBV são organizados em dois grupos dentro do genoma de EBV: um nas regiões intrônicas do gene BART (mir-BART1 a mir-BART20) e o outro nas regiões não traduzidas (UTRs) do gene BHRF1 (mir-BHRF1-1 a mir-BHRF1-3) (PFEFFER *et al.*, 2004, GRUNDHOFF; SULLIVAN; GANEM, 2006). Além disso, são transcritas pela RNA pol II, produzindo os pri-miRNAs. Drosha cliva os pri-miRNAs gerando um pré-miRNA que será transportado do núcleo para o citoplasma. Posteriormente, a proteína Dicer cliva o pré-miRNA gerando um microRNA maduro (KIM; LEE, 2012).

Em alguns casos, outros vírus utilizam vias não canônicas para produzirem seus próprios miRNAs, estes foram primeiramente descobertos nos herpesvírus. Assim, o herpesvírus 68 de murídeo (MHV68), transcrito pela RNA polimerase III possui como estratégia: produzir os grampos de pré-miRNAs co-transcritos com outro ncRNA. Nesse caso, foi com o tRNA, formando o transcrito ncRNA-pré-miRNAs (TYCOWSKI *et al.*, 2015).

Logo, o transcrito ncRNA-pré-miRNAs serve como pri-miRNA e será clivado pela RNase Z do hospedeiro. Já a enzima que separa os pré-miRNAs ainda não foi identificada. Os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma e clivados por Dicer. Posteriormente, uma fita do duplex será incorporada ao complexo RISC e dirigido ao mRNA alvo (KINCAID; SULLIVAN, 2012; XIE; STEITZ, 2014).

Possivelmente, essa estratégia ncRNA-pré-miRNA é uma maneira econômica de embalar os miRNAs como subprodutos de outras vias de ncRNA e/ou essa conexão contribui para uma função biológica desconhecida que traga benefícios aos vírus (TYCOWSKI *et al.*, 2015). Além disso, os vírus possuem outros mecanismos próprios conhecidos na via da biogênese dos miRNAs que não adotam a via canônica, sugerindo que vários outros mecanismos sejam descobertos no futuro (TYCOWSKI *et al.*, 2015).

1.5.4. FUNÇÃO DOS miRNAs virais

Os miRNAs virais podem ser divididos em duas classes: A primeira classe sendo composta pelos miRNAs específicos dos vírus, ou seja, que vão regular os mRNA virais; e a segunda classe sendo uma minoria de miRNAs que são análogas aos miRNAs da célula hospedeira, ou seja, compartilham a região “seed” com os miRNAs celulares e, portanto, têm o mesmo mRNA alvo. Logo, um único miRNA viral pode exercer função dupla, inibindo tanto mRNAs virais como mRNAs celulares (KINCAID; SULLIVAN, 2012).

A função de todos os miRNAs virais ainda não foi esclarecida, embora alguns miRNAs indiquem funções na regulação de diversos processos, tais como: prevenção da apoptose, evasão do sistema imunológico do hospedeiro e regulação de genes virais (KINCAID; SULLIVAN, 2012). Assim, os miRNAs virais manipulam a expressão de genes celulares e virais para aumentar o potencial de replicação viral (SKALSKY; CULLEN, 2010) e regulação da infecção lítica e latente (PIEIDADE; AZEVEDO-PEREIRA, 2016). De todo modo, a função dos miRNAs virais está voltada ao favorecimento no processo de replicação e latência viral (GHOSH; MALLICK; CHAKRABARTI, 2009).

Curiosamente, a maioria dos mRNA celulares que os miRNAs virais regulam, desempenham papéis na regulação da apoptose, na proliferação celular e na imunidade do hospedeiro (UMBACH; CULLEN, 2009; PIEIDADE; AZEVEDO-PEREIRA, 2016).

Devido ao fato dos genomas virais serem menores que os genomas celulares, os mRNA alvos dos miRNAs virais são menos e mais fáceis de testar, assim, têm sido mais fácil identificar mRNA alvo de vírus em vez de mRNA alvo do hospedeiro celular (UMBACH; CULLEN, 2009).

1.5.5. MicroRNAs NOS HERPESVÍRUS

Os herpesvírus expressam a maioria dos miRNAs, ou seja, mais de 95% dos miRNAs virais conhecidos foram encontrados nos herpesvírus (GRUNDHOFF; SULLIVAN, 2011). Interessantemente, na maioria das vezes, esses miRNAs foram expressos durante a fase latente do ciclo de vida viral, sugerindo que um dos grandes papéis desempenhados pelos miRNAs virais é a capacidade de regular a expressão do gene celular e/ou viral sem provocar uma resposta imune (GREY, 2015). Logo, os miRNAs virais desempenham importantes papéis para uma infecção bem-sucedida (**Tabela 2**).

Tabela 2. MicroRNAs e suas respectivas funções nos herpesvírus.

Vírus	miRNA	Alvo	Função	Referência
EBV	miR-BART22	LMP2A	Evasão imune	Lung <i>et al.</i> , 2009
EBV	miR-BART20-5p	BAD	Apoptose	Jung <i>et al.</i> , 2014
EBV	miR-BART20-5p	BRLF1	Infecção latente	Kim; Choi; Lee, 2015
EBV	miR-BART5	PUMA	Apoptose	Choy <i>et al.</i> , 2008
EBV	miR-BART2-5p	MICB	Reconhecimento imune	Lisnic; Krmpotic; Jonjic, 2010
EBV	miR-BART3	LMP1	Evasão imune	Skalsky <i>et al.</i> , 2014
HSV-1	miR-H8	ULBP2	Maturação de proteínas	Enk <i>et al.</i> , 2016
HSV-1	miR-H8	ULBP3	Maturação de proteínas	Enk <i>et al.</i> , 2016
HSV-1	miR-H2-3p	ICP0	Infecção latente	Umbach <i>et al.</i> , 2008

Continuação da tabela 2.

Vírus	miRNA	Alvo	Função	Referência
HSV-1	miR-H2-6p	ICP4	Infecção latente	Umbach <i>et al.</i> , 2008
KSHV	miR-K12-7	MICB	Repressão da tradução	Nachmani <i>et al.</i> , 2009
HCMV	miR-UL36	UL138	Infecção latente	Huang <i>et al.</i> , 2013
HCMV	miR-ul112	IL-32	Evasão imune	Huang <i>et al.</i> , 2013
HCMV	miR-UL112	MICB	Repressão da tradução	Stern-ginossar <i>et al.</i> , 2007

Fonte: adaptado de FRUCI; ROTA; GALLO, 2017; GREY, 2015; BRUSCELLAS *et al.*, 2017.

Nota: EBV- vírus Epstein-Barr; HSV-1 - vírus herpes simples 1; KSHV- vírus associado ao sarcoma de Kaposi e HCMV- citomegalovírus humano.

Das três subfamílias que a família *Herpesviridae* possui, a *Gammaherpesvirinae* codifica o maior número de miRNAs identificados (GHOSH; MALLICK; CHAKRABARTI, 2009). Um dos membros dessa subfamília é o vírus Epstein-Barr que codifica um total de 25 pré-miRNAs nas regiões BHRF1 e BART do genoma, produzindo pelo menos 44 miRNAs maduros que visam genes virais ou celulares para exercerem suas funções (GRUNDHOFF; SULLIVAN, 2011).

Entre as funções dos miRNAs nos herpesvírus, temos: em KSHV (vírus do herpes associado ao Sarcoma de Kaposi) o miRK9 cuja função é manter a latência; seu alvo é a proteína RTA (ORF50), uma das principais proteínas do ciclo lítico; assim, a diminuição da expressão de RTA evita a reativação do ciclo lítico (BELLARE; GANEM, 2009). Além disso, outro alvo do miRK9 é a proteína IRAK1 que atua inibindo a ativação do complexo proteico NF-kB, importante na regulação da resposta imune à infecção (ABEND *et al.*, 2012).

A infecção latente não tem consequências negativas imediatas para a célula infectada, embora a latência em células de origem linfóide, epitelial e endotelial estejam associadas a tumorigênese para os vírus EBV e KSHV (BOSS; PLAISANCE; RENNE, 2009). Assim, esses vírus conseguem alterar as funções das células hospedeiras sem matá-las, e em alguns casos, essas células infectadas perdem o controle sobre a proliferação celular normal e se tornam cancerosas (GOTTWEIN; CULLEN, 2010). Por exemplo, em

KSHV o miR-K1 reprime a expressão de p21, proteína com funções supressoras de tumores, contribuindo para o potencial oncogênico (GOTTWEIN; CULLEN, 2010).

Outros miRNAs virais foram relatados atuando na inibição do ciclo lítico e estabelecimento da latência, são eles: o miR-UL112-1 do citomegalovírus humano (HCMV) que regula o gene inicial imediato IE72, diminuindo a expressão de genes virais envolvidos na replicação (GREY *et al.*, 2007) e o miR-BART20-5p que no vírus EBV regula negativamente os genes iniciais BZLF1 e BRLF1 para suprimir o ciclo lítico e manter a latência (JUNG *et al.*, 2014).

Além da capacidade de regular a expressão dos mRNA virais, os miRNAs virais podem regular a expressão dos mRNA celulares, assim, em EBV, BART-18-5p suprime a expressão de MAP3K2 que participa da via de sinalização celular que medeia os sinais que iniciam a replicação viral (QIU; THORLEY-LAWSON, 2014).

Curiosamente, em HCMV o miR-UL112 se liga a MICB, um ligante induzido por estresse ao receptor NKG2D e expresso por células NK, essencial para a morte celular de células infectadas e tumorais (FRUCI; ROTA; GALLO, 2017). Outros miRNAs virais como o miR-BART2-5p e o miR-K12-7, codificados por EBV e HHV-8, respectivamente, utilizam também como alvo MICB para escapar do reconhecimento das células NK (NACHMANI *et al.*, 2009). Além disso, miRNAs virais como o miR-US5-1 e miR-UL112-3p em HCMV, visam IKK α e IKK β , respectivamente, para limitar a produção de citocinas pró-inflamatórias, consideradas como um dos mecanismos de evasão imunológica, modulando a sinalização NF-kB (HONCOCK *et al.*, 2017).

1.6. ALVOS TERAPÊUTICOS

Apesar da importância dos miRNAs nos herpesvírus está bem estabelecida, mais estudos sobre a interação entre os miRNAs virais e seus mRNAs alvos são necessários para identificar estratégias terapêuticas eficientes para prevenir e/ou curar as infecções virais.

Os miRNAs estão sendo estudados na criação de vacinas, regulação das proteínas que podem inibir a resposta da vacina e como biomarcadores da infecção. Em todos os casos, há desafios que devem ser estudados, uma vez que, cada miRNA pode interferir em muitos alvos. Portanto, tratamentos utilizando os miRNAs podem produzir efeitos

fora do alvo, comprometendo a segurança do hospedeiro se não for bem planejado (DRURY; O'CONNOR; POLLARD, 2017).

Assim, pesquisas em miRNAs pode fornecer pistas sobre o desenvolvimento, tratamento e monitoramento das infecções, possibilitando novas idéias para controlar as infecções e melhorar a vida dos hospedeiros (DRURY; O'CONNOR; POLLARD, 2017).

Diante do exposto, o desafio consiste em identificar miRNAs na espécie *Human gammaherpesvirus 4 tipo 2* e definir seus mRNAs alvos. Além disso, identificar as proteínas essenciais de uma rede de proteínas envolvidas com os mRNAs alvos. Essa caracterização é importante visto que uma melhor compreensão da autorregulação dos miRNAs virais, poderá facilitar o entendimento do processo da infecção viral, bem como o desenvolvimento de novos métodos de controle para essas infecções.

2. OBJETIVOS

2. 1. OBJETIVO GERAL

Compreender o papel dos miRNAs virais na autoregulação viral durante o processo de infecção do *Human gammaherpesvirus 4 tipo 2*.

2. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar microRNAs no genoma de *Human gammaherpesvirus 4 tipo 2*;
- Predizer os alvos dos microRNAs encontrados;
- Construir uma rede de interação proteína-proteína (PPI) para identificar as proteínas essenciais envolvidas com os microRNAs preditos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. DADOS DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

Os dados das sequências nucleotídicas do genoma e dos genes da espécie *Human gammaherpesvirus 4 tipo 2*, com número de acesso NC_009334 (*National Center of Biotechnology Information* –NCBI), foram extraídas da base de dados internacional GenBank mantida pelo NCBI e salvas no formato FASTA. O banco de dados GenBank contém publicamente sequências de nucleotídeos de aproximadamente 260.000 espécies, obtidas pela submissão individual de laboratórios de sequenciamento em larga escala (BENSON *et al.*, 2013) e pode ser acessado por meio da homepage do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.2. PREDIÇÃO DOS miRNAs VIRAIS

Para a predição dos miRNAs virais foi utilizado o programa *StructRNAfinder* (<http://structrnafinder.integrativebioinformatics.me>) uma ferramenta automatizada para a predição e anotação funcional de ncRNA através dos modelos de covariância de estrutura secundária, disponíveis no banco de dados de famílias de RNA.

Para isso, o programa integra automaticamente as ferramentas *Infernal* (<http://eddylib.org/infernal/>) e *RNAfold* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>) de forma otimizada e simplificada para facilitar a anotação do ncRNA, utilizando as informações disponíveis no banco de dados *Rfam* (<http://rfam.xfam.org/>). *Rfam* é um banco de dados de famílias de RNA onde cada uma das famílias é representada por um modelo de covariância (NAWROCKI *et al.*, 2014).

A ferramenta *Infernal* é utilizada para pesquisar homólogos de sequências e de estruturas secundárias de RNA por meio de um perfil de pontuação que utiliza um modelo estatístico, com base em um modelo probabilístico, chamado contexto estocástico livre do contexto da gramática (SCFG) (LARI; YOUNG, 1990). Os modelos de covariância são modelos probabilísticos que utilizam um sistema de pontuação de alinhamento que é específico da posição para cada par de base, com diferentes *scores* para cada posição, utilizando o modelo estatístico SCFG criado a partir dos alinhamentos no banco de dados *Rfam* (NAWROCKI *et al.*, 2014).

O programa *StructRNAfinder* permite que a pesquisa seja feita utilizando um dos dois métodos Infernal: (1) *cmsearch* que procura um ou mais modelos de covariância contra um banco de dados de sequência; ou (2) *cmscan* bastante utilizado em trabalhos de metagenômica, por procurar uma sequência em um banco de dados de modelos de covariância (NAWROCKI *et al.*, 2014).

Além disso, a ferramenta Infernal anota as estruturas secundárias de RNA usando uma representação string linear chamada de notação WUSS (*Washington University Secondary Structure notation*) que usa uma simbologia estendida a partir da notação de suporte comum para estruturas secundárias de RNA. Nesse perfil, cada parêntese representa uma base nucleotídica emparelhada e os pontos representam uma posição não envolvida com pareamento, por exemplo: (((...))) indica o pareamento de quatro bases com um loop de três bases (NAWROCKI *et al.*, 2014).

