Ketti Gleyzer de Oliveira

**Níveis de expressão de miR-33a e miR-122 em
pacientes cronicamente infectados pelo vírus
da Hepatite C genótipos 1 e 3**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para a obtenção de título de Mestre em
Ciências

Programa: Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Dr. João Renato Rebello Pinho

**São Paulo
2015**

Dedico este trabalho...

*Dedico este trabalho primeiramente à **Deus** que me livrou do desânimo. Ajudou-me a ser firme nos momentos difíceis. Deu-me forças interiores para não desistir dos meus sonhos. Iluminou meu medo, minhas dúvidas e minhas ansiedades. Que afastou de mim todo aquele que vieste a me desejar o mal. Que removeu de mim tudo o que não me fizeste bem. Fez-me perseverante na busca da minha felicidade diária. Que tem sido essencial em minha vida e autor de meu destino.*

*Ao meu esposo **Fernando** pelo grande homem que foi e é. Agradeço por ter sido a pessoa que mais sonhou junto comigo e que me fez acreditar a cada dia que, vale muito a pena sonhar e perseguir nossos sonhos. Agradeço por todo o amor, paciência e dedicação ao longo desses anos. Obrigada por estar ao meu lado não só nos momentos de alegria, mas também nos de angústia e de tristeza e por me dar força nos momentos mais difíceis, quando eu quase desisti. Agradeço, sobretudo, por acreditar veementemente no meu sucesso profissional, por confiar em mim e aceitar minhas constantes ausências sem nenhuma cobrança. Te Amo!*

*Às pessoas mais importantes da minha vida: aos meus amados filhos **Gabriel e Giovana**, não apenas pelo amor incondicional, mas pela compreensão e carinho nos momentos mais difíceis pelos quais passamos juntos. Tudo o que faço, fiz e farei é por vocês e para vocês. São a causa e o alvo de todo o meu amor, devoção e esforços por ser uma pessoa melhor e conquistar cada vez mais na vida, e todas as palavras que eu teria agora para definir o que sinto por vocês seriam insuficientes.*

Inicialmente, agradeço a **Deus** pelo dom da vida, pela família em que me permitiu nascer, pela proteção e certeza de que estás sempre comigo e pelas conquistas e vitórias que me julgou digna de alcançá-las. Sem Ele nenhum agradecimento faria sentido.

Aos **pacientes** que aceitaram participar espontaneamente deste estudo, que me estimularam a cada dia a conhecer melhor a hepatite C, a compreender sua história, conhecendo a de cada um, compartilhando de suas intimidades, angústias e esperanças. Agradeço por confiaram em minhas palavras mesmo com pouco tempo de contato. Por causa deles é que esta dissertação se concretizou. Vocês merecem meu eterno agradecimento.

Agradeço à inestimável **Dra. Fernanda de Mello Malta**, pelos ensinamentos, pelo empreendedorismo diante dos desafios, pela coerência, pela postura ética e profissional exemplar. Por ter confiado em mim, no meu potencial e partilhado comigo atribuições, novas responsabilidades, ideias e projetos. Por sua serenidade, paciência e extrema inteligência que foram capazes de aplacar a minha ansiedade e tantos receios que tive neste processo. Por me compreender e, mais do que isso, pela amizade praticamente materna e pela preocupação comigo em vários momentos de minha vida. Não poderia ter havido parceria mais perfeita. De fato, tenho a ela como a uma irmã, e ela sabe disso. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

Ao meu orientador, **Dr. João Renato Rebello Pinho**, pela confiança em mim depositada durante todos os momentos da realização desse trabalho. Pelo apoio, incentivo, ensinamentos, sugestões e principalmente pela paciência e compreensão dispensados. Seu exemplo de profissionalismo e humildade muito proporcionou para a minha formação profissional e humana. Muito obrigada!

Aos meus pais **Vilma e Antonio**, de quem herdei a perseverança e a coragem necessárias para nunca desistir de alcançar meus objetivos.

À que me adotou como mãe, há quatro anos, **Paola Lara Faria**, pela bonita amizade incondicional a qual começamos a cultivá-la no início de nosso mestrado. Nesse período plantamos uma semente que germinou e foi além dos muros da Universidade de São Paulo. Que bom que a nossa amizade ultrapassou o convívio do laboratório e se fortalece cada vez mais. É muito bom ter uma amiga tão alto astral como você. Obrigada por me ouvir sempre que precisei desabafar (e olha que não foram poucas vezes) e por todos os conselhos. Tenha certeza que dessa amizade foram criados laços fraternais que certamente se eternizaram.

Às amigas de todas as horas **Ariana e Karine**, pelo carinho e amizade, pela torcida para que tudo desse certo e pelas conversas animadas e descontraídas que sempre deixavam meus dias mais leves. Momentos que jamais irei esquecer.

Aos meus amigos do Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – FMUSP, em especial **Michele, Livia, João Paulo e Caroline** pelo prazer de tê-los conhecido, pela companhia, incentivo e apoio nesse processo.

À **Dra. Ana Catharina** da Divisão de Clínica das Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas (HC-FMUSP), pelas sugestões e estímulo durante a realização deste trabalho.

Ao **Dr. Azzo Widman** do Hospital Dia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), por fornecer as amostras necessárias para a realização deste trabalho e estar sempre disposto a ajudar no que fosse preciso. Pela receptividade e pela confiança que depositou em nosso laboratório.

Ao Prof. **Dr. Flair José Carrilho** pela oportunidade de fazer parte do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

À **equipe** do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), pelo eficiente trabalho na separação dos blocos e preparação das lâminas para o estudo anátomo-patológico, em especial ao **Dr. Venâncio** pela colaboração e apoio.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro disponibilizados para a realização deste trabalho.

Aos participantes de minha banca de qualificação **Dra. Claudia P. M. S. Oliveira, Dra. Ludmila R. P. Ferreira e Dr. Celso F. H. Granato** pela avaliação detalhada e pelas sugestões propostas.

À **Andrea** (Incor), por ter apoiado nosso projeto permitindo a utilização da sua infra-estrutura em todas as vezes que se fez necessário para o processamento das amostras.

À **Vilma** da Secretária de Pós-Graduação do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), pela prontidão em esclarecer todas as minhas dúvidas, escutar minhas reivindicações e assessorar durante estes anos de estudo.

Às pessoas que não foram citadas, mas que contribuíram, diretamente ou indiretamente, para a concretização deste projeto, meu muito obrigada.

“Seja você quem for, seja qual for à posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá”.

(Ayrton Senna)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Caneiro da Cunha, Maria Julia de A.L Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *Listof Journals Indexed in Index Medicus*.

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	21
1.1.	História natural da Hepatite C.....	21
1.2.	Vírus da Hepatite C.....	21
1.3.	Diversidade genética do genoma viral	23
1.4.	Distribuição genotípica do HCV.....	25
1.5.	Patogênese do HCV e lipídeos	26
1.5.1.	Lipídeos	26
1.5.2.	Interação do HCV com as Lipoproteínas.....	28
1.5.3.	Ciclo de vida do HCV x lipídeos.....	30
1.6.	RNAs não codificantes	34
1.7.	microRNAs.....	34
1.7.1.	Histórico	34
1.7.2.	Biogênese.....	35
1.7.3.	Características	38
1.7.4.	miR-122.....	39
1.7.4.1.	miR-122 e o Vírus da Hepatite C	41
1.7.5.	miR-33a.....	43
2	OBJETIVOS.....	47
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	49
3.1	Aspectos Éticos	49
3.2	CrITÉRIOS de Inclusão.....	49

3.3	Critérios de exclusão	49
3.4	Casuística	50
3.5	Amostras	50
3.6	Extração do RNA total	52
3.6.1	Tecido Hepático fresco e parafinado	52
3.6.2	Amostras de sangue periférico	53
3.6.3	Pureza e quantificação do RNA extraído	53
3.7	Transcrição Reversa	54
3.8	Quantificação dos miRNAs por PCR em Tempo Real	54
3.9	Análise da expressão dos miRNAs	55
3.10	Análise estatística	56
4	RESULTADOS	58
4.1	Casuística	58
4.2	Níveis de expressão do miR-33a	59
4.3	Níveis de expressão do miR-122	62
4.4	Correlação entre a expressão de miR-33a e de miR-122	65
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO	78
7	ANEXOS	80
7.1	ANEXO A - Parecer do comitê de ética e pesquisa	80
7.2	ANEXO B - Artigo submetido à publicação	81
8	REFERÊNCIAS	107

APÊNDICE

ABCA1	<i>ATP-Binding Cassette Transporter</i> Tipo A1
AGO	Família de proteínas Argonautas do inglês
ALT (TGP)	Alanina aminotransferase
AP	Alcalino fosfatase
Apo	Apoproteínas
Apo-A1	Apolipoproteína A1
Apo-B	Apolipoproteína B
Apo-C	Apolipoproteína C
Apo-E	Apolipoproteína E
AST (TGO)	Aspartato Aminotransferase
ATP	<i>Binding Cassette Transporter</i>
CAP	7 metilguanosina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CHC	Carcinoma Hepatocelular
C_r	Ciclo do limiar de fluorescência do inglês
GGT	Gama glutamil transferase
HCV	Vírus da Hepatite C
HCC	Hepatite C Crônica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IRS2	Substrato do Receptor de Insulina 2
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LNA	Ácido nucléico trancado
Lipo-A	Lipoproteína A
LVP	Partícula lipoviral
miR	miRNAs
miR-122	microRNA 122

miR-33a	microRNA 33a
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
ncRNAs	RNAs não codificadores
MTP	Proteína microsomal de transferência de triglicérides
ORF	Fase aberta de leitura
PPAR	<i>Peroxisomeproliferator-activated receptor</i>
Pri-miR	miRNA primário
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RT	Transcrição reversa
SREBP	Proteína de ligação ao elemento de resposta aos esteróides
TG	Triglicerídeo
UTR	Regiões não-traduzidas
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
XPO5	Exportina-5

dL	Decilitro
Kb	Quilobase
kg	Kilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
log	Logarítimo
ng	Nanograma
nt	Nucleotídeo
rpm	Rotações por minuto
UI	Unidade Internacional
μL	Microlitro
°C	Grau Celsius

Figura 1	Estrutura genômica do HCV.....	23
Figura 2	Árvore filogenética do vírus da hepatite C.....	25
Figura 3	Distribuição dos genótipos do HCV.....	26
Figura 4	Vírus da hepatite C (HCV) em soros de indivíduos infectados.	30
Figura 5	Representação do ciclo replicativo do HCV e a produção de partículas virais em gotículas lipídicas na membrana RE.....	33
Figura 6	Biogênese do miRNA.....	38
Figura 7	Interações entre miR-122 e a 5´UTR do HCV RNA.....	43
Figura 8	Regulação simultaneamente do miR-33 nas múltiplas vias metabólicas do fígado.....	46
Figura 9	Curvas de amplificação dos miRNAs RNU44, miR-122 e miR-33a.....	58
Figura 10	Análise comparativa dos níveis de expressão do miR-33a.....	63
Figura 11	Análise comparativa dos níveis de expressão sérica do miR-33a entre os genótipos do HCV-1 e HCV-3.....	63
Figura 12	Análise de correlação entre os valores de expressão do nível hepático e sangue periférico do miR-33a com os dados laboratoriais.....	64
Figura 13	Análise comparativa dos níveis de expressão do miR-122.....	65
Figura 14	Análise comparativa dos níveis de expressão sérica e hepática do miR-122.....	66

Figura 15	Análise de correlação entre os valores de expressão do nível hepático e sangue periférico do miR-122.....	67
Figura 16	Análise de correlação entre os valores de expressão do nível hepático do miR-122 com o nível sérico de HDL e Insulina em indivíduos infectados pelo HCV-3.....	68
Figura 17	Correlação entre os valores de expressão dos microRNAs a nível sangue periférico e hepático em indivíduos infectados pelo HCV-1.....	69
Figura 18	Correlação entre os valores de expressão dos microRNAs a nível sangue periférico e hepático em indivíduos infectados pelo HCV-3.....	70

Tabela 1 -	Características dos indivíduos participantes do estudo.....	61
-------------------	---	----

Oliveira K. G. *Níveis de expressão de mir-33a e mir-122 em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da Hepatite C genótipos 1 e 3* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015. 98p.