Embora a ferramenta Infernal anote as estruturas secundárias, não possui a capacidade de exibi-las, por isso se faz necessário o uso da ferramenta RNAfold, utilizada para prever a estrutura secundária dos precursores dos miRNAs usando como referência um conjunto de RNAs homólogos encontrados no banco de dados Rfam (NAWROCKI *et al.*, 2014).

Além disso, *StructRNAfinder* reconstrói a taxonomia de cada estrutura secundária de RNA predita de acordo com a anotação para cada família de RNA, utilizando o banco de dados Rfam. Para isso, o programa integra a ferramenta Krona (ONDOV; BERGMAN; PHILLIPPY, 2011) utilizada para gerar gráficos que mostram a abundância de todas as estruturas de RNA nos três domínios, incluindo os vírus (NAWROCKI *et al.*, 2014).

Para uso da ferramenta *StructRNAfinder* se fez necessário apenas um arquivo de entrada que são as sequências de nucleotídeos do genoma no formato FASTA e a escolha do método Infernal (*cmsearch* ou *cmscan*) para realizar as comparações. Neste trabalho, adotamos o método Infernal *cmsearch* que foi usado nas comparações de todas as sequências e modelos de covariância das estruturas secundárias disponíveis no banco de dados Rfam contra o genoma de *Human gammaherpesvirus 4 tipo 2*. Além disso, o programa computa a estatística *e-value* e tem 0.01 como nível de significância padrão. O valor de expectativa (*e-value*) é equivalente ao valor estatístico da probabilidade de o

alinhamento ocorrer por acaso. Portanto, estruturas com valores de *e-value* < 0.01 foram consideradas relevantes.

3.3. PREDIÇÃO DOS mRNAs ALVOS

A predição dos mRNAs alvos de miRNAs contribui na busca de novos alvos, talvez ainda não identificados experimentalmente. Assim, como uma estratégia inicial para apontar novos alvos, reduzindo tempo e custo, ferramentas de bioinformática foram desenvolvidas e são frequentemente utilizadas.

No presente estudo utilizamos a ferramenta IntaRNA para predição rápida e precisa de interações entre duas moléculas de RNA. Essa ferramenta foi projetada para prever os locais alvo de mRNA para ncRNAs, tais como os miRNAs, e pode ser acessada por meio da homepage (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de/>). O IntaRNA permite a previsão do mRNA alvo a partir das sequências nucleotídicas dos genes utilizando como abordagem a energia mínima livre (MFE, do inglês *Minimum Free Energy*) e a acessibilidade da região de interação.

A principal característica analisada nessa ferramenta foi o valor da energia mínima livre das moléculas, selecionando apenas as estruturas com os menores valores de energia mínima livre. Os menores valores da energia de interação miRNA:mRNA são considerados como uma energia baixa e muito estável no sistema biológico. Já a acessibilidade da região de interação prevê apenas os pares de bases intermoleculares, para isso utiliza algoritmos para prever a probabilidade do emparelhamento dos nucleotídeos em cada posição (MCCASKILL, 1990).

Para a utilização da ferramenta IntaRNA se faz necessário apenas dois arquivos de entrada no formato FASTA: um RNA curto (query) que são as sequências nucleotídicas dos miRNAs maduros, encontrados como descrito no item 3.2, e um RNA longo (target) que são as sequências nucleotídicas dos genes, ou fornecendo um número de acesso do NCBI para essas sequências. As interações de energia mínima livre são listadas e detalhadas para cada par de interação predita.

3.4. CONSTRUÇÃO DA REDE DE PROTEÍNAS

As buscas bioinformáticas possibilitam novas perspectivas de interações proteína-proteína (PPI) levando a novas descobertas e ajudando a desvendar como as redes de

proteínas estão organizadas. As redes PPI preditas neste trabalho, foram construídas com base nos programas de visualização de redes e análises da literatura, fornecendo pistas sobre o papel funcional das proteínas.

Para a construção das redes de proteínas foi utilizada a ferramenta *online* Vírus Mentha que pode ser acessada pela homepage (<http://virusmentha.uniroma2.it/index.php>) e apresenta de forma abrangente interações proteína-proteína (PPI), com curadoria manual, coletadas de diferentes fontes de banco de dados (MINT, IntAct, DIP, MatrixDB e BioGRID) que aderiram ao consorcio IMEx. Além disso, atribui a cada interação uma pontuação de confiabilidade que leva em consideração todas as evidências de suporte.

Virus Mentha captura todas as interações vírus-vírus e vírus-hospedeiro. Atualmente contém interações para 24 famílias virais. Em agosto de 2017, a integração dos dados com outros bancos de dados, resultaram em 15.258 interações não redundantes, suportadas por 12.316 publicações (CALDERONE; LICATA; CESARENI, 2014).

Pesquisas no banco de dados do Vírus Mentha podem ser realizadas diretamente na página inicial ao inserir no campo de pesquisa: IDs Uniprot, nomes de genes, nomes de polipeptídios, palavra-chave ou PMID único (ID da publicação no PubMed). Além disso, o usuário pode decidir pesquisar por todo o banco de dados ou restringir a pesquisa as famílias virais ou pelo organismo hospedeiro. Neste estudo, optamos por pesquisar pelo nome do gene ou nome do polipeptídio e restringimos a pesquisa a família *Herpesviridae*.

Posteriormente, os dados das redes foram exportados para o programa *Cytoscape* versão 3.5.1, o qual permite melhor visualização, exploração e análise dos dados das redes. Para isso, foi criado um arquivo .xls contendo os dados das interações entre as proteínas: virais- humanas e virais-virais, obtidas através da ferramenta Vírus Mentha.

Estas planilhas foram utilizadas para alimentar o programa *Cytoscape* e incluem o par de interação protéica e o score atribuído a cada par de interação. Cada linha da folha do Excel correspondia a uma interação entre duas proteínas, uma seria a fonte de interação e a outra o alvo da interação. O tipo de interação fornecido pelo Vírus Mentha foi definido pelo valor do *score* para cada par de interação. O valor do *score* corresponde a probabilidade da ocorrência de cada par de interação a partir dos dados da literatura.

Foi criado ainda um arquivo .xls, apenas com as proteínas únicas, categorizando essas proteínas em proteínas: alvos, virais e humanas. Além disso, foi atribuído para cada proteína as funções biológicas e moleculares a partir dos dados do site do Uniprot (*Universal Protein Resource*), utilizando o ID do Uniprot da proteína.

O site do Uniprot permite o acesso a sequência da proteína, informações funcionais e informações biológicas das proteínas. Essas informações são retiradas da literatura e organizadas para consulta. Adicionalmente, durante o desenvolvimento do trabalho foram realizadas buscas manual por cada gene ou proteína na literatura científica, utilizando o banco de dados textual PubMed, para auxiliar na análise dos dados.

Além de permitir a visualização da rede, o programa *Cytoscape* possibilita através do *plugin Network Analyzer*, analisar os valores topológicos das proteínas dentro da rede. Na execução do *Network Analyzer* a rede foi tratada como não-direcional, uma vez que uma rede de interação de proteínas normalmente representa apenas interações físicas entre as proteínas, sem informações de direcionamento pré-definido. Através da atribuição de valores numéricos a cada proteína contida na rede, a ferramenta *Network Analyzer* avalia vários parâmetros.

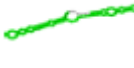
Além disso, o programa *Cytoscape* permite validar as interações entre proteínas. Para isso, foi instalado o *plugin Network Randomizer* que permite a criação de uma rede randômica a partir da rede de interesse predita, usando um algoritmo de baralhamento simples e um algoritmo de preservação de *degree* (grau). Esse aplicativo gera uma rede randômica para ser usada como referência para validar uma rede de interesse. Depois que as redes de interesse são carregadas e as redes randômicas geradas, o aplicativo torna possível comparar os atributos topológicos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

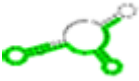
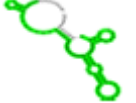
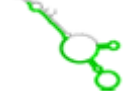
4.1. PREDIÇÃO DOS miRNAs

Utilizando o programa *StructRNAfinder* para a predição dos miRNAs, como descrito na sessão matérias e métodos (item 3.2), foi possível predizer um total de 55 precursores de miRNAs (pré-miRNA) em todo o genoma do vírus, adotando *e-value* < 0,01 (**Tabela 3**). Uma vez que quanto menor esse valor, menor a chance de que o alinhamento tenha acontecido por acaso e, portanto, quanto mais próximo de zero, maior a chance de que este mostre uma similaridade com significado real.

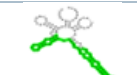
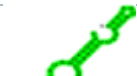
Tabela 3. Candidatos a miRNA de *Human gammaherpesvirus 4 tipo 2* que apresentaram similaridade com miRNAs presentes no banco de dados Rfam.

Sequência	Infernal						RNAfold	
	Família RNA	Id	Início sequência	Fim sequência	Score	E-value	Score	Estrutura
MiRNA								
DQ279927.1_12	mir-346	RF00758	105101	105006	23.1	0.0046	-35.30	
DQ279927.1_13	mir-328	RF00772	153087	153164	21.6	0.006	-23.20	
DQ279927.1_14	mir-11	RF00813	147915	147987	32.5	4.3e-06	-31.00	
DQ279927.1_19	MIR169_5	RF00865	7749	7899	29.6	6.3e-05	-50.70	
DQ279927.1_20	MIR169_5	RF00865	7960	7810	26.7	0.00033	-57.80	
DQ279927.1_38	mir-504	RF00939	149 009	149091	21.8	0.008	-38.30	
DQ279927.1_39	mir-661	RF00960	74787	74876	25.6	0.0035	-37.30	
DQ279927.1_40	mir-589	RF00987	163453	163364	24.7	0.0021	-42.80	
DQ279927.1_41	mir-563	RF01003	7952	7906	22.3	0.0048	-25.70	

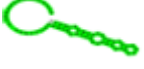
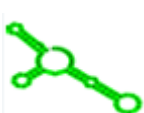
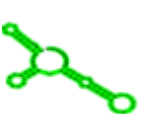
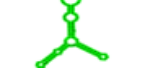
Continuação da tabela 3.

DQ279927.1_42	mir-1306	RF01014	49774	49822	21.3	0.0035	-21.80	
DQ279927.1_43	mir-567	RF01036	7904	7790	27.7	0.00042	-36.80	
DQ279927.1_44	mir-654	RF01922	12544	12630	22.9	0.00089	-63.40	
DQ279927.1_45	mir-654	RF01922	15614	15700	22.9	0.00089	-47.90	
DQ279927.1_46	mir-654	RF01922	18684	18770	22.9	0.00089	-53.30	
DQ279927.1_47	mir-654	RF01922	21754	21840	22.9	0.00089	-41.50	
DQ279927.1_48	mir-654	RF01922	24824	24910	22.9	0.00089	-36.70	
DQ279927.1_49	mir-654	RF01922	27894	27980	22.9	0.00089	-22.60	
DQ279927.1_50	mir-654	RF01922	30964	31050	22.9	0.00089	-24.30	
DQ279927.1_51	mir-654	RF01922	34034	34120	22.9	0.00089	-13.70	
DQ279927.1_52	MIR1223	RF01941	120367	120455	18.5	0.0088	-25.20	
DQ279927.1_21	mir-BART3	RF00866	140048	140123	96.2	2.1e-22	-21.50	
DQ279927.1_22	mir-BART3	RF00866	139909	139983	95.7	2.9e-22	-9.24	
DQ279927.1_23	mir-BART3	RF00866	139983	139909	36.2	1.4e-06	-9.24	

Continuação da tabela 3.

DQ279927.1_24	mir-BART3	RF00866	140123	140048	25.7	0.00079	-21.50	
DQ279927.1_28	mir-BART15	RF00868	140335	140412	99.4	9.5e-24	-11.30	
DQ279927.1_29	mir-BART15	RF00868	140412	140335	27.4	0.00023	-11.30	
DQ279927.1_30	mir-BART15	RF00868	140494	140574	24.2	0.0017	-26.00	
DQ279927.1_53	mir-1937	RF01942	171545	171604	19.6	0.00063	-27.10	
DQ279927.1_54	mir-1937	RF01942	172103	172162	19.6	0.00063	-26.50	
DQ279927.1_55	mir-1937	RF01942	172647	172706	19.6	0.00063	-16.60	
DQ279927.1_1	mir-BART1	RF00363	140174	140243	101.7	2.8e-27	-11.50	
DQ279927.1_2	mir-BART1	RF00363	139913	139982	36.0	1.1e-07	-7.54	
DQ279927.1_3	mir-BART1	RF00363	140240	140171	24.3	0.00033	-10.90	
DQ279927.1_4	mir-BART1	RF00363	139791	139847	20.6	0.0043	-19.60	
DQ279927.1_5	mir-BART2	RF00364	154229	154290	89.8	1.7e-21	-28.50	
DQ279927.1_6	mir-BHRF1-1	RF00365	41587	41652	96.3	5,00E-24	-20.90	
DQ279927.1_7	mir-BHRF1-1	RF00365	41651	41586	35.3	8.8e-07	-21.10	

Continuação da tabela 3.

DQ279927.1_8	mir-BHRF1-2	RF00366	42964	43028	92.6	1,00E-20	-0.90	
DQ279927.1_9	mir-BHRF1-2	RF00366	43028	42964	38.3	1.2e-06	-0.90	
DQ279927.1_10	mir-BHRF1-3	RF00367	43082	43146	100.1	1.3e-26	-19.00	
DQ279927.1_11	mir-BHRF1-3	RF00367	43144	43080	22.1	0.0025	-18.50	
DQ279927.1_15	mir-BART17	RF00863	140723	140824	117.2	2.1e-29	-23.00	
DQ279927.1_16	mir-BART17	RF00863	140823	140723	29.5	2.5e-05	-23.00	
DQ279927.1_17	mir-BART20	RF00864	149811	149890	102.1	4.2e-25	-13.30	
DQ279927.1_18	mir-BART20	RF00864	149890	149811	35.2	1.1e-06	-13.30	
DQ279927.1_25	mir-BART5	RF00867	140490	140578	107.3	4.8e-25	-28.30	
DQ279927.1_26	mir-BART5	RF00867	140847	140933	28.7	0.00018	-22.20	
DQ279927.1_27	mir-BART5	RF00867	140578	140490	27.0	0.00047	-28.30	
DQ279927.1_31	mir-BART7	RF00869	147909	147994	108.2	2.2e-25	-32.70	
DQ279927.1_32	mir-BART7	RF00869	147994	147909	56.8	6.8e-12	-32.70	
DQ279927.1_33	mir-BART12	RF00874	149363	149457	106.6	6.1e-25	-33.30	

Continuação da tabela 3.

DQ279927.1_34	mir-BART12	RF00874	149463	149369	34.0	4.6e-06	-33.30	
DQ279927.1_35	mir-BART12	RF00874	147901	147996	33.2	7.7e-06	-33.00	
DQ279927.1_36	mir-BART12	RF00874	148784	148874	24.7	0.0012	-12.60	
DQ279927.1_37	mir-BART12	RF00874	149677	149773	23.8	0.0021	-20.40	

Uma das estratégias utilizadas para encontrar novos miRNAs é procurar por seus precursores (pré-miRNAs) (WARRIS *et al.*, 2014). O programa *StructRNAfinder* identifica novos miRNAs com base na homologia da estrutura secundária de famílias de miRNAs já conhecidas. Assim, além de possibilitar a criação da provável estrutura do pré-miRNA, fornece as sequências nucleotídicas do miRNA maduro.

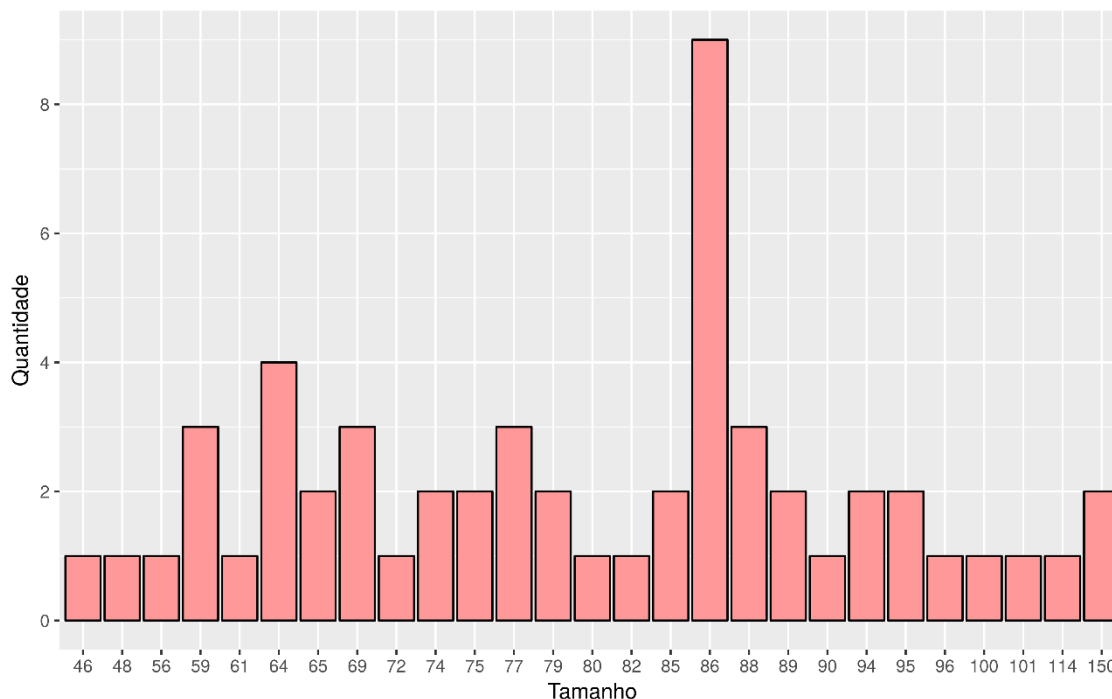
Neste trabalho, observamos que os miRNAs preditos para a espécie *Human gammaherpesvirus 4 tipo 2* (vírus Epstein-Barr) apresentaram homologia com as famílias dos miRNAs do domínio Eukarya e de vírus. Possivelmente, a homologia com os miRNAs do domínio Eukarya ocorre porque os miRNAs virais também podem ser análogos aos miRNAs da célula hospedeira, por compartilhamento da região “seed” com os miRNAs celulares, possuindo, portanto, os mesmos mRNAs alvos (KINCAID; SULLIVAN, 2012).

Logo, a presença dos miRNAs preditos em famílias de miRNAs do domínio Eukarya e nos vírus, sugerem diferentes funções. Assim, os miRNAs preditos homólogos aos miRNAs do domínio Eukarya podem reprimir os miRNAs celulares. Possivelmente, os vírus impeçam a expressão dos miRNAs celulares sobreexpressando seus próprios miRNAs virais (SKALSKY; CULLEN, 2010).

Também foi possível observar uma variação no tamanho dos 55 pré-miRNAs, que apresentaram uma extensão de 46 a 150 nucleotídeos (nt), com uma média de 98 nt por sequência (**Figura 6**). Esse tamanho longo acontece porque a predição foi realizada

considerando os nucleotídeos disponíveis em toda a estrutura secundária. Além disso, as maiores frequências dos pré-miRNAs preditos, que foram de 9 e 4, foram visualizadas com tamanhos de 86 e 64 nt., respectivamente.

Figura 6. Variação no tamanho dos pré-miRNAs preditos.



Nota: O gráfico mensura a frequência no tamanho de cada pré-miRNA predito.

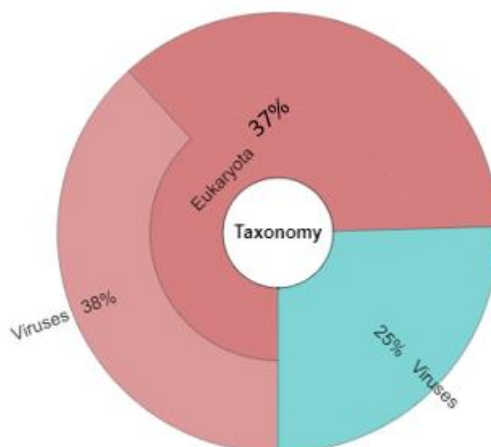
Os pré-miRNAs virais são conhecidos por apresentarem entre 60 a 120 nucleotídeos (nt) (WARRIS *et al.*, 2014). Embora os pré-miRNAs preditos não estejam completamente dentro da faixa dos miRNAs virais conhecidos, valores similares foram encontrados em miRNAs do vírus da dengue, variando entre 62 a 157 nt. (OSPINA-BEDOYA *et al.*, 2014).

Além disso, em diversos organismos, uma faixa entre 50 a 300 nucleotídeos abrange o comprimento dos pré-miRNAs conhecidos (WARRIS *et al.*, 2014). Portanto, os vários comprimentos dos pré-miRNAs virais identificados, sugerem possíveis papéis únicos para a modulação da biogênese do miRNA ou da expressão gênica (ZHANG *et al.*, 2006).

De acordo com o programa Krona foi possível predizer a taxonomia de cada pré-miRNA predito, mostrando sua abundância nos três domínios, incluindo os vírus. Observou-se que dos 55 pré-miRNAs, 63% foram abundantes nas famílias virais, embora

38% sejam compartilhadas com as famílias dos miRNAs do domínio Eukarya (**Figura 7**).

Figura 7. Taxonomia da estrutura secundária dos miRNAs preditos

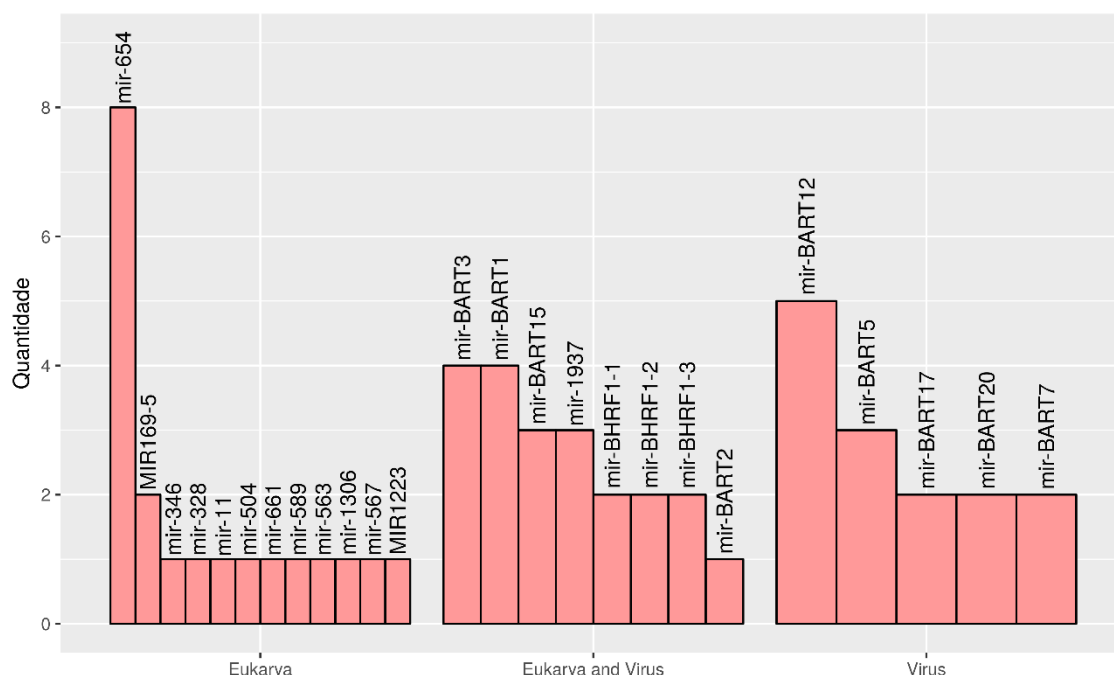


Nota: 14 (25%) dos pré-miRNAs preditos são exclusivas de famílias de miRNAs do vírus Epstein-Barr, 21 (38%) pertencem a famílias de miRNAs do vírus Epstein-Barr compartilhadas com as famílias de miRNAs do domínio Eukarya e 20 (37%) pertencem apenas as famílias de miRNAs do domínio Eukarya.

Apesar de identificados 55 miRNAs, a maioria dos miRNAs preditos apresentaram homologia com apenas 25 diferentes miRNAs conhecidos. De fato, a maioria dos miRNAs de herpesvírus mostram pouca semelhança com outros miRNAs virais ou celulares (SKALSKY; CULLEN, 2010).

Os pré-miRNAs preditos tiveram homologia da estrutura secundária com 25 diferentes famílias de miRNAs e apresentaram uma distribuição variada entre as famílias dos miRNAs do domínio Eukarya e dos vírus (**Figura 8**). Por exemplo, foram identificados 8 membros para a família mir-654 (RF01922) do domínio Eukarya, enquanto, apenas 1 membro foi descrito para a família mir-BART2 (RF00364) compartilhada entre o domínio Eukarya e os vírus.

Figura 8. Número de membros dos pré-miRNAs preditos em cada família de miRNA



Nota: Número de membros dos pré-miRNAs preditos, distribuídos nas famílias de miRNAs dos eucariotos e vírus, de acordo com a similaridade das estruturas secundárias.

Essa variação no número de membros que constitui cada família, pode ser um indicativo das diferentes funções exercidas por esses miRNAs. Por exemplo, uma das famílias dos miRNAs do domínio Eukarya, como a família do mir-654 (RF01922), não possui função conhecida no EBV. Entretanto, no vírus Influenza A parece controlar a replicação viral através da degradação do mRNA que codifica a subunidade catalítica PB1 da RNA polimerase RNA dependente, que é a responsável pela replicação e transcrição do RNA do vírus Influenza A (SONG *et al.*, 2010).

Enquanto isso, as famílias de miRNAs exclusivas do EBV, como mir-BART5 (RF00867), tem como alvo a proteína pró-apoptótica PUMA. Conferindo resistência a apoptose em células associados ao carcinoma da nasofaringe (NPC) (CHOY *et al.*, 2008).

Por outro lado, algumas das famílias de miRNAs em comum com os vírus e o domínio Eukarya, foram: mir-BART2 (RF00364), conhecida como um inibidor da replicação viral através do pareamento com o mRNA da DNA polimerase viral, BALF5 (BARTH *et al.*, 2007); e o mir-BART3 (RF00866) que está associado a supressão de DICE1 (um supressor de tumor), promovendo o crescimento celular e o potencial oncogênico (LEI *et al.*, 2013).

Além de todos esses dados, o programa *StructRNAfold* fornece a partir dos precursores dos miRNAs preditos a sequência do miRNA maduro. Essa sequência, foi utilizada para a predição dos mRNAs alvos.

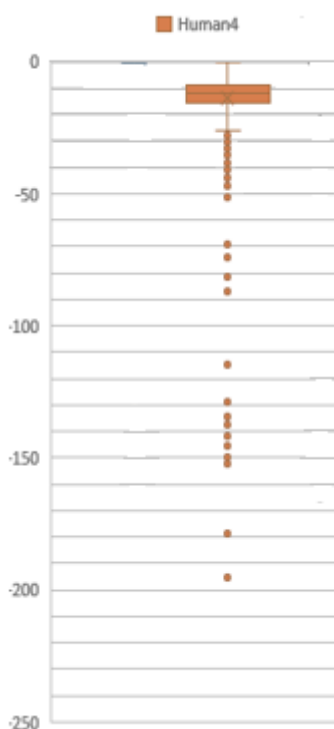
4.2. ALVOS DOS miRNAs VIRAIS

Buscando uma melhor compreensão da finalidade dos miRNAs no vírus Epstein-Barr, foi feita uma previsão dos alvos dos miRNAs com base em sua complementaridade com os mRNAs alvos.

Neste estudo, através da ferramenta IntaRNA, foi feita uma comparação dos 55 miRNAs com todas as regiões de codificação de gene (CDS- *Coding DNA Sequence*) do vírus. Além disso, utilizamos um dos critérios amplamente aceito para filtrar resultados das interações RNA-RNA, o menor valor da energia mínima livre (MFE), que identifica o pareamento mais favorável para a ligação entre as moléculas de RNA.

Para isso, utilizamos como estatística o boxplot (gráfico de caixa) para avaliar os valores de energia mínima livre (MFE) encontradas para todos os genes do vírus Epstein-Barr (**Figura 9**).

Figura 9. Valores de energia mínima livre (MFE) encontradas para todos os genes do vírus Epstein-Barr.