Estima-se que 3% da população mundial esteja infectada pelo vírus da hepatite C (HCV). O HCV tem como alvo o tecido hepático e a maioria dos pacientes infectados desenvolvem infecção crônica. Nos últimos anos, estudos *in vitro* têm demonstrado interações entre o miRNA-122 (miR-122) da célula hospedeira e dois sítios localizados na região 5' UTR do genoma do vírus da hepatite C (HCV), os quais são essenciais ao processo de replicação viral. O miR-122 é altamente expresso no fígado, onde atua na regulação do metabolismo de lipídios juntamente com outro miRNA, o miRNA-33a (miR-33a), porém, o mecanismo envolvido nesta regulação ainda é pouco conhecido. Sabe-se que a infecção pelo HCV altera a expressão de genes envolvidos na biossíntese e transporte de lipídios, resultando na estimulação do metabolismo de lipídios e criando um ambiente favorável para sua replicação. Neste contexto os objetivos deste trabalho foram avaliar a expressão de miR-33a e miR-122 em indivíduos cronicamente infectados pelo HCV-1 e HCV-3 em amostras obtidas antes do início da terapia. Os miRNAs foram isolados a partir de amostras de sangue periférico e de tecido hepático. A quantificação da expressão relativa de ambos miRNAs foi pela técnica de PCR em tempo real. Os níveis de miR-33a no sangue periférico foram mais elevados do que no tecido hepático em indivíduos infectados pelo HCV-1 ($p < 0,0001$) e HCV-3 ($p = 0,0025$). Observou-se uma correlação inversa entre os níveis de miR-33a no sangue periférico e tecido hepático dos indivíduos infectados pelo HCV-1 ($r = -0,281$, $p = 0,039$) e correlação positiva para os indivíduos infectados pelo HCV-3 ($r = 0,9286$, $p < 0,0001$). Correlação inversa entre os níveis hepáticos de miR-33a com o nível sérico de insulina ($r = -0,371$, $p = 0,005$) nos indivíduos infectados pelo HCV-1 e correlação positiva entre os níveis no sangue periférico com os níveis séricos de GGT ($r = 0,553$, $p = 0,049$) foram observadas. Em relação ao miR-122, de maneira geral o nível hepático foi mais elevado do que o sérico ($p < 0,0001$). Entretanto, o nível hepático de miR-122 em indivíduos infectados pelo HCV-3 foi maior quando comparado aos infectados pelo HCV-1 (6,22 vezes, $p < 0,001$). Uma correlação inversa entre os níveis séricos de ApoA-II e os níveis de expressão de miR-122 no sangue ($r = -0,330$; $p = 0,014$) e tecido hepático ($r = -0,311$; $p = 0,020$) foi observada nos pacientes infectados pelo HCV-1. Os pacientes infectados pelo HCV-3 mostraram correlação positiva entre os níveis hepáticos de miR-122 e os níveis de HDL ($r = 0,412$, $p = 0,036$) e insulina ($r = 0,478$, $p = 0,044$). O miR-33a e o miR-122 atuam regulando genes que controlam o metabolismo dos lipídios no fígado. Até o presente momento, não existem relatos que associem a expressão do miR-33a e do miR-122 com o perfil lipídico na infecção pelo HCV. Além disso, o acúmulo de lipídio (esteatose) intensamente descrito na infecção pelo HCV-3 pode sugerir interação diferenciada desse genótipo com os mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo lipídico, envolvendo o miR-33a e miR-122.

Descritores: miR-33a, miR-122, Infecção pelo HCV, metabolismo de lipídios, expressão hepática.

Oliveira K. G. *mir-33a and mir-122 levels in patients chronically infected with hcv genotype 1 and 3* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

The prevalence of infection by hepatitis C virus (HCV) is about 3% of the world population. HCV targets the liver tissue and the majority of infected patients develop chronic infection. In recent years, in vitro studies have demonstrated interactions between miRNA-122 (miR-122) the host cell to two places located in the 5' untranslated region of the HCV genome which are essential for virus replication process. miR-122 is highly expressed in the liver, which has been implicated as a fatty acid metabolism regulator. Another miRNA has also been described as a key regulator of lipid metabolism, miRNA-33a (miR-33a), however, the mechanisms involved in this regulation are still little known. It is known that HCV infection changes the expression of genes involved in the biosynthesis and transport of lipids, resulting in stimulation of the lipid metabolism and creating a favorable environment for replication of the virus. To our knowledge, there are no reports linking the expression of miR-33a with lipid profile in HCV infection. In this context the objectives of this study were to evaluate the expression of miR-33a and miR-122 in chronically infected individuals with HCV-1 and HCV-3 in samples obtained prior to initiation of therapy. MiRNAs were isolated from peripheral blood samples and liver tissue. The quantification of relative expression of both miRNAs was by PCR in real time. MiR-33a levels in peripheral blood were higher than in liver tissue in patients infected with HCV-1 ($p < 0.0001$) and HCV-3 ($p = 0.0025$). Levels in the peripheral blood of miR-33a were lower in patients infected with HCV-3 ($p = 0.0169$). There was an inverse correlation between hepatic levels of miR-33a with serum insulin levels ($p = 0.005$) in individuals infected with HCV-1 and a positive correlation between the levels in the peripheral blood serum levels of GGT ($p = 0.049$). Hepatic levels of miR-122 were higher than the levels in the peripheral blood of individuals infected by HCV-1 and HCV-3 ($p < 0.0001$). Hepatic miR-122 levels were higher in patients infected with HCV-3 than those infected with HCV-1 (6.22 times, $p < 0.001$). There was a positive correlation between miR-122 levels in the blood and liver tissue of patients infected with HCV-1 ($r = 0.302$, $p = 0.026$). An inverse correlation between serum ApoA-II was observed in these patients the levels of expression of miR-122 in blood ($r = -0.330$; $p = 0.014$) and liver tissue ($r = -0.311$; $p = 0.020$). Patients infected with HCV-3 showed a positive correlation between hepatic miR-122 levels to HDL levels ($r = 0.412$, $p = 0.036$) and insulin levels ($r = 0.478$, $p = 0.044$). The miR-33a and miR-122 act by regulating genes that control lipid metabolism in the liver. The different interactions with lipid metabolism exerted by HCV-3 may explain why his relationship with the miR-33a and miR-122 was different when compared with HCV-1.

Keywords: miR-33a, miR-122, HCV infection, lipid metabolism, hepatic expression

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1. História natural da Hepatite C

A infecção pelo Vírus da Hepatite C (HCV) é a maior causa de Hepatite Crônica, Cirrose Hepática e Carcinoma Hepatocelular (CHC) em todo o mundo, com uma estimativa global de aproximadamente 130-170 milhões de indivíduos cronicamente infectados^[1]. No Brasil, a prevalência varia de 1% a 2%^[2-4].

Após a infecção aguda, existem basicamente duas trajetórias possíveis: a resolução da infecção (clareamento viral) ou infecção persistente, ambas determinadas por um conjunto complexo de interações vírus-hospedeiro. O fato de o HCV estabelecer uma infecção crônica persistente mesmo sendo reconhecido e alvejado pelos sistemas imune inato e adaptativo sugere que o mesmo tenha desenvolvido estratégias eficazes para driblar a ação desses sistemas^[5, 6].

1.2. Vírus da Hepatite C

O HCV é um vírus hepatotrópico que apresenta uma fita de RNA com polaridade positiva de aproximadamente 9,6 kb de comprimento, pertence ao gênero *Hepacivírus* da família *Flaviviridae*. A característica comum entre os membros desta família é a expressão de genes virais a partir de uma única fase aberta de leitura (ORF - Open Reading Frame) que codifica uma poliproteína com mais de 3.000 aminoácidos, sendo clivada em proteínas estruturais e não estruturais^[7].

As proteínas estruturais são denominadas de Core (C) e glicoproteínas do envelope (E1 e E2). As proteínas virais não estruturais são p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B (**Figura 1**) [8].

Scheel, T.K and Rice, C.M. / *NATURE MEDICINE* 2013;19 (7):857-849 (modificado)

Figura 1: Estrutura genômica do vírus da hepatite C. Maturação da poliproteína: triângulos brancos, cinzas, vermelho e verde indicam os sítios de clivagem por proteases celulares; triângulo branco representa sítio de clivagem da C-terminal; triângulos cinzas representam os sítios de clivagens da E1, E2 e p7; triângulo vermelho representa o sítio de clivagem da protease NS2-3, e triângulos verdes correspondem aos sítios de clivagem da NS3 protease.

A fase aberta de leitura no genoma do HCV é flanqueada por regiões não-traduzidas (*UTR*), denominadas de região 5' *UTR* e 3' *UTR*, com aproximadamente 341 e 230 nucleotídeos respectivamente. Estas regiões são constituídas de estruturas de RNA altamente conservadas, essenciais para a tradução das proteínas virais e replicação do genoma viral [9]. A alta similaridade da região 5' *UTR* entre as cepas virais (> 92%), sugere que esta região tenha uma participação importante em processos chaves como a replicação do genoma viral e a tradução das proteínas virais, uma vez que é uma região constituída por quatro domínios de

RNA altamente conservados e um sítio de entrada no ribossomo (*IRES-internal ribosomal entry site*), sendo este o responsável pelo início da tradução da poliproteína viral ^[10, 11]. A região 3'UTR é denominada de sequência variável, a qual é composta por aproximadamente 40 nucleotídeos, uma região poli U (polipirimidina), e uma sequência única de 98 nucleotídeos que é altamente conservada entre os genótipos HCV ^[12].

1.3. Diversidade genética do genoma viral

O vírus da Hepatite C apresenta alto grau de heterogeneidade em suas sequências nucleotídicas, gerando o aparecimento de diferentes genótipos. A partir de análise filogenética, estudos utilizando amostras de HCV isolados em diferentes regiões do mundo, permitiram a identificação e classificação de 7 grupos principais do HCV, os quais são denominados de genótipos e numerados de 1 a 7 (**Figura 2**). Além dos genótipos, diversos subtipos também foram identificados e passaram a ser referidos por números acompanhados de letras minúsculas (por exemplo, 1a, 1b, 3a, etc...) ^[13].