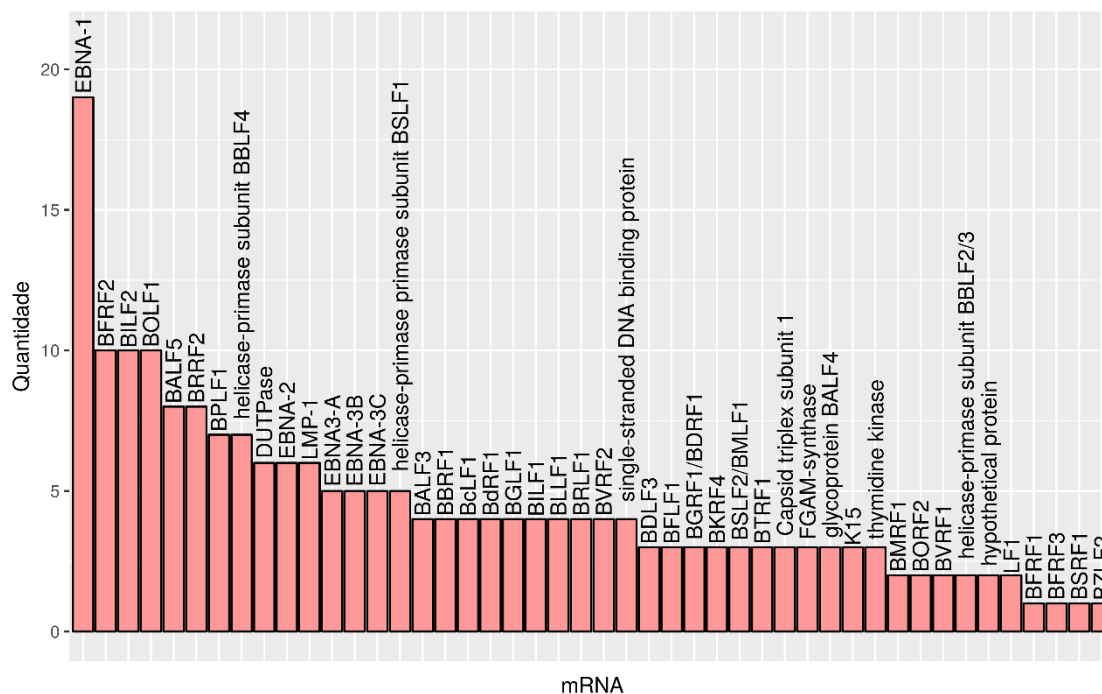


Observamos que a maioria das interações miRNA:mRNA apresentaram valores de MFE próximos a zero, apresentando uma mediana (50%) entre -10 e -20. Interessantemente, alguns valores atípicos, que foram encontrados muito afastados da grande maioria dos dados, apresentaram os menores valores de energia mínima livre e, portanto, os melhores valores de MFE que foram entre -26,31 a -195,1 kcal/mol.

Logo, optamos por utilizar apenas as interações com os menores e, portanto, melhores valores de energia mínima livre. Embora, consideramos interessante estudar as interações com valores próximos a zero. Uma vez que, como apresentaram o maior número de interações miRNA:mRNA, seja de alguma forma, talvez ainda não conhecida, interessante para o sistema biológico. Além disso, Xue e colaboradores (2008) consideraram $MFE < -25$ kcal/mol uma energia baixa e muito estável no sistema biológico.

Nossa análise revelou que dos 55 miRNAs preditos, apenas 36 encontraram seus respectivos mRNAs alvos. Embora, o programa tenha previsto 46 mRNAs (proteínas virais) para os 36 miRNAs preditos (**Figura 10**).

Figura 10. Quantidade de miRNA para cada mRNA alvo.



Nota: Frequência dos 36 miRNAs preditos nas 46 proteínas virais.

Logo, nossos resultados corroboram com o fato de que um mesmo miRNA pode ser complementar a mais de um mRNA alvo ou um mesmo miRNA pode atingir

diferentes regiões do mesmo mRNA alvo (UMBACH; CULLEN, 2009). Assim, muitos alvos são regulados por dois ou mais miRNAs ao mesmo tempo, como já demonstrado em outros estudos.

As proteínas que obtiveram o maior número de miRNAs foram: EBNA1, BFRF2, BILF2, BOLF1, BALF5 e BRRF2, com valores de energia mínima livre de 114,6 kcal/mol, 41,99 kcal/mol, 152,1kcal/mol, 49,16 kcal/mol, 37,33 kcal/mol e 45,31 kcal/mol, respectivamente. Essas proteínas estão envolvidas em diversos processos biológicos, embora algumas não tenham funções conhecidas:

A proteína EBNA1 é uma proteína que participa da replicação e persistência do genoma viral, degradação de p53 e oncogênese (KANG; KIEFF, 2015). Já a proteína BFRF2 não possui função conhecida. Embora, seja essencial para a produção das partículas infecciosas de EBV. Sendo, uma das seis proteínas virais necessárias para a ativação dos genes virais tardios (AUBRY *et al.*, 2014).

BILF2 é uma glicoproteína que não foi atribuída a nenhuma função (HUTT-FLETCHER, 2015), descrita como “gp78/55”, sendo uma proteína de membrana tipo 1, detectável no envelope dos vírions (MACKETT *et al.*, 1990). BOLF1 é uma proteína do tegumento que possui papel essencial no envolvimento secundário durante a saída viral. Além disso, interage com a cápside através da proteína do tegumento grande/LTP e participa do seu transporte para a rede trans-golgi do hospedeiro, onde ocorre o envolvimento secundário. Por fim, modula a tegumentação e a acumulação da cápside no complexo de montagem viral (UNIPROT, 2017).

A proteína do tegumento BRRF2, localizada no citoplasma das células infectadas por EBV durante a fase lítica, não possui função conhecida. Embora, estudos tenham mostrado que a supressão de BRRF2 não afeta a replicação do DNA viral, mas diminui a produção do vírus. Portanto, BRRF2 está envolvida na produção de progênie infecciosas, embora não seja essencial para a replicação lítica (WATANABE *et al.*, 2015). Por sua localização no citoplasma, provavelmente, participe da maturação ou transporte das progênie virais (WATANABE *et al.*, 2015).

Por fim, a proteína BALF5, localizada no citoplasma, participa da replicação do vírus Epstein-Barr (EBV), sendo a subunidade catalítica da DNA polimerase. Portanto, replica o DNA genômico viral na fase tardia da infecção lítica. Além disso, BALF5

interage com o fator de processividade da polimerase BMRF1, resultando no seu eficiente transporte para o núcleo (KAWASHIMA *et al.*, 2013).

De acordo com Steitz e colaboradores (2010), os miRNAs virais desempenham papéis no aumento do ciclo de vida viral ou neutralizando os agentes antivirais do hospedeiro. Curiosamente, os alvos dos miRNAs preditos possuem funções com a mesma finalidade. Embora, apresentem algumas proteínas não caracterizadas e/ou pouco elucidadas (**Tabela 4**).

Tabela 4. mRNA alvo e a respectiva função da proteína.

Nome da proteína	Função
LMP-1	Previne apoptose e impulsiona a proliferação
BILF2	Proteína de membrana não caracterizada
BALF3	Embalagem do genoma viral e saída do vírus
helicase-primase primase subunit BSLF1	Replicação do DNA viral
hypothetical protein	Interação vírus-hospedeiro e Evasão imune
EBNA-1	Replicação e transcrição viral; evasão imune
LF1	Proteína não caracterizada
BOLF1	Proteína do tegumento
Capsid triplex subunit 1	Replicação e transcrição viral; evasão imune
BRRF2	Proteína do tegumento
EBNA-2	Interação vírus-hospedeiro, evasão imune, modulação do ciclo celular e transcrição
BPLF1	Interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
helicase-primase subunit BBLF2/3	Replicação do DNA viral
DUTPase	Metabolismo dos nucleotídeos
BFRF2	Processo viral
BORF2	Replicação do DNA e liberação da latência viral
EBNA-3C	Transcrição, modulação da progressão do ciclo celular hospedeiro; e interação vírus-hospedeiro
EBNA-3B	Transcrição, modulação da progressão do ciclo celular hospedeiro; e interação vírus-hospedeiro
BALF5	Replicação do DNA e replicação do DNA viral
BLLF1	Interação vírus-hospedeiro
helicase-primase subunit BBLF4	Replicação do DNA viral
BVRF2	Montagem da cápside e saída do vírus da célula hospedeira
FGAM-synthase	Proteína do tegumento envolvida na interação vírus-hospedeiro
BBRF1	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
BDLF3	Componente integral da membrana
BFLF1	Embalagem do DNA viral
BRLF1	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e reativação viral a partir da latência
single-stranded DNA binding protein	Replicação do DNA viral
BGLF1	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
BZLF2	Interação vírus-hospedeiro
EBNA-3 ^a	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e regulação da transcrição

Continuação da tabela 4.

BcLF1	Automontagem da cápside viral
glycoprotein BALF4	Interação vírus-hospedeiro
BdRF1	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula
thymidine kinase	Síntese do DNA viral
BKRF4	Proteína do tegumento
K15	Interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
BGRF1/BDRF1	Embalagem do DNA e saída do vírus da célula hospedeira
BSLF2/BMLF1	Interação vírus-hospedeiro, evasão imune, transporte do mRNA e transcrição
BFRF1	Componente da membrana
BTRF1	Proteína não caracterizada
BFRF3	Processo viral
BILF1	Componente da membrana
BVRF1	Interação vírus-hospedeiro, embalagem do genoma viral, penetração viral no núcleo
BSRF1	Saída do vírus do espaço perinuclear
BMRF1	Transcrição do DNA viral

Entre as funções encontradas nos alvos dos miRNAs preditos, observou-se que a maioria estão envolvidas com proteínas que participam dos processos de replicação e transcrição viral, prevenção da apoptose e evasão imune. Assim, sugere-se um melhor estudo desses miRNAs e seus alvos, através de trabalhos experimentais, por exemplo.

4.3. REDE DE INTERAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para representar a relação dos 36 miRNAs e seus respectivos mRNAs alvos, foi realizada uma rede de interação de proteínas através da ferramenta *online* Vírus Mentha e os dados visualizados no programa *Cytoscape*. Assim, Vírus Mentha reconheceu através do nome do gene ou do polipeptídeo 27 proteínas alvos (**Tabela 5**).

Tabela 5. Proteínas reconhecidas pela ferramenta Vírus Mentha.

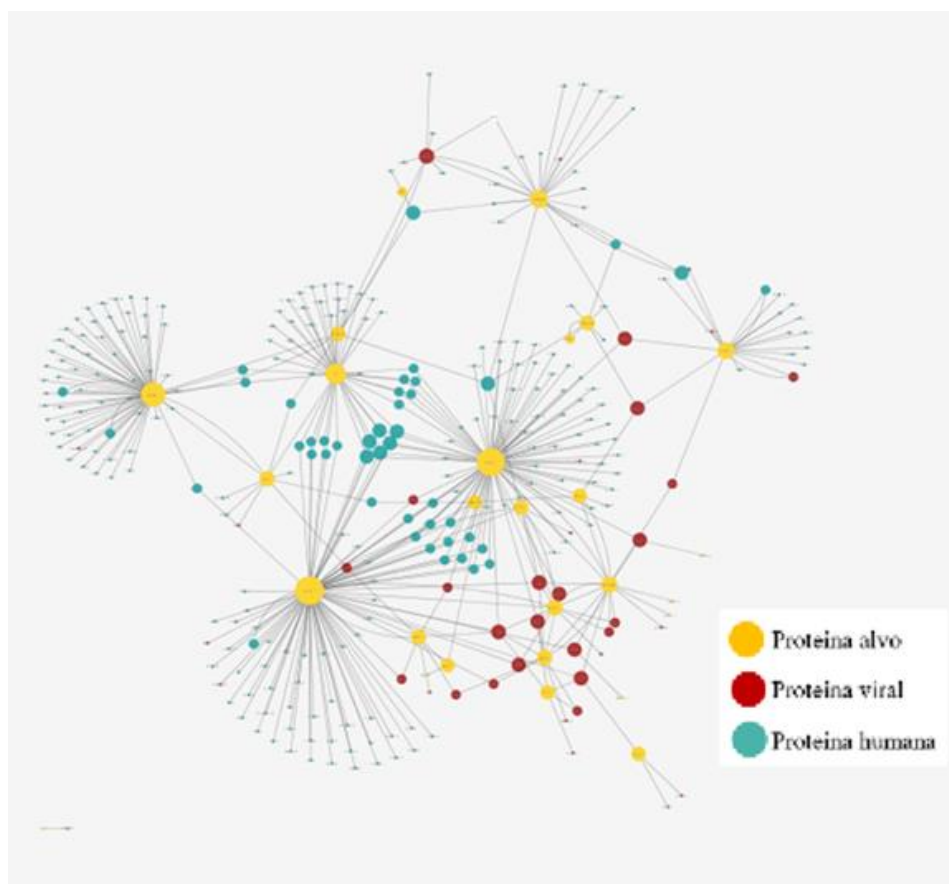
NOME DA PROTEÍNA	ID UNIPROT
LMP-1	Q1HVB3
helicase-primase primase subunit BSLF1	A0A1P7TZW0
EBNA-1	Q1HVF7
LF1	Q1HVC3
BOLF1	Q1HVB8
BRRF2	Q1HVF8
EBNA-2	Q69022
BPLF1	Q1HVB9
helicase-primase subunit BBLF2/3	A0A1P7U116
EBNA-3C	Q69140
EBNA-3B	I1YP20
BALF5	Q1HVC1
BLLF1	P68343

Continuação da tabela 5.

BVRF2	Q1HVC7
BDLF3	A0A1P7U005
BFLF1	A0A1P7U1E1
BRLF1	Q1HVG0
single-stranded DNA binding protein	Q1HVB8
BZLF2	Q1HVG2
EBNA-3 ^a	Q69138
thymidine kinase	Q1HVD1
BKRF4	P0C724
BSLF2/BMLF1	Q1HVB2
BTRF1	Q1HVD3
BILF1	A0A1P7U033
BSRF1	P0CK50
BMRF1	P0C6Z0

Os nós da rede de PPI foram coloridos de acordo com suas categorias taxonômicas e apresentaram 331 nós (nodes) e 433 interações (edges). Destas, 64 foram proteínas virais e 267 proteínas humanas (**Figura 11**).

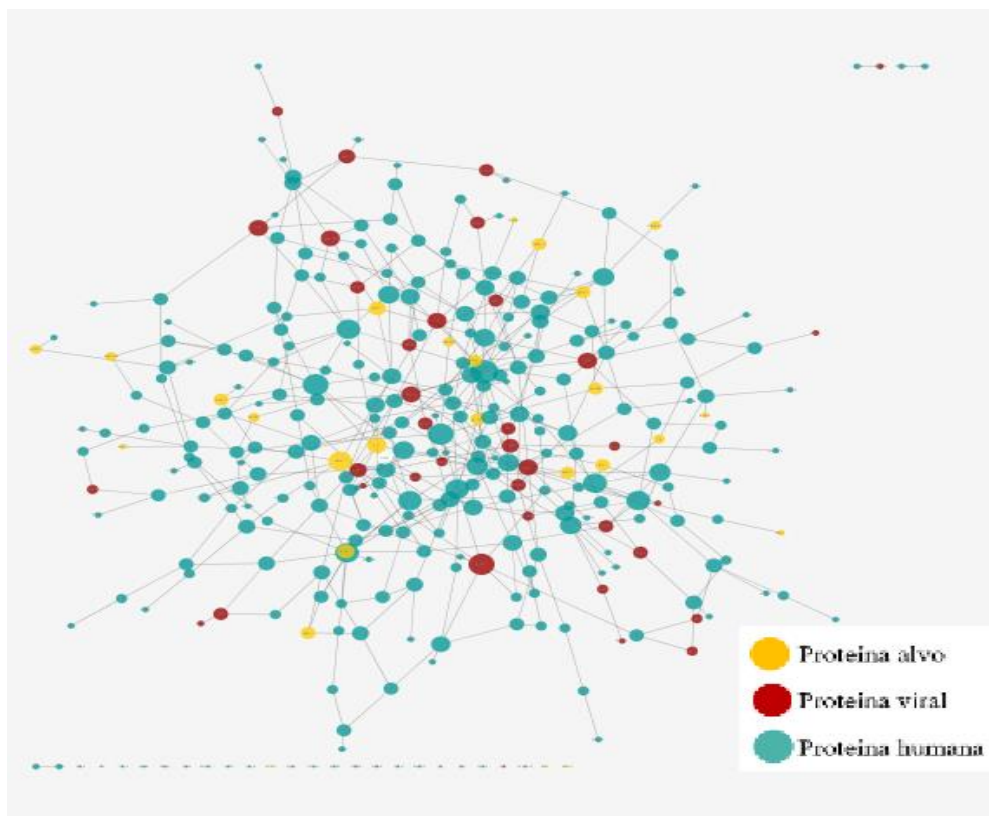
Figura 11. Rede de interação de proteínas.



Nota: A rede de PPI visualizada no *cytoscape*, categorizadas em: proteínas alvo (amarelas), proteínas virais (vermelho) e proteínas humanas (azul).

Além disso, para validação da rede de PPI do vírus, utilizamos o *plugin Network Randomizer* para gerar uma rede randômica a partir da rede predita, mantendo inalterados o número de nós e de interações (**Figura 12**). Essa rede randômica serve para validação da rede predita através da comparação dos parâmetros topológicos.

Figura 12. Rede randômica



Nota: A rede de PPI visualizada no *cytoscape*, categorizadas em: proteínas alvo (amarelas), proteínas virais (vermelho) e proteínas humanas (azul).

Sabendo-se que a ligação do miRNA ao mRNA alvo possibilita a degradação ou inibição da proteína. Um dos principais questionamentos realizados frente a rede de interação de proteínas foi a identificação das proteínas consideradas essenciais para entender os efeitos que decorrem da sua neutralização. Portanto, para tentar entender os efeitos que podem ser causados em uma rede a partir da neutralização de uma proteína, os índices topológicos foram utilizados.

Para isso, utilizamos o *plugin Network Analyzer* que permite a análise da rede e o respectivo cálculo dos parâmetros topológicos. Os índices topológicos são medidas atribuídas para cada nó que levam em consideração a posição e o papel que um determinado nó exerce em uma rede (AITTOKALLIO; SCHWIKOWSKI, 2006).

Após executarmos o *Network Analyzer* os resultados são apresentados em uma tela com o conjunto de dados dos parâmetros topológicos da rede, alguns desses parâmetros são: componentes conectados, assim considerados todos os nós que estão conectados em par ou que estão isolados; diâmetro da rede, que considera a maior distância entre dois nós; coeficiente de agrupamento, que mede o grau com que os nós de um grafo tendem a agrupar-se; e o comprimento médio do caminho mais curto (comprimento do caminho característico), que fornece a distância esperada entre dois nós conectados (**Tabela 6**).

Tabela 6. Alguns dos parâmetros analisados na ferramenta *Network Analyzer*.

	Rede predita	Rede randômica
Componentes conectados	2	29
Diâmetro da rede	9	12
Coeficiente de agrupamento	0,066	0,004
Comprimento do caminho característico	3.792	5.841

Comparando os componentes conectados, o diâmetro da rede e o comprimento do caminho característico, observamos que os valores da rede randômica são superiores aos obtidos na rede predita, exceto para o coeficiente de agrupamento. Portanto, comparando os dados topológicos da rede predita com a rede randômica, obtivemos valores bem diferentes e com melhores resultados para a rede predita.

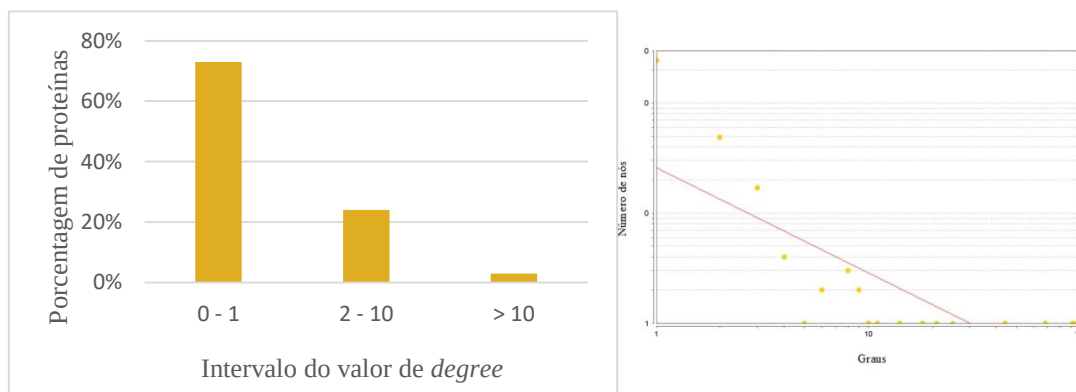
Logo, sugere-se que a rede predita não seja formada por interações aleatórias e, portanto, possua viés biológico. Assim, esses dados corroboram com o esperado para a rede predita, mostrando que ela apresenta maior conectividade entre os nós (proteínas) e maior rapidez no transporte das informações contidas nos nós.

A distribuição de *degree* (graus) também foi analisada. Esse parâmetro considera a probabilidade de um determinado grau aparecer na rede. As proteínas com o maior valor de *degree* são as proteínas de maior importância dentro da rede em estudo e são consideradas proteínas *hubs*, isto é, são as proteínas com o maior número de ligações (*edges*) que cada nó (*nodes*) estabelece (AITTOKALLIO; SCHWIKOWSKI, 2006).

Assim, na rede predita existe um grande número de nós com poucas interações e um pequeno número de nós com muitas interações. Isso pode ser melhor visualizado na figura abaixo (**Figura 13**). Além disso, foi possível observar que a rede predita apresenta

um *Power Law* (comportamento da lei de potência), demonstrando que os graus de distribuição da rede satisfazem a lei de potência (**Figura 13**). Por outro lado, a rede randômica apresenta uma distribuição razoavelmente homogênea na quantidade de ligações entre os nós, apresentando poucos nós com um grau baixo de conectividade (BARABASI; ALBERT, 1999).

Figura 13. Porcentagem de proteínas pelo valor de *degree*.



Nota: (a) Distribuição da porcentagem de proteínas pelo valor de *degree*. Podemos observar que 73% das proteínas presentes na rede apresentam valor de *degree* entre os intervalos (0-1) e que apenas 3% das proteínas compreendem a um intervalo maior que 10. (b) comportamento da rede de interação predita seguindo o *Power Law* (lei de potência).

O resultado encontrado na distribuição de *degree* foi o esperado e idêntico ao observado noutros trabalhos, que também revelaram que do total das proteínas presentes nas redes de PPI, normalmente, poucas são consideradas proteínas *hubs*, isto é, poucas proteínas apresentam um número de interações superior as outras proteínas presentes na rede. Na rede predita apenas 3% das proteínas apresentaram um número maior de ligações, sendo, portanto, consideradas proteínas *hubs*.

As redes biológicas possuem uma topologia de rede conhecida como livre de escala (“*Scale-free*”) e seguem uma distribuição em lei de potência (BARABÁSI; ALBERT, 1999). Uma das propriedades da lei de potência é a correlação. A correlação revela se existe uma relação funcional entre uma variável e as variáveis restantes e o quão forte é a ligação entre essas variáveis (BARABÁSI; ALBERT, 1999). Na rede predita obtivemos uma correlação de 0,915 enquanto que na rede randômica a correlação foi de 0,477 o que é suficiente para corroborar que a distribuição dos nós na rede predita segue uma lei de potência e que, portanto, é grande a possibilidade de que variações em uma proteína sejam acompanhadas por outras proteínas.

Outra propriedade analisada foi o *R-square* (R quadrado) que representa a porcentagem da alteração da variável de resposta explicada pela relação com uma ou mais variáveis preditoras. Normalmente, quanto maior for o valor do R quadrado, melhor o modelo ajusta os dados (MINITAB, 2017). O valor do R quadrado da rede predita foi de 59,7% e da rede randômica de 52,7% o que representa uma boa porcentagem de ajuste dos dados caso aconteça alterações nos nós (proteínas) na rede.

Outros parâmetros considerados para análise foram dois índices de centralidades, dentre os possíveis: centralidade de intermediação (*betweenness centrality*) e centralidade de proximidade (*closeness centrality*), essas medidas são baseadas na suposição de que a informação é transmitida somente ao longo dos possíveis caminhos mais curtos (AITTOKALLIO; SCHWIKOWSKI, 2006).

A centralidade de intermediação (*betweenness centrality*) considera o controle da comunicação entre todos os nós da rede. Assim, quanto maior for o seu valor, maior a chance de uma proteína conectar diferentes agrupamentos ou processos biológicos, indicando, portanto, maior importância para a estrutura da rede (AITTOKALLIO; SCHWIKOWSKI, 2006).

Por outro lado, a centralidade de proximidade (*closeness centrality*) é uma medida do comprimento médio dos caminhos mais curtos para acessar todas as outras proteínas na rede. Portanto, está relacionada com a rapidez que uma informação leva para ser compartilhada por todos os outros nós da rede. Assim sendo, quanto maior for o seu valor, mais central será a proteína (AITTOKALLIO; SCHWIKOWSKI, 2006).

Neste trabalho, identificamos 10 proteínas essenciais ou proteínas *hubs* da rede predita, notamos que, como esperado, todas as proteínas *hubs* são de origem viral e foram as consideradas alvos dos miRNAs preditos. Também observamos que entre as proteínas consideradas *hubs* as proteínas BTRFI e BSRF1 apresentaram os maiores valores de grau, centralidade de intermediação e centralidade de proximidade (**Tabela 7**).

Tabela 7. Proteínas *hubs* e valores de centralidade.

Nome da proteína	Valor de <i>degree</i>	Centralidade de intermediação	Centralidade de proximidade
BTRF1	96	0.49498261	0.42213642
BSRF1	92	0.44576984	0.40644362
EBNA1	68	0.34230639	0.32507433
TK	44	0.18056953	0.32251721
EBNA2	25	0.15093067	0.28621291
LMP1	21	0.09448154	0.25525292
EBNA3A	18	0.04613219	0.31178707
BPLF1	14	0.01936243	0.32283465
BBLF2	11	0.01313598	0.26863227
BILF1	10	0.05508914	0.28949691

As proteínas BTRF1 e BSRF1 por apresentarem os maiores valores para centralidade de intermediação e centralidade de proximidade, são consideradas como as mais centrais da rede e que exercem um maior controle sobre a rede, porque mais rapidamente as informações são passadas por esses nós (proteínas).

Nossos resultados corroboram com o fato de que as redes preditas não possuem uma distribuição aleatória, existindo uma influência biológica em sua predição. Assim, com as redes validadas, selecionamos as 10 primeiras proteínas com maior número de interações para serem consideradas as proteínas essenciais da rede.

Com base no apoio a literatura e no site do Uniprot, resumimos funcionalmente cada uma delas. Além disso, sugerimos que essas proteínas sejam os melhores alvos dos miRNA preditos e que, portanto, o seu pareamento com o miRNA consequentemente provoque a sua degradação ou inibição. O que implica na modificação de vários processos biológicos com base na função dessas proteínas, como descrito abaixo:

BTRF1

Proteína do tegumento não caracterizada (UNIPROT, 2017).

BSRF1

BSRF1 não possui função conhecida em EBV, embora apresente similaridade com o gene UL51 do vírus HSV-1 que possui função na maturação e saída das partículas virais de HSV-1 (NOZAWA *et al.*, 2005).

EBNA-1

EBNA-1 é uma das primeiras proteínas expressas após infecção, desempenhando importantes papéis durante a fase da latência e também tem sido demonstrado que afeta a infecção lítica de EBV. Entre suas funções, acredita-se que tenha um papel importante na replicação e manutenção do episoma (DO *et al.*, 2008). Na supressão de EBNA-1, o episoma pode ser degradado após infecção na maioria das células B (LEVITSKAYA *et al.*, 1995). Além disso, na manutenção do episoma atua como mediador na união desta com a cromatina celular durante a distribuição do DNA viral para as células filhas na divisão celular (DO *et al.*, 2008). Também ativa a transcrição de vários genes de latência viral e é a única proteína expressa em todas as células infectadas durante a latência e em todos os tumores associados a vírus. Sugere-se que EBNA-1 possa atuar sobre a oncogênese através de genes celulares. Assim, pode neutralizar a estabilização de p53 através de USP7, diminuindo assim a apoptose e aumentando a sobrevivência das células hospedeiras (KANG; KIEFF, 2015).

TK

Timidina quinase é uma enzima que participa da síntese do DNA viral. Estando presente em grande quantidade quando há proliferação celular (câncer) (GUSTAFSON *et al.*, 1998).

EBNA-2

EBNA-2 juntamente com EBNA-LP são as duas primeiras proteínas expressas em infecções latentes de células B, sendo, EBNA-2 essencial para a imortalização, proliferação e diferenciação das células B (BOCCELLATO *et al.*, 2007), atuando como ativador da transcrição de genes virais e celulares. Além disso, pode afetar as atividades dos reguladores do ciclo celular e retardar a progressão na fase G2/M (PAN *et al.*, 2009)

LMP-1

LMP-1 é uma proteína integrada na membrana plasmática, abundantes nas células B na fase latente. Atua desencadeando uma cascata de transdução de sinal que pode alterar o crescimento e a sobrevivência celular. Além disso, pode prevenir a apoptose das células B, impulsionando sua proliferação. Portanto, é uma proteína com capacidade oncogênica

que ativa fatores de transcrição e interage com moléculas celulares de sinalização, possivelmente, importantes na oncogênese (KANG; KIEFF, 2015).

EBNA-3A

EBNA-3A é uma proteína nuclear viral associada a latência, essencial para a imortalização de células B. Atua como um regulador da transcrição, reprimindo a transcrição de promotores virais TP1 e Cp (promotor de todos os mRNA de EBNA) através da interação com RBP-Jk, um regulador da via de sinalização de Notch, (HICKABOTTOM *et al.*, 2002). Além disso, associam-se a muitas proteínas celulares em diferentes redes de sinalização, fornecendo uma plataforma adequada para a sobrevivência ao longo da vida do vírus e de desenvolvimento de linfomas concorrente no hospedeiro infectado (BHATTACHARJEE *et al.*, 2016).