A distinção que ocorre entre os genótipos e os subtipos se deve a diferença proporcional entre a porcentagem de sequências, sendo que, os genótipos do HCV diferem entre si em cerca de 30% de sua sequência nucleotídea, enquanto que os subtipos, em 15% ^[13].

Jackowiak, P. et al. / *INFECTION, GENETICS AND EVOLUTION* 2014 - (21):67-82 Scheel, T.K and Rice, C.M / *NATURE MEDICINE* 2013:19(7):837-849 (modificado)

Figura 2: Árvore filogenética dos sete genótipos e subtipos de HCV. Sequências representativas da região de codificação completa foram baixadas de http://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/m/files_flavi/4743.aspx (Smith et al., 2013).

1.4. Distribuição genotípica do HCV

A distribuição geográfica dos genótipos do HCV é diversificada, o que reflete diferenças na epidemiologia (**Figura 3**)^[14]. Embora os genótipos 1, 2 e 3 apresentem distribuição amplamente global, a prevalência de cada um destes varia de acordo com a área geográfica. O genótipo 1 tem a mais ampla distribuição geográfica, por ser o genótipo mais comum na América do Norte, Europa Ocidental, América do Sul, Ásia e Austrália, com uma frequência que varia de 40 a 80%, dependendo da região ^[14]. No Brasil, o padrão de distribuição dos genótipos segue o padrão mundial, sendo, o genótipo 1 o mais prevalente (65%), seguido do genótipo 3 (30%), genótipo 2 (4%), e outros genótipos (1%) ^[15].

Hajarizadeh, B. et al. / *NAT. REV. GASTROENTEROL. HEPATOL* 2013 - (10):553-562

Figura 3: Distribuição dos genótipos do HCV. Distribuição da infecção por HCV altamente variável, com a prevalência em países individuais que variam de <1% a >10%.

O valor prognóstico do genótipo do HCV na evolução para hepatite crônica é discutível, porém, é indiscutível a importância da genotipagem na determinação da epidemiologia, da transmissão e predição da taxa de progressão da doença frente à resposta terapêutica do paciente com hepatite C crônica (HCC).

Apesar dos avanços na prevenção e tratamento da Hepatite C, esta doença continua sendo uma das principais causas de transplante hepático. Os mecanismos que levam a cronicidade da doença permanecem obscuros. Com isso, uma recente área de investigação envolvendo o papel específico de determinados miRNAs (microRNAs) na replicação do HCV e na regulação do metabolismo lipídico do hospedeiro vem crescendo de forma espantosa.

1.5. Patogênese do HCV e lipídeos

1.5.1. Lipídeos

Os lipídeos além de serem componentes essenciais das membranas biológicas, também são fonte de energia da célula humana. São encontrados como moléculas livres e reguladores metabólicos que controlam a função e a homeostase celular. Nos seres humanos os ácidos graxos, os triacilgliceróis, os fosfolipídeos e o colesterol esterificado e livre são considerados os principais lipídeos de importância clínica ^[16].

Devido sua natureza hidrofóbica, os lipídeos têm seu transporte pelo plasma sob a forma de aglomerados, sendo denominados de

lipoproteínas, estas por sua vez são classificadas como macromoléculas constituídas por uma fração lipídica (triglicerídeos, fosfolipídeos, colesterol livre e esterificado) e outra proteica, as apoproteínas (Apo). A fração proteica forma uma família complexa de polipeptídios que têm como função manter os lipídeos em solução (principalmente os triglicerídeos e os ésteres de colesterol) promovendo e controlando não só o transporte dos mesmos no plasma como também sua captação pelos tecidos ^[16].

As apoproteínas diferem entre si tanto na composição lipídica e proteica, como no tamanho, na densidade e no sítio de origem. Os membros mais importantes são: apoproteína A (Apo-A), apoproteína B (Apo-B), apoproteína C (Apo-C), apoproteína E (Apo-E) e lipoproteína A Lp (a). Já as lipoproteínas plasmáticas são classificadas de acordo com sua densidade em meio aquoso, sendo denominadas de quilomícrons (QM), lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) ^[17].

O fígado é o principal local de formação e depuração dessas lipoproteínas, o que o faz desempenhar um papel fundamental no metabolismo dos lipídeos, participando não só dos ciclos exógeno e endógeno como também do transporte de lipídeos através do plasma ^[18]. Em um organismo saudável, um equilíbrio complexo é mantido entre a biossíntese, a utilização e o transporte do colesterol e das lipoproteínas, no entanto, na presença de uma infecção hepática severa o metabolismo

lipídico é profundamente comprometido, gerando um desequilíbrio nesse sistema. As alterações no perfil lipídico observadas na infecção hepática crônica referem-se aos níveis séricos anormais bem como a alterações na composição e mobilidade dessas moléculas, ou seja, mudanças nas propriedades físico-químicas ^[18].

1.5.2. Interação do HCV com as Lipoproteínas

A infecção pelo HCV está intimamente envolvida com o metabolismo lipídico do hospedeiro e também com a desregulação das lipoproteínas circulantes. É notável o acúmulo de gotículas lipídicas nos hepatócitos infectados, uma característica da patologia da infecção pelo HCV ^[19].

Estudos mostram caracterizações biofísicas de partículas virais no soro de pacientes infectados pelo HCV e revelam que o vírus é altamente heterogêneo devido à associação com as lipoproteínas. A partir de soro humano e de células de hepatoma em cultivo nos estudos foi observada associação de lipoproteínas com a partícula viral, esta caracterização revelou um complexo de partículas híbridas infecciosas, sendo denominadas de partícula lipoviral (LVP) (**Figura 4**). Os resultados desses estudos foram intrigantes, envolvendo o colesterol e outros lipídios na patogênese pelo HCV, desde a entrada, replicação e montagem da partícula viral ^[20-23].

Femlee, D.J et al. / *VIRUSES*2013;(5):1292-1342 (modificado)

Figura 4: Vírus da hepatite C (HCV) em soros de indivíduos infectados: partícula circular associada ao complexo de lipoproteínas do hospedeiro denominada de partícula lipoviral, que são enriquecidas em triglicérides, colesterol, e várias apolipoproteínas.

O HCV além de se associar a partícula de VLDL para a produção de partículas infecciosas, tornando-o assim um LVP, também se associa a outras lipoproteínas ricas em triglicerídeos hepáticos contendo apoB-100, para assim circularem livremente. Além de que o vírus também se associa às lipoproteínas que contêm a apoB-48, uma isoforma de apoB exclusivamente produzida a partir do intestino delgado ^[21, 24]. O que mostra, portanto uma associação ativa entre o HCV e as lipoproteínas.

Além de LVP infecciosas, estudos mostram que a proteína Core do HCV foi detectada na superfície de lipoproteínas desprovidas do nucleocápsideo infeccioso, os chamados LVPs desocupados, o que possivelmente contribuem para a fisiopatologia da doença ^[25].

A vantagem funcional da associação entre as partículas do HCV com as lipoproteínas não é completamente elucidada, mas as evidências sugerem que a utilização das lipoproteínas pelo HCV pode mediar sua entrada na célula hospedeira via receptores de superfície celular, assim como podem também proteger o HCV do reconhecimento das imunoglobulinas, permitindo que o vírus escape da vigilância imunológica [26, 27].

1.5.3. Ciclo de vida do HCV x lipídeos

Além da associação física dos componentes do HCV com as lipoproteínas, estudos mostram que os lipídios intracelulares têm desempenhado papel fundamental em todo o ciclo de vida do HCV. A infecção crônica pelo HCV tem sido associada ao desequilíbrio da homeostase dos lipídios, o que favorece o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos [28, 29], um acúmulo que se dá provavelmente pela ativação dos genes que favorecem a síntese de lipídios no organismo [30, 31].

A reorganização das proteínas virais geradas no processo de transcrição no genoma do HCV é a que promove o acúmulo de gotículas lipídicas (LDs) na região perinuclear do hepatócito, ocorrendo, portanto, o desenvolvimento de esteatose hepática [32, 33].

O processo de formação dessas gotas lipídicas intra-hepáticas, tem sido atribuído à atuação direta da proteína viral, que leva à diminuição da proteína microssomal de transferência de triglicerídeos (MTP), e

consequentemente à menor estabilização da Apo-B, o que prejudica a ligação com triglicerídeo (TG) e resulta em não formação da partícula VLDL para liberação hepática. O baixo nível da MTP também leva a diminuição de *Peroxisomeproliferator-activated receptor* (PPAR), cuja consequência é a maior expressão do *Sterol Regulatory Element-Binding Protein* (SREBP), levando ao estímulo para a lipogênese. Assim, com o PPAR baixo nos hepatócitos há uma contribuição para a desregulação dos ácidos graxos, β -oxidação e sensibilidade à insulina (**Figura 5**) [30, 34, 35].

Moriishi, K & Matsuura / *MICROBIOLOGY* 2012: 3 (54) 1-14 (modificado)

Figura 5 – Representação do ciclo replicativo do HCV e a produção de partículas virais em gotículas lipídicas na membrana RE. (1) Partícula viral é traduzida para uma poliproteína (2) Proteínas não estruturais formam um complexo de replicação juntamente com fatores do hospedeiro. Proteína Core é translocada para as gotículas lipídicas através do DGAT1. Dependendo do genótipo do HCV a proteína Core ficará na membrana do RE, cooperando assim com as proteínas não-estruturais. (3) Fitas *sense* negativas e positivas de RNA viral são sintetizadas no processo de replicação. (4) A fita *sense* positiva do RNA genômico viral é englobada pelas proteínas Core. São as proteínas de envelope, NS2 e p7 que recrutam a proteína Core, estas já associadas as gotículas lipídicas e parcialmente fundidas com a membrana do RE juntamente com os microtúbulos. (5) As proteínas do Core englobam então o RNA viral, e são então circundadas pelas proteínas de envelope. Proteínas não-estruturais e outros fatores formam um suporte para a formação do nucleocapsídeo e sua estabilização. (6) As partículas virais ligam-se ao VLDL formando assim o LVP. (7) As partículas virais egressam para o lúmen do RE juntamente com o VLDL e a apolipoproteína APO-E. A elevada síntese da proteína Core ou o armazenamento de triglicérides e éster de colesterol, cooperam com outros fatores, incluindo DGAT1, para assim estabelecer a replicação do HCV.

Estudos utilizando chimpanzés infectados com HCV observaram uma indução transcripcional de genes envolvidos na síntese de lipídios

através da ativação das proteínas de SREBPs, importantes fatores de transcrição envolvidos na regulação da síntese de colesterol e ácido graxo no hospedeiro. Em outros animais experimentais como em camundongos transgênicos e também em culturas celulares infectados pelo HCV, foi demonstrado um papel crucial das proteínas não estruturais NS2 e NS4B na ativação do gene SREBP ^[36-38]. No entanto, estudos clínicos indicaram que a expressão induzida de genes lipogênicos pelo HCV não só causa a acumulação de lipídios intracelularmente, o que é observada na esteatose hepática, como também exerce uma forte influência sobre a inflamação e a progressão de fibrose hepática ^[39]. Com isso, estudos mostram que na infecção crônica pelo HCV é observado um aumento da síntese de ácidos graxos, com diminuição do nível de colesterol em comparação aos indivíduos controles ^[40].