BPLF1

BPLF1 é uma proteína do tegumento expressa durante toda a fase tardia do ciclo lítico. Atua regulando a sinalização dos *Toll-like receptors* (TLR), importantes no reconhecimento de patógenos e na ativação da imunidade inata, através da atividade de enzimas deubiquitinantes (DUBs) que são as responsáveis pela inibição das vias de sinalização antivirais inatas. Assim, inibe a ativação de NF-κB e a produção de citocinas pró-inflamatórias. Portanto, BPLF1 é considerada uma proteína tardia que suprime o sistema imunológico durante a infecção primária (VAN GENT *et al.*, 2014). Além disso, impede a progressão da fase S do ciclo celular do hospedeiro. Assim, a inibição de BPLF1 impede a replicação do DNA celular e inibe a replicação do vírus, portanto, BPLF1 cria um ambiente favorável para a replicação do genoma viral (GASTALDELLO *et al.*, 2010).

BBLF2

BBLF2 é uma das sete proteínas necessárias para a replicação do DNA viral em EBV (AUBRY *et al.*, 2014).

BILF1

BILF1 é uma glicoproteína que parece contribuir para a evasão imune através da regulação negativa da expressão de moléculas do complexo de antígeno leucocitário humano (HLA) – complexo de genes que codifica as principais proteínas do complexo de

histocompatibilidade (MHC) na superfície celular. Além disso, BILF1 é expressado principalmente no início do ciclo lítico, embora possa também ser expresso em baixos níveis de latência. Por fim, atua como um receptor acoplado a proteína G constitutivamente ativo, participando da interação vírus-hospedeiro (HUTT-FLETCHER, 2015).

Curiosamente, as proteínas BTRF1 e BSRF1 não possuem função conhecida em EBV e são proteínas do tegumento. As proteínas do tegumento são importantes em vários aspectos do ciclo de vida viral, com papéis no início da infecção, na inserção do DNA no núcleo e na formação do envelope (GUO *et al.*, 2010). Logo, sugerimos que essas proteínas sejam importantes para a infecção viral e interessantes para que sejam evidenciadas experimentalmente. Embora desafiador, será de particular interesse investigar o papel potencial de BTRF1 e BSRF1 na infecção por EBV e, possivelmente, no desenvolvimento de agentes terapêuticos com base na função dos miRNAs virais.

5. CONCLUSÃO

Os miRNAs são de grande interesse em estudos sobre infecções virais. No contexto do vírus Epstein-Barr (EBV), eles atuam como importantes reguladores da expressão de genes virais e celulares, facilitando a persistência viral e a oncogênese. Este estudo, avança nossa compreensão sobre os miRNAs durante a infecção por EBV, identificando 55 miRNAs virais e 46 mRNAs e considerando 10 proteínas essenciais na rede de interação de proteínas. Nossos resultados sugerem a investigação funcional da interação entre os miRNAs preditos e os mRNAs alvos para compreender os mecanismos de autoregulação dos genes virais em EBV. Além disso, as proteínas BTRF1 e BSFR1 exercem um maior controle na rede de proteínas, embora sejam proteínas do tegumento com funções desconhecidas. Assim, sugerimos as proteínas BTRF1 e BSFR1 como alvos potenciais dos miRNAs para melhor compreensão e controle da infecção, possivelmente, criando estratégias terapêuticas eficientes para prevenir e/ou curar a infecção por EBV.

6. REFERÊNCIAS

ABEND, J. R. *et al.* Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus MicroRNAs Target IRAK1 and MYD88, Two Components of the Toll-Like Receptor/Interleukin- 1R Signaling Cascade, To Reduce Inflammatory-Cytokine Expression. **Journal of Virology**, v. 86, n. 21, p.11663-11674, 2012.

AITTOKALLIO, T.; SCHWIKOWSKI, B. Graph-based methods for analysing networks in cell biology. **Briefings In Bioinformatics**, v. 7, n. 3, p.243-255, 2006.

ARVIN, A. *et al.* Human Herpesviruses Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis: Comparative analysis of herpesvirus-common proteins. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1408 p, 2007.

AUBRY, V. *et al.* Epstein-Barr Virus Late Gene Transcription Depends on the Assembly of a Virus-Specific Preinitiation Complex. **Journal of Virology**, v. 88, n. 21, p.12825-12838, 2014.

BALTIMORE, D. Expression of Animal Virus Genomes. **Bacteriological Reviews**, v. 35, n. 3, p.235-241, 1971.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, p.281-297, 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p.215-233, 2009.

BARTH, S. *et al.* Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p.666-675, 2007.

BARABASI, A. L.; ALBERT, R. Emergence of Scaling in Random Networks. **Science**, v. 286, p.509-512, 1999.

BELLARE, P; GANEM, D. Regulation of KSHV Lytic Switch Protein Expression by a Virus-Encoded MicroRNA: An Evolutionary Adaptation that Fine-Tunes Lytic Reactivation. **Cell Host & Microbe**, p.570-575, 2009.

BENSON, D. A. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p.36-42, 2013.

BHATTACHARJEE, S. *et al.* Role of EBNA-3FamilyProteinsinEBVAssociatedB-cellLymphomagenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p.1-16, 2016.

BOSS, I. W.; PLAISANCE, K. B.; RENNE, R. Role of virally-encoded microRNAs in herpesvirus biology. **Trends Microbiol.** v. 12, n. 17, p.544-553, 2009.

BOCCELLATO, F. *et al.* EBNA2 Interferes with the Germinal Center Phenotype by Downregulating BCL6 and TCL1 in Non-Hodgkin's Lymphoma Cells. **Journal of Virology**, v. 81, n. 5, p.2274-2282, 2007.

BROWN, J. C.; NEWCOMB, W. W. Herpesvirus Capsid Assembly: Insights from Structural Analysis. **Curr Opin Virol**, p.142-149, 2011.

BRUSCELLA, P. *et al.* Viruses and miRNAs: More Friends than Foes. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p.1-11, 2017.

BUISSON, M. *et al.* Changes in the dominant Epstein-Barr virus type during human immunodeficiency virus infection. **Journal of General Virology**, n. 75, p.431-437, 1994.

CALDERONE, A.; LICATA, L.; CESARENI, G. VirusMentha: a new resource for virus-host protein interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 1, p.588-592, 2014.

CANN, A. J. **Principles of Molecular Virology**. 4. ed. University Of Leicester, Uk: Elsevier Academic Press, p.332, 2005.

CHOY, E. Y. *et al.* An Epstein-Barr virus – encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 205, n. 11, p. 2551-2560, 2008.

CLAVERIE, J. M; ABERGEL, C. Mimivirus and its Virophage. **Annual Review of Genetics**, v. 43, n. 1, p.49-66, 2009.

COHEN, J. I. M. D. Epstein-Barr virus infection. **Medical Progress**, v. 343, n. 7, p.481-492, 2000.

CRICK, F. *et al.* Central Dogma of Molecular Biology. **Nature**, v. 227, n. 1, p.561-563, 1970.

DAVISON, A. J. *et al.* Comparative Genomics of Carp Herpesviruses. **Journal of Virology**, v. 87, n. 5, p.2908-2922, 2013.

DIMMOCK, N. J.; EASTON, A. J.; LEPPARD, K. N. **Introduction to modern virology**. p. 531, 2007.

DO, N. V. *et al.* A major EBNA1 variant from Asian EBV isolates shows enhanced transcriptional activity compared to prototype B95.8. **Virus Research**, v. 132, p.15-24, 2008.

DOLAN, A. *et al.* The genome of Epstein–Barr virus type 2 strain AG87. **Virology**, n. 350, p.164-170, 2006.

DRURY, R. E.; O’CONNOR, D.; POLLARD, A. J. The Clinical Application of MicroRNAs in Infectious Disease. **Frontiers In Immunology**, v. 8, p.1-17, 2017.

ENK, J. *et al.* HSV1 MicroRNA Modulation of GPI Anchoring and Downstream Immune Evasion. **Cell**, p.949-956, 2016.

FILIPOWICZ, W; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight. **Nature**, v. 9, p.102-114, 2008.

FLINT, J. *et al.* **Principles of virology**. 4. ed. Washington, Dc: Asm Press, p.1060, 2015.

FORTERRE, P. The virocell concept and environmental microbiology. **The Isme Journal**, v. 7, n. 2, p.233-236, 2012.

FOSSUM, E. *et al.* Evolutionarily Conserved Herpesviral Protein Interaction Networks. **Plos Pathogens**, v. 5, n. 9, p.1-13, 2009.

FRUCI, D.; ROTA, R.; GALLO, A. The Role of HCMV and HIV-1 MicroRNAs: Processing, and Mechanisms of Action during Viral Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p.1-7, 2017.

FRANCO, A. C., ROEHE, P. M. HERPESVIRIDAE. In: FLORES, Eduardo Furtado (Org). **Virologia veterinária**. Santa Maria: Ed da UFSM, Cap.17. p. 435-485, 2007.

GASTALDELLO, S. *et al.* A deneddylase encoded by Epstein–Barr virus promotes viral DNA replication by regulating the activity of cullin-RING ligases. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 4, p.351-374, 2010.

GHOSH, Z.; MALLICK, B.; CHAKRABARTI, J. Cellular versus viral microRNAs in host-virus interaction. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 4, p.1035-1048, 2009.

GOTTWEIN, E; CULLEN, B. R. A Human Herpesvirus MicroRNA Inhibits p21 Expression and Attenuates p21-Mediated Cell Cycle Arrest. **Journal of Virology**, p.5229-5237, 2010.

GREY, F. Role of microRNAs in herpesvirus latency and persistence. **Journal of General Virology**, p.739-751, 2015.

GREY, F. *et al.* A Human Cytomegalovirus-Encoded microRNA Regulates Expression of Multiple Viral Genes Involved in Replication. **Plos Pathogens**, p.1593-1602, 2007.

GREBER, U. F.; BARTENSCHLAGER, R. An expanded view of viruses. **Fems Microbiology Reviews**, v. 41, n. 1, p.1-4, 2017.

GRINDE, B. Herpesviruses: latency and reactivation viral strategies and host response. **Journal of Oral Microbiology**, p.1-9, 2013.

GRUNDHOFF, A; SULLIVAN, C. S. Virus-encoded microRNAs. **Virology**, v. 411, n. 2, p.325-343, 2011.

GRUNDHOFF, A.; SULLIVAN, C. S.; GANEM, D. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. **Rna**, v. 12, n. 5, p.733-750, 2006.

GUO, H. *et al.* Role of tegument proteins in herpesvirus assembly and egress. **Protein & Cell**, p.987-998, 2010.

GUO, Y. E.; STEITZ, J. A. Virus Meets Host MicroRNA: the Destroyer, the Booster, the Hijacker. **Molecular And Cellular Biology**, v. 34, n. 20, p.3780-3787, 2014.

GUSTAFSON, E. A. *et al.* The Epstein-Barr Virus Thymidine Kinase Does Not Phosphorylate Ganciclovir or Acyclovir and Demonstrates a Narrow Substrate

Specificity Compared to the Herpes Simplex Virus Type 1 Thymidine Kinase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 11, p.2923-2931, 1998.

HANCOCK, M. H. *et al.* Human Cytomegalovirus MicroRNAs miR-US5-1 and miR-UL112-3p Block Proinflammatory Cytokine Production in Response to NF- κ B-Activating Factors through Direct Downregulation of IKK and IKK. **Mbio**, v. 8, p.1-19, 2017.

HICKABOTTOM, M. *et al.* Two Nonconsensus Sites in the Epstein-Barr Virus Oncoprotein EBNA3A Cooperate to Bind the Co-repressor Carboxyl-terminalbinding Protein (CtBP). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 49, p.47197-47204, 2002.

HOULDCROFT, C. J.; KELLAM, P. Host genetics of Epstein-Barr virus infection, latency and disease. **Reviews in Medical Virology**, v. 25, n. 2, p.71-84, 2015.

HUTT-FLETCHER, L. M. EBV glycoproteins: where are we now? **Future Virol**, v. 10, n. 10, p.1155-1162, 2015.

HUANG, Y. *et al.* The expression of interleukin-32 is activated by human cytomegalovirus infection and down regulated by hcmv-miR-UL112-1. **Virology Journal**, p.1-8, 2013.

HUANG, E.; JOHNSON, R. A. Human cytomegalovirus – no longer just a DNA virus. **Nature medicine**, v. 6, n. 8, p.863-864, 2000.

ICTV. **Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus**. Disponível em <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy_releases>. Acesso em 24 mar. 2017.

JOHNSON, D. C.; BAINES, J. D. Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. **Nature**, v. 9, p.382-394, 2011.

JUNG, Y. *et al.* MicroRNA miRBART20-5p stabilizes Epstein-Barr virus latency by directly targeting BZLF1 and BRLF1. **Journal of Virology**, p.9027-9037, 2014.

KANG, M.; KIEFF, E. Epstein–Barr virus latent genes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 47, p.1-16, 2015.

KAWASHIMA, D. *et al.* Nuclear Transport of Epstein-Barr Virus DNA Polymerase Is Dependent on the BMRF1 Polymerase Processivity Factor and Molecular Chaperone Hsp90. **Journal Of Virology**, v. 87, n. 11, p.6482-6491, 2013.

KHALIL, J. Y. B.; ANDREANI, J.; LA SCOLA, B. Updating strategies for isolating and discovering giant viruses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, n. 1, p.80-87, 2016.

KHADKA, S. *et al.* A Physical interaction network of dengue vírus and human proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**. 2011.

KINCAID, R. P.; SULLIVAN, C. S. Virus-Encoded microRNAs: An Overview and a Look to the future. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 12, p.18-29, 2012.

KIM, H.; CHOI, H.; LEE, S. K. Epstein–Barr virus miR-BART20-5p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting BAD. **Cancer Letters**, p.733-742, 2015.

KIEFF, E. D.; RICKINSON, A. B. Epstein Barr virus and Its replication. In: **Fields Virology**. 5th. KNIPE, D.M. *et al.*, (eds). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 2601-2610, 2007.

KIM, N.; LEE, S. K. Biogenesis of Epstein–Barr virus microRNAs. **Mol Cell Biochem**, v. 365, p.203-210, 2012.

KRISTENSEN, D. M. *et al.* New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 1, p.11-19, 2010.

LAPA, Rainer Marco Lopez. **ANÁLISE INTEGRADA ENTRE DADOS DE EXPRESSÃO GLOBAL DE TRANSCRITOS CODIFICADORES E DE miRNAs EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LARINGE**. 2014. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu - São Paulo, 2014.

LARI, K.; YOUNG, S. J. The estimation os stochastic contex-free grammars using the insid-outside algorithm. **Computer Speech and Language**, v. 4, p.35-56, 1990.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p.843-854, 1993.

LEI, T. *et al.* Targeting of DICE1 tumor suppressor by Epstein–Barr virus-encoded miR-BART3 microRNA in nasopharyngeal carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 133, p.79-88, 2013.

LEVITSKAYA, J *et al.* Inhibition of ubiquitin/proteasomedependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. **Proc Natl Acad Sci USA**, p.16–21, 1995.

LISNIC, V. J.; KRMPOTIC, A.; JONJIC, S. Modulation of natural killer cell activity by viruses. **Curr Opin Microbiol**, v. 4, n. 13, p.530-539, 2010.

LODISH, H. *et al.* **Molecular Cell Biology**. 4. ed., 2000.

LUNG, R. *et al.* Modulation of LMP2A Expression by a Newly Identified Epstein-Barr Virus–Encoded MicroRNA miR-BART22. **Neoplasia**, v. 11, n. 11, p.1174-1184, 2009.

LWOFF, A. The Concept of Virus The. **Journal of General Microbiology**, In Stit Ut Pasteur, Paris, v. 17, n. 1, p.239-253, 1957.

MACKETT, M. *et al.* Characterization and Expression of a Glycoprotein Encoded by the Epstein-Barr Virus BamHI I Fragment. **Journal of Virology**, v. 64, n. 6, p.2545-2552, 1990.

MADIGAN, M. T. *et al.* **MICROBIOLOGIA DE BROCK**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1160, 2010.

MATTICK, J. S. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. **Embo Reports**, v. 2, n. 11, p.986-991, 2001.

MCCASKLLL, J. S. The Equilibrium Partition Function and Base Pair Binding Probabilities for RNA Secondary Structure. **Biopolymers**, v. 29, p.1105-1119, 1990.

MINITAB. Disponível em: <http://support.minitab.com/pt-br/minitab/17/topic-library/modeling-statistics/regression-and-correlation/goodness-of-fit-statistics/r-squared/>. Acesso em: 04 setembro de 2017.

MOKILI, J. L; ROHWER, F.; DUTILH, B. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p.63-77, 2012.

MORISSETTE, G.; FLAMAND, L. Herpesviruses and Chromosomal Integration. **Journal of Virology**, v. 84, n. 23, p.12100-12109, 2010.

MIRBASE. **Banco de dados de sequencias de miRNAs**. Disponível em: <http://www.mirbase.org/>. Acesso em: 24 mar. 2017.

NACHMANI, D. *et al.* Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. **Cell Host & Microbe**, p.376-385, 2009.

NAWROCKI, E. P. *et al.* Rfam 12.0: updates to the RNA families database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p.130-137, 2014.

NOZAWA, N. Herpes Simplex Virus Type 1 UL51 Protein Is Involved in Maturation and Egress of Virus Particles. **Journal of Virology**, v. 79, n. 11, p.6947-6956, 2005.

ONDOV, B. D; BERGMAN, N. H; PHILLIPPY, A. M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. **Bmc Bioinformatics**, v. 385, n. 12, p.1-9, 2011.

OSPINA-BEDOYA, M. *et al.* Computational Identification of Dengue Virus MicroRNA-Like Structures and their Cellular Targets. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 8, p.169-176, 2014.

PAN, S. *et al.* Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 disrupts mitotic checkpoint and causes chromosomal instability. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p.336-375, 2009.

PALUDAN, S. R. *et al.* Recognition of herpesviruses by the innate immune system. **Nat Rev Immunol**, p.143-154, 2011.

PARKIN, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **Int. J. Cancer**, n. 118, p.3030-3044, 2006.

PETERSON, S. M. *et al.* Common features of microRNA target prediction tools. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p.1-10, 2014.

PFEFFER, S. *et al.* Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. **Science**, v. 304, p.734-736, 2004.

PIEADADE, D.; AZEVEDO-PEREIRA, J. The Role of microRNAs in the Pathogenesis of Herpesvirus Infection. **Viruses**, Lisboa, v. 8, n. 6, p.156-188, 2016.

PRATT, A. J.; MACRAE, I. J. The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 27, p.17897-17901, 2009.

PRESCOTT; HARLEY; KLEIN'S. **Microbiology**, 7. ed. 2008.

QIU, J.; THORLEY-LAWSON, D. A. EBV microRNA BART 18-5p targets MAP3K2 to facilitate persistence in vivo by inhibiting viral replication in B cells. **Pnas**, v. 111, n. 30, p.11157-11162, 2014.

RÁCZ, M. L.; MENCK, C. F. M. PROPRIEDADES GERAIS DOS VIRUS. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **MICROBIOLOGIA**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. Cap. 73. p. 509-514, 2005.

RÁCZ, M. L. REPLICAÇÃO VIRAL. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **MICROBIOLOGIA**. 4. ed. São Paulo: Atheneu. Cap. 74. p. 515-525, 2005.

RICKINSON, A. B.; KIEFF, E. D. Epstein Barr vírus. In: **Fields Virology**. 5th. KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRUS, S. S. (eds). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, p. 2656-2660, 2007.

ROIZMAN, B.; WHITLEY, R. J. The Nine Ages of Herpes Simplex Virus. **Herpes**, p.23-27. 2001.

ROIZMAN, B.; GU, H.; MANDEL, G. The First 30 Minutes in the Life of a Virus: unREST in the Nucleus. **Cell Cycle**, p.1019-1021, 2005.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **FUNDAMENTOS DE GENÉTICA**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.903, 2012.

SKALSKY, R. L.; CULLEN, B. R. Viruses, microRNAs, and Host Interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, n. 1, p.123-141, 2010.

SKALSKY, R. L. *et al.* Evolutionary Conservation of Primate Lymphocryptovirus MicroRNA Targets. **Journal of Virology**, v. 88, n. 3, p.1617-1635, 2014.

STEITZ, J. *et al.* Noncoding RNPs of Viral Origin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 3, p.1-15, 2010.

STERN-GINOSSAR, N. *et al.* Host Immune System Gene Targeting by a Viral miRNA. **Science**, v. 317, n. 5836, p.376-381, 2007.

SONG, L. *et al.* Cellular MicroRNAs Inhibit Replication of the H1N1 Influenza A Virus in Infected Cells. **Journal of Virology**, v. 84, n. 17, p.8849-8860, 2010.

THOMPSON, M. P.; KURZROCK, R. Epstein-Barr Virus and Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p.803-821, 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **MICROBIOLOGIA**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 967, 2012.

TYCOWSKI, K. T. *et al.* Viral noncoding RNAs: more surprises. **Genes & Development**, v. 29, n. 6, p.567-584, 2015.

UMBACH, J. L. *et al.* MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. **Nature**, p.780-783, 2008.

UMBACH, J. L.; CULLEN, B. R. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. **Genes & Development**, v. 23, n. 10, p.1151-1164, 2009.

UNIPROT. Disponível em: <http://www.uniprot.org/uniprot/>. Acesso em: 04 de setembro de 2017.

WARRIS, S. *et al.* Fast selection of miRNA candidates based on large-scale pre-computed MFE sets of randomized sequences. **Bmc Research Notes**, v. 34, n. 7, p.1-10, 2014.

WATANABE, T. *et al.* The Epstein–Barr virus BRRF2 gene product is involved in viral progeny production. **Virology**, v. 484, p.33-40, 2015.

WODARZ, D. Evolutionary dynamics of giant viruses and their virophages. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 7, p.2103-2115, 2013.

WHITE, D. O.; FENNER, F. J. **Medical virology**. 4. ed. México: Academic Press, p. 308, 1994.

VAN GENT, M. *et al.* Epstein-Barr Virus Large Tegument Protein BPLF1 Contributes to Innate Immune Evasion through Interference with Toll-Like Receptor Signaling. **Plos Pathogens**, v. 10, n. 2, p.1-17, 2014.

VIRAL ZONE. **The Baltimore classification clusters viruses into families depending on their type of genome.** Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/254.html>. Acesso em: 24 mar. 2017.

XIE, M; STEITZ, J. A. Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. **Rna Biology**, v. 6, n. 11, p.673-681, 2014.

XUE, X. *et al.* Identification and Characterization of Novel MicroRNAs from *Schistosoma japonicum*. **Plos One**, v. 3, n. 12, p.1-9, 2008.

ZHANG, B. *et al.* Conservation and divergence of microRNA plant genes. **Plant J.** v. 46, p. 243-259, 2006.



Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Ciências Exatas e da Natureza | Universidade Federal da Paraíba
Cidade Universitária - João Pessoa - PB - Brasil - CEP 58059-900
Telefone: (83) 3216 7407 - Fax: (83) 3216 7787 - e-mail: pgbcm@dbm.ufpb.br



ANEXOS

ANEXO A - Candidatos a mRNA alvo

ID NCBI DA PROTEÍNA	NOME DA PROTEÍNA	IntaRNA miRNA	ENERGIA	FUNÇÃO
YP_001129515.1	LMP-1	DQ279927.1_54-31-89	-195,1	Previne apoptose e impulsiona a proliferação
YP_001129515.1	LMP-1	DQ279927.1_55-31-89	-178,4	Previne apoptose e impulsiona a proliferação
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_15-2-102	-152,1	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_16-3-102	-152,1	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129509.1	BALF3	DQ279927.1_40-6-94	-151,7	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_25-1-88	-149,6	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_27-1-88	-149,6	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_26-2-87	-145,2	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129457.1	helicase-primase primase subunit BSLF1	DQ279927.1_39-5-93	-142,1	Replicação do DNA viral
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_30-1-80	-137,5	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_28-2-78	-134,1	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_29-2-78	-134,1	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129504.1	hypothetical protein	DQ279927.1_13-4-80	-128,7	Evasão imune
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_51-10-95	-114,6	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_50-10-95	-86,74	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129505.1	LF1	DQ279927.1_5-1-61	-81,52	Proteína não caracterizada
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_52-24-111	-73,95	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_49-10-95	-69,12	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_42-14-61	-51,45	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_51-10-95	-49,16	Proteína do tegumento
YP_001129451.1	Capsid triplex subunit 1	DQ279927.1_51-10-95	-46,74	Proteína do capsídeo
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_22-2-75	-46,67	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_23-2-75	-46,67	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129470.1	BRRF2	DQ279927.1_51-10-95	-45,31	Proteína do tegumento
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_2-1-69	-45,16	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129441.1	EBNA-2	DQ279927.1_51-10-95	-45	Interação vírus-hospedeiro, evasão imune, modulação do ciclo celular e transcrição
YP_001129449.1	BPLF1	DQ279927.1_51-10-95	-44,9	Proteína do tegumento com função na interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129478.1	helicase-primase subunit BBLF2/3	DQ279927.1_51-10-95	-44,34	Replicação do DNA viral
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_50-10-95	-43,88	Proteína do tegumento
YP_001129459.1	DUTPase	DQ279927.1_25-1-88	-43,83	Metabolismo dos nucleotídeos
YP_001129459.1	DUTPase	DQ279927.1_27-1-88	-43,83	Metabolismo dos nucleotídeos
YP_001129509.1	BALF3	DQ279927.1_51-10-95	-42,93	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_51-10-95	-41,99	Processo viral
YP_001129452.1	BORF2	DQ279927.1_51-10-95	-41,69	Replicação do DNA e liberação da latência viral
YP_001129515.1	LMP-1	DQ279927.1_53-31-89	-40,68	Previne apoptose e impulsiona a proliferação.
YP_001129459.1	DUTPase	DQ279927.1_51-10-95	-40	Metabolismo dos nucleotídeos

ID NCBI DA PROTEÍNA	NOME DA PROTEÍNA	IntaRNA miRNA	ENERGIA	FUNÇÃO
YP_001129441.1	EBNA-2	DQ279927.1_50-10-95	-38,54	Interação vírus-hospedeiro, evasão imune, modulação do ciclo celular e transcrição
YP_001129459.1	DUTPase	DQ279927.1_30-1-80	-38,1	Metabolismo dos nucleotídeos
YP_001129449.1	BPLF1	DQ279927.1_30-1-80	-38,08	Proteína do tegumento com função na interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129449.1	BPLF1	DQ279927.1_25-1-88	-38	Proteína do tegumento com função na interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129449.1	BPLF1	DQ279927.1_27-1-88	-38	Proteína do tegumento com função na interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129465.1	EBNA-3C	DQ279927.1_25-1-88	-37,74	Transcrição, modulação da progressão do ciclo celular hospedeiro desregulando a transição G1 / S e interação vírus-hospedeiro
YP_001129465.1	EBNA-3C	DQ279927.1_27-1-88	-37,74	Transcrição, modulação da progressão do ciclo celular hospedeiro desregulando a transição G1 / S e interação vírus-hospedeiro
YP_001129464.1	EBNA-3B	DQ279927.1_30-1-80	-37,47	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e regulação da transcrição
YP_001129507.1	BALF5	DQ279927.1_22-2-75	-37,33	Replicação do DNA e replicação do DNA viral
YP_001129507.1	BALF5	DQ279927.1_23-2-75	-37,33	Replicação do DNA e replicação do DNA viral
YP_001129462.1	BLLF1	DQ279927.1_25-1-88	-37,14	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129462.1	BLLF1	DQ279927.1_27-1-88	-37,14	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_36-4-93	-36,92	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129462.1	BLLF1	DQ279927.1_30-1-80	-36,67	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129475.1	helicase-primase subunit BBLF4	DQ279927.1_50-10-95	-36,5	Replicação do DNA
YP_001129441.1	EBNA-2	DQ279927.1_25-1-88	-36,48	Interação hospedeiro-vírus, evasão imune, transcrição e modulação do ciclo celular
YP_001129441.1	EBNA-2	DQ279927.1_27-1-88	-36,48	Interação hospedeiro-vírus, evasão imune, transcrição e modulação do ciclo celular
YP_001129475.1	helicase-primase subunit BBLF4	DQ279927.1_51-10-95	-36,48	Replicação do DNA viral
YP_001129501.1	BVRF2	DQ279927.1_25-1-88	-36,39	Montagem da cápside e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129501.1	BVRF2	DQ279927.1_27-1-88	-36,39	Montagem da cápside e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129502.1	BdRF1	DQ279927.1_25-1-88	-36,39	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula
YP_001129502.1	BdRF1	DQ279927.1_27-1-88	-36,39	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula
YP_001129438.1	FGAM-synthase	DQ279927.1_51-10-95	-36,34	Proteína do tegumento envolvida na interação vírus-hospedeiro
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_3-1-69	-36,04	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129441.1	EBNA-2	DQ279927.1_30-1-80	-35,89	Interação hospedeiro-vírus, evasão imune, transcrição e modulação do ciclo celular
YP_001129476.1	BBRF1	DQ279927.1_51-10-95	-35,89	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129490.1	BDLF3	DQ279927.1_25-1-88	-35,85	Componente integral da membrana