Abid e colaboradores , 2005, utilizando modelo *in vitro* para o estudo de acúmulo de triglicérides após transfecção de proteínas Core de HCV em células Huh-7, demonstrou que o genótipo 3a induz a um aumento na concentração de lipídios três vezes mais quando comparado a outros genótipos ^[28], o que sugere, portanto, que a variação genética do HCV contribui para o acúmulo de lipídios. Além do genótipo, outro estudo, o de Poustchi e colaboradores , 2008 demonstra que nos indivíduos infectados pelo HCV-3, os níveis elevados de RNA viral foram correlacionados com o grau de esteatose, a qual melhora significativamente após erradicação viral, mostrando, portanto, um

efeito direto do vírus com o grau de esteatose hepática ^[41]. Nas análises metabolômicas, também foram observadas correlações significativas entre a infecção pelo HCV-3 com a esteatose e a hipocolesterolêmia ^[29].

1.6. RNAs não codificantes

Nos últimos 10 anos, avanços foram obtidos em relação ao conhecimento do papel dos pequenos RNAs não codificantes na regulação da expressão gênica em eucariotos. Os miRNAs correspondem a uma classe importante desses pequenos RNAs (21-23 nucleotídeos de comprimento) e têm sido correlacionados com diversas doenças humanas, incluindo infecções virais, o que sugere que as futuras terapias poderão explorar os aspectos dessa biologia^[42].

1.7. microRNAs

1.7.1. Histórico

Os miRNAs foram descritos originalmente em 1993 por Lee e colaboradores, ao caracterizarem a regulação do desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), os pesquisadores observaram um pequeno transcrito não codificador de proteína que estava regulando o gene *lin-4* do nematódeo, este gene é de extrema importância na regulação do desenvolvimento do nematódeo *C. elegans*,

pois tem como função codificar uma proteína nuclear que participa da regulação da transição do primeiro para o segundo estágio larval ^[43].

O estudo de Lee e colaboradores (1993) mostrou que durante a transcrição do gene *lin-4* dois pequenos transcritos de RNA também eram expressos, onde um era mais abundante e possuía aproximadamente 22 nucleotídeos e o outro menos abundante com aproximadamente 61 nucleotídeos, ambos, além de estarem em uma região intrônica do genoma animal não codificavam proteína alguma. Foi observado que o transcrito de 22nt denominado de miRNA tinha um pareamento completo com a região 3' *UTR* do gene *lin-14*, e dessa maneira regulava negativamente sua tradução. Esse achado permitiu a caracterização de um novo mecanismo de regulação gênica ^[43-45].

1.7.2. Biogênese

A maturação dos miRNAs começa no núcleo da célula e termina no citoplasma. Sua transcrição é realizada pelas RNA polimerases tipo II e III, originando assim um miRNA primário (*pri-miR*) com uma estrutura secundária em forma de grampo (*hairpin*). Cada miRNA possui uma haste de dupla fita, uma alça com bases não complementares e sequências franqueadoras ^[46, 47].

Protegido por um “CAP” na região 5' (7-metil guanosina) e uma cauda poli-A na região 3', este *pri-miR* é processado pela atividade endonucleolítica do complexo microprocessador *Drosha*-DGCR8

(endonuclease de RNA tipo III e seu co-fator DGCR) produzindo uma molécula precursora do miRNA de aproximadamente 50 a 80 nucleotídeos de comprimento denominado de pré-miRNA ^[48]. Os pré-miRNAs são exportados para fora do núcleo associados à exportina-5 (XPO5) juntamente com seu co-fator Ran-GTP ^[49, 50]. Uma vez no citoplasma os pré-miRNAs serão clivados em miRNA maduro pela enzima *Dicer* (um conjunto de proteínas interatuantes compostas pelo *RISC-loading complex subunit-TARBP-TRBP*), originando assim uma pequena molécula de RNA dupla fita com 22nt de tamanho, sendo denominados de miRNA maduro (**Figura 6**) ^[51, 52].

Chang, S et al./Human Molecular Genetics 2009;18(1):18-26

Figura 6: Biogênese do miRNA. Os genes que codificam os miRNAs são inicialmente transcritos pela RNA -polimerase II ou III, gerando assim o transcrito denominado de pri-miRNA no núcleo celular. Ainda no núcleo da célula a estrutura do pri-miRNA é reconhecida e clivada em ambas as cadeias pela enzima Drosha juntamente com a proteína de ligação DGCR8, formando assim o pré-miRNA com aproximadamente 60-70 nucleotídeos de comprimento. O pré-miRNA é então exportado do núcleo para o citoplasma da célula pela proteína exportina-5. Uma vez no citoplasma o pré-miRNA será processado pela enzima Dicer tipo RNase III e o TRBP (RISC-loading complex subunit-TARBP), gerando duas fitas de RNA as quais serão separadas por uma helicase de RNA e sendo uma delas degradada. A fita de miRNA madura é então preferencialmente incorporada ao complexo RISC guiando-o até o mRNA alvo.

A complementaridade na região 5' *UTR* entre as duas fitas deste miRNA é instável, ocorre então um processo dinâmico, na qual a fita que possui a menor energia livre na extremidade 5' será incorporada à proteína Argonauta (Ago) dentro do complexo RISC (Complexo indutor do silenciamento de RNA), enquanto que a outra fita é separada e degradada. O miRNA incorporado ao complexo miRISC é guiado ao mRNA alvo tornando-se apto a regular a expressão do mesmo.

miRNAs maduros reconhecem seu mRNA alvo por pareamento de bases entre os nucleotídeos nas posições 2 e 7 do miRNA (região *seed*) e os nucleotídeos complementares na região 3'UTR do mRNA alvo ^[53-55]. O resultado é a inibição do acúmulo da proteína codificada pelo RNA mensageiro (mRNA) alvo por meio da degradação do mRNA ou, mais comumente em animais, da repressão da tradução do mRNA ^[56-59]. Embora a função estabelecida dos miRNAs seja a regulação negativa da expressão proteica, há evidências de que também possam estimular a tradução sob certas condições, entretanto, o mecanismo pelo qual ocorre aumento da eficiência da tradução não está estabelecida ^[56, 58, 60].

1.7.3. Características

Estima-se que os miRNAs atuam em vários processos biológicos importantes, incluindo, regulação do ciclo celular, apoptose, diferenciação de células hematopoiéticas, proliferação celular e desenvolvimento embrionário entre outros ^[46, 61, 62].

Os miRNAs ligam-se ao complexo RISC e direcionam a clivagem de mRNAs com os quais têm complementaridade, ficam ligados ao mRNA impedindo a sua tradução pelo ribossomo, ou fazem repressão da tradução podendo também degradar o mRNA alvo ao qual se liga promovendo a deadenilação (retirada da cauda poli-A), atuando desta forma na repressão da expressão gênica ^[63].

Um único miRNA pode regular a transcrição de diferentes alvos, sendo que, o mesmo pode regular mais de 30% dos genes codificantes de proteína no genoma humano, comprovando assim a sua importância como um regulador global da expressão gênica, além disso, um mRNA pode ter sua transcrição regulada por vários miRNAs ^[55, 64].

1.7.4. miR-122

miR-122 é um miRNA conservado entre as espécies de vertebrados e ausente nos invertebrados ^[65]. Postula-se que o miR-122 represente 70-75% do total de miRNA expressos no fígado adulto, sendo considerado um importante miRNA tecido-específico responsável pela manutenção do estado de diferenciação e do controle metabólico do tecido ^[66].

A inibição deste miR é associada com a desregulação de genes envolvidos no metabolismo dos lípidos no fígado, tais como os genes que regulam os ácidos gordos e β -oxidação ^[66-69]. Em tecido hepático saudável a expressão do miR-122 é abundante, porém, estudos tem

observado uma associação específica entre a ocorrência sérica do miR-122 com a progressão do dano hepático ^[70].

Estudos utilizando oligonucleotídeo anti-miR-122 em ratos e chimpanzés observaram alterações da expressão de vários genes envolvidos na biossíntese de colesterol, resultando em esteatose hepática com uma redução significativa de aproximadamente 25-30% do nível de colesterol no plasma em resposta ao antagonismo do miR-122 ⁽¹⁹²⁾. Com isso, a interação entre esse importante regulador de colesterol e metabolismo de lipídios com os efeitos patológicos da infecção pelo HCV, continua a ser um aspecto interessante nas pesquisas que envolvem o HCV. Estes resultados possibilitam, portanto, uma nova estratégia de tratamento para redução de colesterol, representando, portanto o primeiro alvo terapêutico de um miRNA. Embora os genes envolvidos no metabolismo lipídico sejam afetados pela expressão do miR-122 no fígado, esses genes parecem não ser alvos diretos do miR-122, o que deixa uma lacuna na literatura sobre o entendimento dos efeitos do miR-122 na homeostase do colesterol e possíveis consequências adversas com a utilização do anti-miR-122 ^[71-74].

Este miR é identificado como o miRNA presente em células de tecido-específicos, o qual é expresso exclusivamente nos hepatócitos, representando mais de 70% do total de miRNAs hepáticos, portanto, o fígado é um órgão muito importante para o estabelecimento de padrões de expressão deste miR ^[46, 75, 76].

1.7.4.1. miR-122 e o Vírus da Hepatite C

Exemplos de participação de miRNAs em infecções virais já foram descritos, como é o caso dos vírus DNA, em particular os Herpesvírus, que codificam seus próprios miRNAs. Estes miRNAs regulam alvos virais ou celulares e podem ser importantes em estabelecer padrões de infecção latente. As infecções virais também podem regular a expressão de miRNAs celulares. Há evidências de que miRNAs celulares podem ligar-se a sítios-alvos em certos vírus, como por exemplo, o HIV-1, e reprimir sua replicação, mas ainda não está confirmado se esse é um mecanismo antiviral fisiologicamente relevante. Atualmente, existe apenas um exemplo conhecido de miRNA celular que tem efeito direto e positivo no ciclo replicativo de um vírus, é o caso do miRNA-122 (miR-122) e o HCV ^[77].

O miR-122 desempenha um papel muito importante no ciclo de vida do HCV. Ele interage com o vírus através de dois locais de ligação localizadas na extremidade 5' do RNA genômico do vírus HCV. Essa função do miR-122 ainda é incompreendida, mas é essencial para a replicação do vírus (**Figura 7**) ^[78].

Scheel, T.K and Rice, C.M. / *NATURE MEDICINE* 2013;19 (7):857-849 (modificado)

Figura 7 - Interações entre miR-122 e a 5'UTR do HCV RNA. Na figura observa-se as 2 sequências nucleotídicas do miR-122 que hibridam por complementariedade de bases com duas sequências da região 5'UTR do HCV denominadas de região S1 e S2.

Joppling e colaboradores foram os primeiros a demonstrar uma regulação positiva na replicação do RNA genômico do HCV a qual era exercida por um miRNA celular, o miR-122. O interessante é que a regulação positiva que eles observaram era uma regulação contrária ao paradigma da regulação *PTGS* dos miRs. Em culturas de hepatócitos transformados eles observaram que o “sequestro” do miR-122, obtido pela ligação deste com um oligonucleotídeo complementar (LNA -*locked nucleic acid*) resultou na redução de até 80% do RNA-HCV em células hepáticas humanas o que sugeriram portanto que este miR poderia vir a ser uma terapia futura eficaz para indivíduos infectados pelo HCV ^[73].

Os achados de Joppling (2005) levaram outros grupos a terem um grande interesse pelo miR-122, porém, estes não utilizaram apenas culturas de células como também estenderam para modelos animais e testaram outros genótipos do HCV, os resultados confirmaram que o

miR-122 está realmente envolvido não só no ciclo de replicação do HCV como também em sua propagação [74, 79, 80].

1.7.5. miR-33a

A partir de análises transcriptômica e proteômica, pôde-se observar que a expressão de determinados genes do hospedeiro, principalmente os *Sterol Regulatory Element-binding transcription fator* (SREBFs) ou fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol, envolvidos na biossíntese, degradação e transporte de lipídeos intracelulares, estão profundamente alterados durante a infecção pelo HCV e a hiperestimulação do metabolismo lipídico pode criar um ambiente favorável para a propagação do vírus e sua patogênese [81, 82].

Estudos publicados no ano de 2010 demonstraram que o gene humano SREBF2, ao transcrever sua isoforma, a proteína SREBP2, codifica em conjunto a partir de sequências intrônicas um miRNA altamente conservado, o miR-33a, o qual se localiza no íntron 16 do cromossomo 22 e demonstra uma ampla colaboração com o gene regulador SREBP, sendo que quanto maior a expressão deste gene, maior a expressão de miR-33a.

Najafi-Shoushtari *e colaboradores* (2010) associaram o miR-33a ter um papel crucial na repressão do gene *ATP-binding cassette transporter* (ABCA1), receptor que participa de maneira crítica na síntese de HDL e no transporte reverso de colesterol. O miR-33a controla a exportação do colesterol livre no interior da célula para a apolipoproteína A1 (APO-AI),

iniciando assim a biogênese de HDL (Lipoproteína de alta densidade) [28, 83-85]. O miR-33a se mostra portanto, um elemento regulador genético que trabalha finamente com os outros genes para assim regular os níveis de colesterol e ácidos graxos na célula (**Figura 8**).

Norata, G.D et al. / *ATHEROSCLEROSIS* 2012:1-7 (modificado)

Figura 8: Regulação simultânea do miR-33 nas múltiplas vias metabólicas do fígado. Quando o miR-33a ou b é expresso no fígado, há uma diminuição na função do gene ABCA1, resultando na diminuição do efluxo do colesterol e biogênese do HDL. miR-33 também reduz a oxidação dos ácidos graxos e aumenta a síntese de VLDL a partir da regulação dos genes *carnitine O-octanoyl transferase (CROT)*, *carnitine palmitoyl transferase 1A (CPT1A)*, *hydroxyacyl-CoA dehydrogenase-3-ketoacyl-CoA thiolase-enoyl-CoA hydratase (HADHB)* e *AMP-activated protein kinase (AMPKα)*. Finalmente, miR-33 inibe a expressão do receptor de insulina IRS2, prejudicando a sinalização da insulina.

Apesar dos avanços na prevenção e tratamento da Hepatite C, esta doença continua sendo uma das principais causas mundiais de transplante hepático. O papel específico dos miRNAs na replicação do HCV e na regulação do metabolismo lipídico tem sido uma recente área de investigação. Nomeadamente um único miRNA pode ter várias

funções, proporcionando um mecanismo para, simultaneamente, regular a expressão pós-transcricional de outros genes envolvidos em uma função específica ou processo fisiológico. Neste trabalho, foi avaliada a expressão de dois miRNAs envolvidos na replicação do HCV e na regulação epigenética da homeostase do colesterol e metabolismo de ácidos graxos nos pacientes infectados pelo HCV genótipos 1 e 3, os mais prevalentes em nosso país.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Considerando a importância dos miRNAs na regulação da expressão gênica e de importantes processos biológicos celulares do hospedeiro, neste trabalho propomos:

- ✓ Avaliar a expressão do miR-33a de pacientes infectados pelo HCV genótipos 1 e 3 (tecido e sangue periférico);
- ✓ Avaliar a expressão do miR-122 de pacientes infectados pelo HCV genótipos 1 e 3 (tecido e sangue periférico);
- ✓ Correlacionar os dados de expressão do miR-33a e do miR-122 com o genótipo viral, carga viral, dados laboratoriais e histopatológicos.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Os participantes incluídos no presente estudo foram aqueles que concordaram em participar, após o esclarecimento dos riscos e benefícios implícitos relacionados à participação na pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP.

3.2 Critérios de Inclusão

- ✓ Sorologia positiva para HCV (detecção de anticorpos anti-HCV no teste ELISA 3ª geração);
- ✓ HCV-RNA detectável por PCR.

3.3 Critérios de exclusão

- ✓ Pacientes com tratamento prévio para hepatite C;
- ✓ Cirróticos;
- ✓ Diabéticos;
- ✓ Outras hepatopatias;
- ✓ Sorologia positiva para HIV e HBV.

3.4 Casuística

Foram admitidos pacientes com infecção atual pelo HCV encaminhados ao ambulatório da Divisão de Clínica das Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas e ao ambulatório de Hepatologia do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

Noventa e oito pacientes foram selecionados, sendo que destes 55 estavam cronicamente infectados pelo HCV genótipo 1 e 43 infectados pelo HCV genótipo 3.

Todos os pacientes incluídos foram submetidos à biópsia hepática, que foi analisada por um patologista com larga experiência em histopatologia hepática e foi classificada quanto às alterações encontradas de acordo com a classificação das Sociedades Brasileiras de Patologia e Hepatologia ^[86].

Os pacientes foram questionados sobre o uso de medicamentos que controlam os níveis séricos de lipídeos para que esta informação fosse considerada no momento da análise.

3.5 Amostras

Amostras de sangue periférico e de tecido hepático (biópsia percutânea) foram coletadas de 68 pacientes infectados cronicamente

pelo vírus da Hepatite C [HCV-1 (n=55) e HCV-3 (n=13)]. As biópsias foram realizadas no Hospital Dia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O fragmento coletado foi imediatamente imerso na solução *RNAlater*[®] (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) permanecendo 24h a 2-8°C, posteriormente foi armazenado a -80°C.

Devido à dificuldade encontrada na obtenção de amostras de indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3 durante o desenvolvimento do estudo, foi necessário complementar a casuística deste genótipo utilizando tecido hepático parafinado. Esse material faz parte da coleção de amostras do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Para estes indivíduos não foi possível obter algumas dosagens bioquímicas e moleculares próximas à data da biópsia, ao todo foram obtidas 30 amostras de tecido parafinado, o que totalizou em 93 indivíduos infectados cronicamente pelo vírus da Hepatite C [HCV-1 (n=55) e HCV-3 (n=43)].

No momento da biópsia, uma amostra de sangue foi coletada e encaminhada ao laboratório central do HC-FMUSP para a realização das análises bioquímicas dos seguintes parâmetros: glicose, insulina, triglicérides, colesterol, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil-transferase (GGT) e alcalino fosfatase (AP) e ainda para quantificação do número de cópias do RNA-

HCV circulante (Cobas® Taqman® HCV Test, Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA).

3.6 Extração do RNA total

3.6.1 Tecido Hepático fresco e parafinado

As amostras de tecido hepático criopreservadas em *RNAlater*® (Ambion, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) foram retiradas dessa solução e pesadas. Após a determinação da quantidade de tecido, as amostras foram imersas no tampão de lise do kit *mirVana*™ *miRNA Isolation* (Ambion®, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA). Posteriormente foram submetidas ao processo de homogeneização mecânica com microesferas no equipamento Precellys®24 (Bertin Technologies Corp, Washington, DC, USA), para isso foram efetuados 2 ciclos de 10 segundos cada. Este procedimento permite maior rendimento na extração dos ácidos nucleicos uma vez que promove o rompimento completo do tecido. O RNA total foi extraído utilizando-se o kit *mirVana*™ *miRNA Isolation* (Ambion®, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA) que inclui uma etapa de extração orgânica com fenol seguida de uma etapa de purificação em coluna. Foram seguidas as orientações do fabricante.

Para a extração do RNA total a partir de tecido parafinado foi utilizando o kit *Recover All* (Ambion®, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA) que inclui etapas de desparafinização e digestão enzimática seguida da etapa de purificação em coluna. Foram seguidas as

orientações do fabricante. Para essa extração foram utilizados 6 cortes de 5µm de espessura de cada paciente.

3.6.2 Amostras de sangue periférico

Amostras de sangue total foram igualmente divididas em alíquotas e armazenadas a -80° C para o isolamento de RNA total. O RNA total foi extraído utilizando-se o kit *mirVana™ PARIS Isolation Kit* (Ambion® by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) que inclui uma etapa de extração orgânica com fenol seguida da etapa de purificação em coluna. Foram seguidas as orientações do fabricante. O RNA foi eluído em 50 µL de tampão de eluição (Ambion®, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA), e armazenados a -80°C até o momento do uso.

3.6.3 Pureza e quantificação do RNA extraído

A pureza do RNA foi avaliada utilizando-se o equipamento NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Fisher Scientific Technologies, Waltham, MA, USA) foram considerados de boa qualidade as amostras de RNA cuja a razão 260/280 ficou entre 2 e 1,8. A quantificação do RNA foi avaliada pelo método fluorimétrico no equipamento Qubit® (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, USA), foi utilizado o reagente RNA Qubit® RNA Assay Kit. (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, USA) (**Apêndices A, B, C, D e E**).

3.7 Transcrição Reversa

Após a análise da qualidade do RNA extraído e quantificação, o mesmo foi submetido à reação de transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA), para isso foi utilizando o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA) O cDNA foi sintetizado utilizando-se iniciadores específicos para cada miRNA estudado. A reação de transcrição reversa foi realizada com volume final de 15µL, foram utilizados 75ng de RNA total, que foram submetidos às seguintes etapas de incubação: 16°C por 30 minutos, em seguida 42°C por 5 minutos e uma última etapa a 85°C por 5 minutos para a inativação da enzima.

3.8 Quantificação dos miRNAs por PCR em Tempo Real

O cDNA obtido na etapa de transcrição reversa foi utilizado nos ensaios de expressão. Foram utilizados os ensaios de expressão de miRNAs pré-desenhados hsa-miR-33a e hsa-miR-122 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA). O controle endógeno utilizado nas reações foi o RNA ribossomal RNU44 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA). A reação foi realizada utilizando-se o kit TaqMan Universal PCR master mix II (Applied Biosystems, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA), foram utilizados 2µL do cDNA (5ng/µL), volume final da reação foi de 20µL. A detecção e análise foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real-

Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, USA), nas seguintes condições de ciclagem: 50°C por 20 segundos, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 1min. Todas as amostras foram testadas em triplicata a cada reação.

Figura 9: Curvas de amplificação dos miRNAs RNU44, miR-122 e miR-33a
(eixo y: ΔRn , intensidade do sinal gerado; eixo x: número de ciclos)

3.9 Análise da expressão dos miRNAs

A análise de expressão foi baseada no valor de C_T (*cycle threshold*) de cada amostra, que consiste no ponto a partir do qual a fluorescência é detectada. C_T é o ponto inicial da fase exponencial da amplificação que se correlaciona inversamente com a quantidade de amostra, quanto maior a quantidade inicial de amostra menor é o valor do C_T , ou seja, mais cedo se detecta o aumento significativo da fluorescência.