ID NCBI DA PROTEÍNA	NOME DA PROTEÍNA	IntaRNA miRNA	ENERGIA	FUNÇÃO
YP_001129490.1	BDLF3	DQ279927.1_27-1-88	-35,85	Componente integral da membrana
YP_001129441.1	EBNA-2	DQ279927.1_49-10-95	-35,56	Interação hospedeiro-vírus, evasão imune, transcrição e modulação do ciclo celular
YP_001129507.1	BALF5	DQ279927.1_51-10-95	-35,52	Replicação do DNA e replicação do DNA viral
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_17-2-80	-35,31	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_18-2-80	-35,31	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_50-10-95	-35,26	Processo viral
YP_001129509.1	BALF3	DQ279927.1_49-10-95	-35,23	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_31-1-85	-35,11	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_32-1-85	-35,11	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129464.1	EBNA-3B	DQ279927.1_25-1-88	-35,05	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e regulação da transcrição
YP_001129464.1	EBNA-3B	DQ279927.1_27-1-88	-35,05	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e regulação da transcrição
YP_001129515.1	LMP-1	DQ279927.1_30-1-80	-34,94	Previne apoptose e impulsiona a proliferação.
YP_001129444.1	BFLF1	DQ279927.1_30-1-80	-34,9	Embalagem do DNA viral
YP_001129449.1	BPLF1	DQ279927.1_52-24-111	-34,68	Proteína do tegumento com função na interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_52-24-111	-34,68	Proteína do tegumento
YP_001129438.1	FGAM-synthase	DQ279927.1_52-24-111	-34,67	Proteína do tegumento envolvida na interação vírus-hospedeiro
YP_001129462.1	BLLF1	DQ279927.1_54-31-89	-34,48	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_35-1-95	-34,42	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129468.1	BRLF1	DQ279927.1_30-1-80	-34,36	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e reativação viral a partir da latência
YP_001129490.1	BDLF3	DQ279927.1_30-1-80	-34,26	Componente integral da membrana
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_40-6-94	-34,21	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129465.1	EBNA-3C	DQ279927.1_30-1-80	-34,1	Transcrição, modulação da progressão do ciclo celular hospedeiro desregulando a transição G1 / S e interação vírus-hospedeiro
YP_001129465.1	EBNA-3C	DQ279927.1_51-10-95	-33,86	Transcrição, modulação da progressão do ciclo celular hospedeiro desregulando a transição G1 / S e interação vírus-hospedeiro
YP_001129452.1	BORF2	DQ279927.1_50-10-95	-33,58	Replicação do DNA e liberação da latência viral
YP_001129510.1	single-stranded DNA binding protein	DQ279927.1_51-10-95	-33,55	Replicação do DNA viral
YP_001129487.1	BGLF1	DQ279927.1_51-10-95	-33,52	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129466.1	BZLF2	DQ279927.1_51-10-95	-33,47	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129470.1	BRRF2	DQ279927.1_52-24-111	-33,36	Proteína do tegumento

ID NCBI DA PROTEÍNA	NOME DA PROTEÍNA	IntaRNA miRNA	ENERGIA	FUNÇÃO
YP_001129463.1	EBNA-3A	DQ279927.1_50-10-95	-32,98	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e regulação da transcrição
YP_001129468.1	BRLF1	DQ279927.1_25-1-88	-32,94	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e reativação viral a partir da latência
YP_001129468.1	BRLF1	DQ279927.1_27-1-88	-32,94	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e reativação viral a partir da latência
YP_001129444.1	BFLF1	DQ279927.1_25-1-88	-32,9	Embalagem do DNA genômico
YP_001129444.1	BFLF1	DQ279927.1_27-1-88	-32,9	Embalagem do DNA genômico
YP_001129515.1	LMP-1	DQ279927.1_25-1-88	-32,39	Previne apoptose e impulsiona a proliferação.
YP_001129515.1	LMP-1	DQ279927.1_27-1-88	-32,39	Previne apoptose e impulsiona a proliferação.
YP_001129451.1	Capsid triplex subunit 1	DQ279927.1_49-10-95	-32,35	Proteína do capsídeo
YP_001129451.1	Capsid triplex subunit 1	DQ279927.1_50-10-95	-32,22	Proteína do capsídeo
YP_001129463.1	EBNA-3A	DQ279927.1_30-1-80	-32,21	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129493.1	BcLF1	DQ279927.1_51-10-95	-32,01	Automontagem da cápside viral
YP_001129507.1	BALF5	DQ279927.1_2-1-69	-31,99	Replicação do DNA e replicação do DNA viral
YP_001129475.1	helicase-primase subunit BBLF4	DQ279927.1_30-1-80	-31,72	Replicação do DNA
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_22-2-75	-31,09	Processo viral
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_23-2-75	-31,09	Processo viral
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_49-10-95	-30,95	Proteína do tegumento
YP_001129505.1	LF1	DQ279927.1_51-10-95	-30,86	Proteína não caracterizada
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_1-1-69	-30,7	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129508.1	glycoprotein BALF4	DQ279927.1_25-1-88	-30,57	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129508.1	glycoprotein BALF4	DQ279927.1_27-1-88	-30,57	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129501.1	BVRF2	DQ279927.1_30-1-80	-30,53	Montagem da cápside e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129502.1	BdRF1	DQ279927.1_30-1-80	-30,53	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula
YP_001129464.1	EBNA-3B	DQ279927.1_51-10-95	-30,27	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e regulação da transcrição
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_25-1-88	-30,24	Proteína do tegumento
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_27-1-88	-30,24	Proteína do tegumento
YP_001129459.1	DUTPase	DQ279927.1_50-10-95	-30,23	Metabolismo dos nucleotídeos
YP_001129459.1	DUTPase	DQ279927.1_49-10-95	-30,21	Metabolismo dos nucleotídeos
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_44-10-95	-30,17	Processo viral
YP_001129507.1	BALF5	DQ279927.1_25-1-88	-30,16	Replicação do DNA e replicação do DNA viral
YP_001129507.1	BALF5	DQ279927.1_27-1-88	-30,16	Replicação do DNA e replicação do DNA viral

ID NCBI DA PROTEÍNA	NOME DA PROTEÍNA	IntaRNA miRNA	ENERGIA	FUNÇÃO
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_45-10-95	-30,14	Processo viral
YP_001129475.1	helicase-primase subunit BBLF4	DQ279927.1_25-1-88	-30,12	Replicação do DNA
YP_001129475.1	helicase-primase subunit BBLF4	DQ279927.1_27-1-88	-30,12	Replicação do DNA
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_2-1-69	-30,07	Processo viral
YP_001129463.1	EBNA-3A	DQ279927.1_25-1-88	-30,07	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129463.1	EBNA-3A	DQ279927.1_27-1-88	-30,07	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129497.1	thymidine kinase	DQ279927.1_25-1-88	-29,86	Síntese do DNA viral
YP_001129497.1	thymidine kinase	DQ279927.1_27-1-88	-29,86	Síntese do DNA viral
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_30-1-80	-29,7	Proteína do tegumento
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_37-1-96	-29,63	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129474.1	BKRF4	DQ279927.1_25-1-88	-29,49	Proteína do tegumento
YP_001129474.1	BKRF4	DQ279927.1_27-1-88	-29,49	Proteína do tegumento
YP_001129508.1	glycoprotein BALF4	DQ279927.1_30-1-80	-29,3	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129436.1	K15	DQ279927.1_25-1-88	-29,11	interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129436.1	K15	DQ279927.1_27-1-88	-29,11	interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129485.1	BGRF1/BDRF1	DQ279927.1_30-1-80	-29,09	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129449.1	BPLF1	DQ279927.1_54-31-89	-28,89	Proteína do tegumento com função na interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129436.1	K15	DQ279927.1_30-1-80	-28,72	interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129485.1	BGRF1/BDRF1	DQ279927.1_25-1-88	-28,62	Embalagem do DNA e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129485.1	BGRF1/BDRF1	DQ279927.1_27-1-88	-28,62	Embalagem do DNA e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129507.1	BALF5	DQ279927.1_50-10-95	-28,58	Replicação do DNA e replicação do DNA viral
YP_001129470.1	BRRF2	DQ279927.1_50-10-95	-28,53	Proteína do tegumento
YP_001129457.1	helicase-primase primase subunit BSLF1	DQ279927.1_25-1-88	-28,3	Replicação do DNA
YP_001129457.1	helicase-primase primase subunit BSLF1	DQ279927.1_27-1-88	-28,3	Replicação do DNA
YP_001129501.1	BVRF2	DQ279927.1_51-10-95	-28,29	Montagem da cápside e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129502.1	BdRF1	DQ279927.1_51-10-95	-28,29	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129487.1	BGLF1	DQ279927.1_50-10-95	-28,15	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_49-10-95	-28,11	Processo viral

ID NCBI DA PROTEÍNA	NOME DA PROTEÍNA	IntaRNA miRNA	ENERGIA	FUNÇÃO
YP_001129456.1	BSLF2/BMLF1	DQ279927.1_30-1-80	-28,11	Interação vírus-hospedeiro, evasão imune, transporte do mRNA e transcrição
YP_001129478.1	helicase-primase subunit BBLF2/3	DQ279927.1_50-10-95	-28,04	Replicação do DNA
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_51-10-95	-28,04	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129503.1	BILF2	DQ279927.1_50-10-95	-28,03	Proteína de membrana não caracterizada
YP_001129497.1	thymidine kinase	DQ279927.1_30-1-80	-27,95	Síntese do DNA
YP_001129468.1	BRLF1	DQ279927.1_51-10-95	-27,92	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e reativação viral a partir da latência
YP_001129493.1	BcLF1	DQ279927.1_25-1-88	-27,91	Automontagem da cápside viral
YP_001129493.1	BcLF1	DQ279927.1_27-1-88	-27,91	Automontagem da cápside viral
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_2-1-69	-27,88	Proteína do tegumento
YP_001129446.1	BFRF1	DQ279927.1_51-10-95	-27,85	Componente da membrana
YP_001129470.1	BRRF2	DQ279927.1_49-10-95	-27,85	Proteína do tegumento
YP_001129495.1	BTRF1	DQ279927.1_25-1-88	-27,82	Proteína não caracterizada
YP_001129495.1	BTRF1	DQ279927.1_27-1-88	-27,82	Proteína não caracterizada
YP_001129475.1	helicase-primase subunit BBLF4	DQ279927.1_2-1-69	-27,78	Replicação do DNA
YP_001129507.1	BALF5	DQ279927.1_30-1-80	-27,74	Replicação do DNA e replicação do DNA viral
YP_001129494.1	hypothetical protein	DQ279927.1_51-10-95	-27,7	Proteína não caracterizada
YP_001129510.1	single-stranded DNA binding protein	DQ279927.1_49-10-95	-27,66	Replicação do DNA
YP_001129471.1	EBNA-1	DQ279927.1_4-8-63	-27,64	Replicação e transcrição viral; evasão imune
YP_001129464.1	EBNA-3B	DQ279927.1_50-10-95	-27,56	Interação vírus-hospedeiro, transcrição e regulação da transcrição
YP_001129456.1	BSLF2/BMLF1	DQ279927.1_25-1-88	-27,51	Interação vírus-hospedeiro, evasão imune, transporte do mRNA e transcrição
YP_001129456.1	BSLF2/BMLF1	DQ279927.1_27-1-88	-27,51	Interação vírus-hospedeiro, evasão imune, transporte do mRNA e transcrição
YP_001129474.1	BKRF4	DQ279927.1_30-1-80	-27,51	Proteína do tegumento
YP_001129448.1	BFRF3	DQ279927.1_30-1-80	-27,47	Processo viral
YP_001129509.1	BALF3	DQ279927.1_50-10-95	-27,39	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129457.1	helicase-primase primase subunit BSLF1	DQ279927.1_30-1-80	-27,38	Replicação do DNA
YP_001129493.1	BcLF1	DQ279927.1_50-10-95	-27,38	Automontagem da cápside viral
YP_001129495.1	BTRF1	DQ279927.1_30-1-80	-27,29	Proteína não caracterizada
YP_001129510.1	single-stranded DNA binding protein	DQ279927.1_30-1-80	-27,29	Replicação do DNA
YP_001129476.1	BBRF1	DQ279927.1_30-1-80	-27,22	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira

ID NCBI DA PROTEÍNA	NOME DA PROTEÍNA	IntaRNA miRNA	ENERGIA	FUNÇÃO
YP_001129463.1	EBNA-3A	DQ279927.1_51-10-95	-27,15	Interação vírus-hospedeiro
YP_001129506.1	BILF1	DQ279927.1_28-2-78	-27,07	Componente da membrana
YP_001129506.1	BILF1	DQ279927.1_29-2-78	-27,07	Componente da membrana
YP_001129487.1	BGLF1	DQ279927.1_22-2-75	-27,04	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129487.1	BGLF1	DQ279927.1_23-2-75	-27,04	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129476.1	BBRF1	DQ279927.1_25-1-88	-27,01	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129476.1	BBRF1	DQ279927.1_27-1-88	-27,01	Embalagem do genoma viral e saída do vírus da célula hospedeira
YP_001129499.1	BVRF1	DQ279927.1_25-1-88	-27,01	Interação vírus-hospedeiro, embalagem do genoma viral, penetração viral no núcleo
YP_001129499.1	BVRF1	DQ279927.1_27-1-88	-27,01	Interação vírus-hospedeiro, embalagem do genoma viral, penetração viral no núcleo
YP_001129457.1	helicase-primase primase subunit BSLF1	DQ279927.1_49-10-95	-26,92	Replicação do DNA
YP_001129458.1	BSRF1	DQ279927.1_52-24-111	-26,87	Saída do vírus do espaço perinuclear
YP_001129465.1	EBNA-3C	DQ279927.1_50-10-95	-26,83	Transcrição, modulação da progressão do ciclo celular hospedeiro desregulando a transição G1 / S e interação vírus-hospedeiro
YP_001129510.1	single-stranded DNA binding protein	DQ279927.1_50-10-95	-26,73	Replicação do DNA
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_22-2-75	-26,68	Proteína do tegumento
YP_001129450.1	BOLF1	DQ279927.1_23-2-75	-26,68	Proteína do tegumento
YP_001129449.1	BPLF1	DQ279927.1_2-1-69	-26,62	Proteína do tegumento com função na interação vírus-hospedeiro e modulação no processo de ubiquitinação de proteínas
YP_001129475.1	helicase-primase subunit BBLF4	DQ279927.1_52-24-111	-26,61	Replicação do DNA
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_52-24-111	-26,58	Processo viral
YP_001129506.1	BILF1	DQ279927.1_25-1-88	-26,57	Componente da membrana
YP_001129506.1	BILF1	DQ279927.1_27-1-88	-26,57	Componente da membrana
YP_001129470.1	BRRF2	DQ279927.1_22-2-75	-26,53	Proteína do tegumento
YP_001129470.1	BRRF2	DQ279927.1_23-2-75	-26,53	Proteína do tegumento
YP_001129470.1	BRRF2	DQ279927.1_25-1-88	-26,47	Proteína do tegumento
YP_001129470.1	BRRF2	DQ279927.1_27-1-88	-26,47	Proteína do tegumento
YP_001129447.1	BFRF2	DQ279927.1_36-4-93	-26,41	Processo viral
YP_001129438.1	FGAM-synthase	DQ279927.1_10-1-64	-26,39	Proteína do tegumento envolvida na interação vírus-hospedeiro
YP_001129454.1	BMRF1	DQ279927.1_25-1-88	-26,31	Transcrição do DNA viral
YP_001129454.1	BMRF1	DQ279927.1_27-1-88	-26,31	Transcrição do DNA viral