Os valores de C_T obtidos para cada amostra foram normalizados utilizando os valores de C_T do RNA ribossomal RNU44 (controle endógeno) de modo a minimizar as variações decorrentes da própria metodologia ^[87]. O valor de C_T normalizado (ΔC_T) de cada amostra foi obtido da seguinte forma:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ (amostra)}} - C_{T \text{ (controle endógeno)}}$$

A expressão dos miRNAs foi obtida utilizando-se o algoritmo $2^{-\Delta C_T}$ (**Apêndices F, G e H**) ^[88]. As reações de cada ensaio foram realizadas em triplicata.

3.10 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram expressas em média $\pm$ SD ou expressas pela mediana e inter gama quartil (IQR) para dados não paramétricos. Foram comparados pelo teste *t-student* utilizando o software SPSS v.20.0. Além disso, a análise de correlação entre a expressão dos miRNAs com os parâmetros bioquímicos dos pacientes foram realizadas com correlação não paramétrica de *Spearman* utilizando o software GraphPad PRISM, versão 5.01 (GraphPad software Inc, La Jolla. CA, EUA). Em todos os testes, o valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Casuística

A tabela 1 resume os resultados dos exames laboratoriais realizados nas amostras de sangue dos indivíduos selecionados RNA-HCV

Tabela 1. Características dos indivíduos participantes do estudo.

	HCV-1 (n=55)	HCV-3 (n=43)	valores de <i>p</i>
Gênero masculino, n (%)	25 (45,5)	21 (46,7)	>0,05
Idade, anos; média (desvio padrão)	42 (±10,5)	46 (±12,2)	>0,05
IMC, kg/m ² ; mediana (desvio padrão)	27,5 (20-43)	26,3 (18,5-38,3)	>0,05
RNA-HCV, log UI/mL; média (desvio padrão)	5,98 (3,47-7,18)	5,86 (2,19-6,42)	0,032
Grau de fibrose -Metavir (%)			
F0	10 (18,18)	5 (11,63)	>0,05
F1	36 (65,45)	21 (48,84)	>0,05
F2	9 (16,36)	14 (32,56)	>0,05
F3	0	3 (6,98)	>0,05
Transaminases, U/L; mediana (desvio padrão)			
ALT	37 (12-180)	54,5 (16-134)	0,030
AST	33 (15-84)	43 (17-148)	0,030
GGT	53 (12-407)	44 (11-418)	>0,05 ^a
FA	65 (36-149)	72 (36-142)	>0,05 ^a
Apolipoproteínas, mg/dL; mediana (desvio padrão)			
APO A1	140,5 (71,2-269,9)	121,4 (75,6-200)	>0,05
APO A2	34,8 (23,2-47,4)	30,6 (20,3-47,8)	>0,05
APO B	71 (13-145,9)	80,9 (26,5-147)	>0,05
APO E	3,8 (2-11)	3,45 (2-5)	>0,05
Colesterol e frações, mg/dL; mediana (desvio padrão)			
Total	154 (61-276)	156,5 (67-238)	>0,05
HDL	52 (5-92)	50 (23-91)	>0,05
LDL	84 (9-194)	88,5 (31-186)	>0,05
VLDL	16 (7-58)	16 (6-39)	>0,05
Triglicérides	82 (6-495)	91 (28-193)	>0,05 ^a
Glicose, mg/dL; mediana (desvio padrão)	85 (63-134)	93 (73-121)	0,029
Insulina, µU/mL; mediana (desvio padrão)	11,8 (1,6-39)	8,75 (2,5-23,6)	>0,05

Teste *t*-Student; ^aMann-Whitney (*p* <0,05)

Os exames laboratoriais dos pacientes cuja amostra de tecido foi obtida a partir de material parafinado estão parcialmente completos, uma vez não foi possível obter as amostras de sangue para dosagens das apolipoproteínas próximas à data da biópsia. Os resultados da análise estatística apontam diferenças significantes para os valores do HCV-RNA (maiores para genótipo 1), glicose e as dosagens de ALT e AST (maiores no genótipo 3), entre os dois grupos estudados. A média de idade dos pacientes infectados pelo genótipo 3 era maior do que a apresentada pelos pacientes infectados pelo genótipo 1, mas este resultado não teve significância estatística.

4.2 Níveis de expressão do miR-33a

Os níveis hepáticos e séricos do miR-33a foram comparados nos dois grupos de indivíduos infectados pelo HCV. A figura 10 mostra o resultado da análise comparativa. Os níveis séricos de miR-33a foram maiores do que os níveis hepáticos, isso foi observado tanto no grupo de indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1 ($p < 0,0001$) como no grupo de indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3 ($p = 0,0025$) (**figura 10a e b**) (teste Wilcoxon pareado; $p < 0,05$).

Figura 10: Análise comparativa dos níveis de expressão do miR-33a. (a) comparação entre o nível de expressão no tecido hepático e sangue periférico de miR-33a em indivíduos infectados pelo HCV-1; (b) comparação entre o nível de expressão no tecido hepático e sangue periférico de miR-33a em indivíduos infectados pelo HCV-3.

Nessa análise também foi observado que os indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3 apresentaram níveis de expressão do miR-33a menores que os infectados pelo HCV genótipo 1, nas amostras de sangue ($p=0,0169$), diferença estatisticamente significante (**Figura 11**) (teste Mann Whitney; $p < 0,05$).

Figura 11: Análise comparativa dos níveis de expressão no sangue periférico de miR-33a entre os genótipo do HCV-1 e HCV-3.

Além das análises comparativas, foram realizados testes de correlação de *Spearman* entre os níveis de expressão do miR-33a (tecido e sangue) e dosagens bioquímicas, grau de fibrose hepática, atividade inflamatória e RNA-HCV. O resultado dessa análise mostra que nos indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1 ($r=-0,371$; $p=0,005$) (**Figura 12a**), os níveis séricos de insulina foram inversamente correlacionados com os níveis hepáticos do miR-33a. Entre os indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3, os níveis no sangue de miR-33a foram positivamente correlacionados como os níveis de GGT ($r=0,553$; $p=0,049$) (**Figura 12b**).

Figura 12: Análise de correlação entre os valores de expressão do nível hepático e sangue periférico de miR-33a com os dados laboratoriais. (a) correlação entre o nível de expressão hepática do miR-33a com o nível sérico de insulina em indivíduos infectados pelo HCV-1 ($p=0,005$); **(b)** correlação entre o nível de expressão no sangue periférico de miR-33a com o nível sérico de GGT em indivíduos infectados pelo HCV-3 ($p=0,049$).

4.3 Níveis de expressão do miR-122

A expressão dos níveis hepáticos e sangue periférico de miR-122 foi comparada nos dois grupos de indivíduos infectados pelo HCV (**Figura 13a e b**). Os níveis hepáticos de miR-122 foram maiores do que os níveis no sangue periférico, isso foi observado tanto no grupo de indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1 ($p<0,0001$) como no grupo de indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3 ($p<0,0001$) e essa diferença foi estatisticamente significativa (teste Wilcoxon pareado; $p<0,05$).

Figura 13: Análise comparativa dos níveis de expressão do miR-122. (a) comparação entre o nível de expressão hepática e sangue periférico de miR-122 em indivíduos infectados pelo HCV-1; (b) comparação entre o nível de expressão hepática e sangue periférico de miR-122 em indivíduos infectados pelo HCV-3.

Nessa análise também foi observado que os níveis hepáticos do miR-122 foram maiores nos indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3 ($p < 0,0001$) (**Figura 14**) (teste Mann Whitney; $p < 0,05$).

Figura 14: Análise comparativa dos níveis de expressão hepática de miR-122. Comparação do nível de expressão hepática de miR-122 entre indivíduos infectados pelo HCV-1 e HCV-3.

Para este microRNA também foram realizadas análises de correlação entre os níveis de expressão do miR-122 e dosagens bioquímicas, grau de fibrose hepática, atividade inflamatória e o RNA-HCV. O resultado dessa análise mostrou que nos indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1 foi observada correlação inversa entre os níveis hepáticos e sangue periférico do miR-122 com a dosagem sérica da APO-A2 ($r = -0,311$, $p = 0,020$; $r = 0,311$, $p = 0,020$ respectivamente) (**Figura 15a e b**). Outra correlação inversa observada foi entre os níveis séricos do miR-122 com a dosagem sérica da lipoproteína A ($r = -0,281$, $p = 0,049$) (**Figura 15c**).

Figura 15: Análise de correlação entre os valores de expressão do nível hepático e sangue periférico de miR-122.(a) correlação entre o nível de expressão no sangue periférico de miR-122 com o nível sérico de ApoA-II em indivíduos infectados pelo HCV-1($p=0,014$); (b) correlação entre o nível de expressão hepática do miR-122 com o nível sérico de ApoA-II em indivíduos infectados pelo HCV-1($p=0,020$); (c) correlação entre o nível de expressão no sangue periférico de miR-122 com o nível sérico de Lipo-A em indivíduos infectados pelo HCV-1($p=0,049$).

Nos indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3 foi observado correlação positiva entre os níveis hepáticos do miR-122 e as dosagens de HDL ($r=0,412$, $p=0,036$) e correlação inversa entre os níveis hepáticos do miR-122 e as dosagens de Insulina ($r=-0,478$, $p=0,044$) (**Figura 16a e b**).

Figura 16: Análise de correlação entre os valores de expressão do nível hepático do miR-122 com o nível sérico de HDL e Insulina em indivíduos infectados pelo HCV-3. (a) correlação entre o nível de expressão hepática de miR-122 com o nível sérico de HDL em indivíduos infectados pelo HCV-3 ($p=0,036$); (b) correlação entre o nível de expressão hepática de miR-122 com o nível sérico de insulina em indivíduos infectados pelo HCV-3 ($p=0,044$).

4.4 Correlação entre a expressão de miR-33a e de miR-122

Os valores de expressão do miR-33a e do miR-122 foram submetidos ao teste de correlação de *Spearman*. Nessa análise foi observada correlação inversa com significância estatística entre os níveis no sangue periférico e hepáticos de miR-33a ($r=-0,281$, $p=0,039$; **Figura 17a**), já para o miR-122 observou-se correlação positiva ($r=0,302$, $p=0,026$; **Figura 17b**). Outra abordagem foi testar a relação entre a expressão de miR-33a com a expressão de miR-122 (sangue e tecido), observou-se correlações positivas entre suas expressões (**Figura 17c e d**).

Figura 17: Correlação entre os valores de expressão dos microRNAs no sangue periférico e tecido hepático em indivíduos infectados pelo HCV-1.(a) miR-33a sangue periférico x miR-33a tecido($p=0,039$); (b) miR-122 sangue periférico x miR-122 tecido($p=0,026$); (c) miR-33a tecido x miR-122 tecido($p=0,002$); (d) miR-33a sangue periférico x miR-122 sangue periférico ($p<0,0001$).

Nos indivíduos infectados pelo HCV-3 o nível de expressão do miR-33a no sangue apresentou correlação positiva com seu nível de expressão hepática ($r=0,9286$, $p<0,0001$; **Figura 18a**), para o miR-122 não foi observada correlação. Quando os níveis de expressão do miR-122 (sangue e tecido) foram testados em relação aos níveis do miR-33a (sangue e tecido), correlações positivas foram observadas (**Figura 18b e c**).

Figura 18: Correlação entre os valores de expressão dos microRNAs no sangue periférico e tecido hepático em indivíduos infectados pelo HCV-3. (a) miR-33a sangue periférico x miR-33a tecido ($p < 0,0001$); (b) miR-122 tecido x miR-33a sangue periférico ($p = 0,0025$); (c) miR-122 tecido x miR-33a tecido ($p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Na última década, os miRNAs tem ganhado cada vez mais atenção da comunidade científica e indústria farmacêutica, devido à sua descoberta relativamente recente e pela descoberta de suas potenciais aplicações como ferramentas de diagnóstico e terapêutica. Entre os recentes avanços na compreensão da interação hospedeiro-vírus, descobriram-se miRNAs celulares do hospedeiro que alteram diretamente ou indiretamente a eficiência da replicação do HCV e induzem a doenças hepáticas.

Os miRNAs são conhecidos por modularem mais de 60% de todos os genes humanos e regularem vias metabólicas, incluindo principalmente a do metabolismo dos lipídios, sendo o miR-33a e o miR-122 os que têm emergido como reguladores chave do metabolismo de lipídios no tecido hepático^[89].

Gilad e colaboradores (2008) descreveram a importância dos perfis de miRNAs no sangue, uma vez que entre indivíduos saudáveis o perfil de expressão dos miRNAs no sangue são consistentes e em indivíduos com patologias os níveis destes são alterados. Esta característica dos miRNAs circulantes estabeleceu o seu valor potencial como biomarcadores para mudanças de expressão em condições fisiológicas e patológicas^[90].

Até o presente momento, não existem relatos que associem a expressão do miR-33a e do miR-122 com o perfil lipídico na infecção pelo HCV.

Os resultados do presente estudo mostram diferenças na expressão de miR-33a no sangue periférico e no tecido hepático de indivíduos infectados pelo HCV-1 e HCV-3. A expressão de miR-33a encontra-se em maiores níveis no sangue periférico dos indivíduos infectados pelo HCV-3. Assim, é possível que o mecanismo de patogênese do HCV-3 possa estar relacionada com a maior liberação desse miRNA para a circulação. Trabalhos futuros são necessários para entender o papel deste miRNA na infecção pelo HCV.

Os sinalizadores intracelulares hepáticos substrato do receptor da insulina (IRS-1 e IRS-2) demonstram ser importantes. Estudos em camundongos com a supressão total da IRS-1 evidenciaram a presença de resistência insulínica (RI), menor captação de glicose periférica e retardo no crescimento, mas não a presença de hiperglicemia, concluindo que a IRS-2 compensaria parcialmente a ausência da IRS-1. Em contrapartida, após a supressão total da IRS-2, detectam-se altos níveis de hiperglicemia por alteração tanto na ação periférica como central da insulina, quanto pela falência da atividade secretória das células β -pancreáticas. Desta forma, alterações em qualquer uma destas duas proteínas contribuiria para a RI hepática ^[91]. Daválos e colaboradores (2011), relatam que o miR-33a possui sítios de ligação com o IRS2 e quando sua expressão é elevada em células hepáticas o

mesmo se anela aos respectivos sítios do IRS2 reduzindo a oxidação de ácidos graxos, bem como a sinalização da insulina ^[92]. Nossos resultados corroboram a literatura demonstrando uma correlação inversa entre o nível sérico de insulina e o nível hepático de miR-33a nos indivíduos infectados pelo HCV-1. Alterações metabólicas são genótipo específicas na infecção pelo HCV, sendo os genótipos 1 e 3 associados com RI e esteatose hepática, respectivamente.

Frequentemente é observado o aumento da enzima microssomal GGT no soro de indivíduos com infecção crônica pelo HCV, embora o seu significado permaneça incerto. Alguns estudos correlacionam o nível elevado desta com o estágio mais avançado da doença hepática ^[93]. Observamos em nosso estudo uma correlação positiva entre o nível de expressão no sangue periférico de miR-33a e a atividade de GGT nos indivíduos infectados pelo HCV-3. Porém, nenhum trabalho até o momento mostrou essa associação. Dessa maneira, a identificação de possíveis fatores que possam estar envolvidos nesta correlação, é um objetivo importante na pesquisa sobre a infecção pelo HCV-3.

O miR-122 é descrito como um miRNA específico do fígado. Em indivíduos saudáveis, a expressão hepática deste miR é elevada, ao mesmo tempo que é baixa no sangue periférico. Zhang e colaboradores (2010), ao estudarem se a expressão de miR-122 no plasma seria útil para a identificação de doenças hepáticas, observaram que os níveis circulantes de miR-122 eram significativamente elevados em pacientes

com hepatite viral, enquanto que sua expressão era diminuída no tecido hepático frente a progressão da infecção ^[94].

No presente estudo, os níveis de expressão do miR-122 no tecido hepático foram elevados em ambos os grupos estudados, entretanto, nos indivíduos infectados pelo HCV-3 o nível de expressão hepática desse miR foi significativamente maior quando comparado ao dos infectados pelo HCV-1. O fato de encontrarmos essa diferença de expressão hepática entre os grupos reforça a hipótese de que interações distintas ocorram entre este miRNA e os diferentes genótipos do HCV. O acúmulo de lipídeos no fígado intensamente descrito na infecção pelo HCV-3 (esteatose) pode sugerir que esse genótipo interfira de maneira distinta nos mecanismos envolvidos na regulação do metabolismo lipídico.

No presente estudo observou-se uma correlação negativa entre os níveis de expressão sérica e hepática de miR-122 com os níveis séricos de Apo A-II em indivíduos infectados pelo HCV-1. De acordo com Fukuhara e colaboradores ^[95] as apolipoproteínas, incluindo ApoA-I, ApoA-II, ApoC-I, II-ApoE, ApoE-III, ApoE e ApoB, têm papel crucial na montagem do HCV ^[96]. A proteína core do HCV é predominantemente citoplasmática co-localizada em vesículas lipídicas ^[22], o que portanto facilita a interação desta proteína viral com a apo A-II humana. Estudos mostram que a proteína core de fato interage com a apo A-II humana reduzindo o nível da MTP, e essa diminuição leva a menor estabilização

da Apo-B, não sendo possível a ligação com o triglicerídeo, e consequente a não formação do VLDL para liberação hepática ^[23], Adicionalmente, ocorre a diminuição de PPAR, cuja consequência é o aumento da expressão do gene SREBP, levando assim a um estímulo maior para a lipogênese. A associação observada entre o miR-122 e a Apo-A-II pode ser resultado do desequilíbrio do metabolismo lipídico decorrente da replicação viral, entretanto mais estudos são necessários para avaliar melhor essa interação.

Estudos descrevem uma possível relação entre a expressão de Lipo-A e patologias hepáticas. Geiss e colaboradores (1996) demonstraram que em infecções virais agudas os níveis de concentração de Lipo-A no soro se reduz de forma significativa. Irshad e colaboradores (2004) demonstraram que tanto em infecções virais agudas como nas crônicas, incluindo cirrose hepática são associadas a diminuição da concentração de Lipo-A no soro. Segundo estes autores a redução de Lipo-A é o resultado da diminuição de sua síntese devido aos hepatócitos danificados, uma vez que o fígado é o órgão sintetizador dessa lipoproteína ^[97, 98]. Nossos resultados mostram que os níveis de miR-122 no sangue periférico se correlacionaram negativamente com os níveis séricos de Lipo-A nos indivíduos infectados pelo HCV-1, fato que pode indicar um aumento do processo de lipogênese neste indivíduos com consequente desenvolvimento de fibrose hepática, já que o miR-122 modula a expressão de genes lipogênicos ^[99].

Curiosamente, os nossos resultados mostram que apenas os indivíduos infectados com HCV-3 tiveram uma correlação positiva entre os níveis séricos de HDL e expressão hepática de miR-122. Provavelmente o miR-122 atue em conjunto com mRNAs para regular a expressão de HDL em indivíduos infectados pelo HCV-3 ^[75]. Evidências clínicas tem demonstrado que indivíduos infectados pelo HCV-3 são mais propensos ao desenvolvimento de esteatose severa ^[28], o que sugere que as sequências virais específicas desse genótipo possam ser as responsáveis pelo acúmulo de lipídios no fígado.

No presente trabalho, uma correlação negativa entre a expressão hepática de miR-122 e os níveis séricos de insulina foi observada em pacientes infectados pelo HCV-3. Os distúrbios do metabolismo na infecção pelo HCV envolvendo o miR-122, provavelmente possa explicar esta observação. Consequências de mudanças nos níveis de miRNAs podem afetar não só o metabolismo lipídico, mas a sinalização de insulina, podendo influenciar a homeostase da glicose e o desenvolvimento de diabetes ^[100]. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes de resistência à insulina bem como a sinalização da mesma nas vias dos hepatócitos não são completamente compreendidos.

Além disso, estudos anteriores mostraram que a proteína core do HCV-3a pode ter um mecanismo diferencial na regulação do metabolismo lipídico durante a infecção, em comparação com outros genótipos, regulando positivamente a transcrição do gene da síntese dos

ácidos gordos de um modo dependente de SREBP-1, embora os mecanismos moleculares exatos ainda não sejam bem compreendidos [28, 37, 101-103]. Hepatócitos têm uma estrutura complexa que lhes permite realizar várias funções em vias metabólicas; podendo assim o HCV interferir com o metabolismo lipídico através de uma ou mais vias. As diferentes interações com o metabolismo lipídico exercida pelo HCV-3 podem explicar o porquê de sua relação com o miR-122 ser muito diferente quando comparado com HCV-1 [28].

Outras correlações observadas neste estudo foram as entre o miR-33a e miR-122, tanto nos indivíduos infectados pelo HCV-1 como pelo HCV-3, o que implica a hipótese da associação destas moléculas na infecção pelo HCV. Porém, o que chama atenção é que nos indivíduos infectados pelo HCV-3 as correlações encontradas foram todas positivas.

Os resultados observados mostram que tanto a expressão no sangue periférico como a expressão hepática de miR-33a e miR-122 diferem em indivíduos infectados com HCV-1 e HCV-3. Curiosamente, estes miRNAs por atuarem em genes reguladores do metabolismo de lipídios podem estar atuando de forma mais intensamente em indivíduos infectados pelo HCV-3. Esta diferença observada aumenta ainda mais a importância destes miRNAs como biomarcadores na infecção pelo HCV. O efeito do metabolismo lipídico em interações hospedeiro-patógeno tem sido muitas vezes negligenciado em virologia.

É importante ressaltar que estudos que avaliem mais detalhadamente a interação entre o HCV e o metabolismo lipídico podem, potencialmente, melhorar a compreensão da interação dos miRNAs e dos lipídios na patogénia do HCV.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

- ✓ No presente estudo, a expressão do miR-33a e do miR-122 foi diferente entre os indivíduos infectados pelo HCV-1 e HCV-3 (tecido e sangue), indicando uma possível interferência do genótipo do HCV;
- ✓ As associações observadas entre os níveis de expressão dos miRNAs e variáveis bioquímicas foram distintas na infecção pelo HCV-1 e HCV-3, e isso pode estar relacionado com a patogênese viral;

ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A - Parecer do comitê de ética e pesquisa

7.2 ANEXO B – Artigo submetido à publicação

Medical Microbiology and Immunology
Increased hepatic expression of miRNA-122 in patients infected with HCV genotype 3
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	MMIM-D-15-00071R1	
Full Title:	Increased hepatic expression of miRNA-122 in patients infected with HCV genotype 3	
Article Type:	Original Investigation	
Keywords:	hepatic expression, lipid metabolism, miR-122, HCV infection.	
Corresponding Author:	Fernanda Malta University of São Paulo School of Medicine, São Paulo, São Paulo BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University of São Paulo School of Medicine,	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Ketli G Oliveira	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Ketli G Oliveira Fernanda de M Malta, Ph.D. Ana CSS Natri, Ph.D. Azzo Widman, Ph.D. Paola L Faria Rúbia AF Santana Venâncio A F Alves, Ph.D. Flair J Carrilho, Ph.D. João RR Pinho, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	FAPESP (2012/50332-7)	Not applicable
	FAPESP (2012/15706-3)	Not applicable
	Alves de Queiroz Family Fund for Research	Not applicable
	CNPq	Not applicable
Abstract:	<p>Background & Aims: Hepatitis C virus (HCV) infection affects approximately 3% of the world population. HCV targets hepatic tissue and most infected patients develop a chronic infection. Currently, studies have demonstrated an association between HCV-RNA replication and miR-122, the most abundant microRNA in the liver. Our aim was to evaluate liver and serum expression of miR-122 in patients infected with HCV genotypes 1 and 3, and to identify possible associations between miR-122 expression and lipid profiles, HCV viral load, apolipoproteins and liver enzymes. Methods: MicroRNAs were isolated from blood and liver tissue and miR-122 expression was quantified by real-time PCR. HCV viral load was quantified by RealTime PCR and HCV genotype was obtained from medical report. Results: The levels of miR-122 were higher in liver than in blood from individuals infected with HCV genotypes 1 and 3 ($p < 0.0001$). The tissue levels of miR-122 were higher in subjects infected with HCV genotype 3 (6.22-fold, $p < 0.001$). A positive correlation was observed between the blood and hepatic levels of miR-122 in patients infected with HCV genotype 1 ($r = 0.302$,</p>	

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Thomas, D.L., *Cure of hepatitis C virus infection without interferon alfa: scientific basis and current clinical evidence*. Top Antivir Med, 2013. **21**(5): p. 152-6.
2. Martins, T., J.L. Narciso-Schiavon, and L. Schiavon Lde, *[Epidemiology of hepatitis C virus infection]*. Rev Assoc Med Bras, 2011. **57**(1): p. 107-12.
3. Morice, Y., et al., *Molecular epidemiology of hepatitis C virus subtype 3a in injecting drug users*. J Med Virol, 2006. **78**(10): p. 1296-303.
4. Strauss, E., *[Hepatitis C]*. Rev Soc Bras Med Trop, 2001. **34**(1): p. 69-82.
5. Bode, J.G., E.D. Brenndorfer, and D. Haussinger, *Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response*. Biol Chem, 2008. **389**(10): p. 1283-98.
6. Taylor, D.R., et al., *Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein*. Science, 1999. **285**(5424): p. 107-10.
7. Hoffman, B. and Q. Liu, *Hepatitis C viral protein translation: mechanisms and implications in developing antivirals*. Liver Int. **31**(10): p. 1449-67.
8. Gottwein, J.M. and J. Bukh, *Cutting the gordian knot-development and biological relevance of hepatitis C virus cell culture systems*. Adv Virus Res, 2008. **71**: p. 51-133.
9. Tellinghuisen, T.L., et al., *Studying hepatitis C virus: making the best of a bad virus*. J Virol, 2007. **81**(17): p. 8853-67.
10. Kato, N., *Molecular virology of hepatitis C virus*. Acta Med Okayama, 2001. **55**(3): p. 133-59.
11. Rosenberg, S., *Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus*. J Mol Biol, 2001. **313**(3): p. 451-64.
12. Penin, F., et al., *Structural biology of hepatitis C virus*. Hepatology, 2004. **39**(1): p. 5-19.
13. Jackowiak, P., et al., *Phylogeny and molecular evolution of the hepatitis C virus*. Infect Genet Evol, 2013. **21**: p. 67-82.
14. Hajarizadeh, B., J. Grebely, and G.J. Dore, *Epidemiology and natural history of HCV infection*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2013. **10**(9): p. 553-62.
15. Martins, T., J.L. Narciso-Schiavon, and L. Schiavon Lde, *[Epidemiology of hepatitis C virus infection]*. Rev Assoc Med Bras, 2006. **57**(1): p. 107-12.
16. Chiang, J.Y., *Nuclear receptor regulation of lipid metabolism: potential therapeutics for dyslipidemia, diabetes, and chronic heart and liver diseases*. Curr Opin Investig Drugs, 2005. **6**(10): p. 994-1001.
17. Imbert-Bismut, F., et al., *Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study*. Lancet, 2001. **357**(9262): p. 1069-75.
18. Miller, J.P., *Dyslipoproteinaemia of liver disease*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 1990. **4**(4): p. 807-32.
19. Dienes, H.P., et al., *Histologic observations in human hepatitis non-A, non-B*. Hepatology, 1982. **2**(5): p. 562-71.
20. Felmler, D.J., et al., *Hepatitis C virus, cholesterol and lipoproteins--impact for the viral life cycle and pathogenesis of liver disease*. Viruses, 2013. **5**(5): p. 1292-324.

21. Felmlee, D.J., et al., *Intravascular transfer contributes to postprandial increase in numbers of very-low-density hepatitis C virus particles*. Gastroenterology, 2010. **139**(5): p. 1774-83, 1783 e1-6.
22. Thomssen, R., et al., *Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein*. Med Microbiol Immunol, 1992. **181**(5): p. 293-300.
23. Thomssen, R., S. Bonk, and A. Thiele, *Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins*. Med Microbiol Immunol, 1993. **182**(6): p. 329-34.
24. Diaz, O., et al., *Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 10): p. 2983-91.
25. Scholtes, C., et al., *High plasma level of nucleocapsid-free envelope glycoprotein-positive lipoproteins in hepatitis C patients*. Hepatology, 2012. **56**(1): p. 39-48.
26. Grove, J., et al., *Identification of a residue in hepatitis C virus E2 glycoprotein that determines scavenger receptor BI and CD81 receptor dependency and sensitivity to neutralizing antibodies*. J Virol, 2008. **82**(24): p. 12020-9.
27. Prentoe, J., et al., *Hypervariable region 1 differentially impacts viability of hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization*. J Virol, 2011. **85**(5): p. 2224-34.
28. Rubbia-Brandt, L., et al., *Hepatocyte steatosis is a cytopathic effect of hepatitis C virus genotype 3*. J Hepatol, 2000. **33**(1): p. 106-15.
29. Serfaty, L., et al., *Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C*. J Hepatol, 2001. **34**(3): p. 428-34.
30. Fujino, T., et al., *Expression profile of lipid metabolism-associated genes in hepatitis C virus-infected human liver*. Hepatol Res, 2010. **40**(9): p. 923-9.
31. Nakamuta, M., et al., *Changes in the expression of cholesterol metabolism-associated genes in HCV-infected liver: a novel target for therapy?* Int J Mol Med, 2009. **24**(6): p. 825-8.
32. Sharma, P., et al., *Hepatic steatosis in hepatitis C virus genotype 3 infection: does it correlate with body mass index, fibrosis, and HCV risk factors?* Dig Dis Sci, 2004. **49**(1): p. 25-9.
33. Thomopoulos, K.C., et al., *Prevalence of liver steatosis in patients with chronic hepatitis B: a study of associated factors and of relationship with fibrosis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006. **18**(3): p. 233-7.
34. Bernsmeier, C. and M.H. Heim, *Insulin resistance in chronic hepatitis C: mechanisms and clinical relevance*. Swiss Med Wkly, 2009. **139**(47-48): p. 678-84.
35. Moriishi, K. and Y. Matsuura, *Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection*. Front Microbiol, 2012. **3**: p. 54.
36. Chang, M.L., et al., *Altered expression patterns of lipid metabolism genes in an animal model of HCV core-related, nonobese, modest hepatic steatosis*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 109.
37. Oem, J.K., et al., *Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 5): p. 1225-30.
38. Park, C.Y., et al., *Hepatitis C virus nonstructural 4B protein modulates sterol regulatory element-binding protein signaling via the AKT pathway*. J Biol Chem, 2009. **284**(14): p. 9237-46.

39. McPherson, S., et al., *Investigation of the role of SREBP-1c in the pathogenesis of HCV-related steatosis*. J Hepatol, 2008. **49**(6): p. 1046-54.
40. Lambert, J.E., et al., *Elevated lipogenesis and diminished cholesterol synthesis in patients with hepatitis C viral infection compared to healthy humans*. Hepatology, 2012. **57**(5): p. 1697-704.
41. Poustchi, H., et al., *Insulin resistance and response to therapy in patients infected with chronic hepatitis C virus genotypes 2 and 3*. J Hepatol, 2008. **48**(1): p. 28-34.
42. Jopling, C.L., *Targeting microRNA-122 to Treat Hepatitis C Virus Infection*. Viruses, 2010. **2**(7): p. 1382-93.
43. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
44. Ruvkun, G. and J. Giusto, *The Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-14 encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch*. Nature, 1989. **338**(6213): p. 313-9.
45. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
46. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
47. Chang, S., et al., *Small regulatory RNAs in neurodevelopmental disorders*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(R1): p. R18-26.
48. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. Rna, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
49. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. Science, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
50. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
51. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. Science, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
52. Ricarte-Filho, J.C., et al., *Effects of let-7 microRNA on Cell Growth and Differentiation of Papillary Thyroid Cancer*. Transl Oncol, 2009. **2**(4): p. 236-41.
53. Gu, S., et al., *Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(2): p. 144-50.
54. Lai, E.C., *Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 363-4.
55. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
56. Beilharz, T.H., et al., *microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells*. PLoS One, 2009. **4**(8): p. e6783.

57. Selbach, M., et al., *Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs*. *Nature*, 2008. **455**(7209): p. 58-63.
58. Wu, L. and J.G. Belasco, *Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs*. *Mol Cell*, 2008. **29**(1): p. 1-7.
59. Yekta, S., I.H. Shih, and D.P. Bartel, *MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA*. *Science*, 2004. **304**(5670): p. 594-6.
60. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. *Science*, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
61. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. *Nature*, 2004. **431**(7006): p. 350-5.
62. Berezikov, E., et al., *Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes*. *Cell*, 2005. **120**(1): p. 21-4.
63. Flynt, A.S. and E.C. Lai, *Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity*. *Nat Rev Genet*, 2008. **9**(11): p. 831-42.
64. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. *Cancer Cell*, 2006. **9**(3): p. 189-98.
65. Filipowicz, W. and H. Grosshans, *The liver-specific microRNA miR-122: biology and therapeutic potential*. *Prog Drug Res*, 2011. **67**: p. 221-38.
66. Tsai, W.C., et al., *MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(8): p. 2884-97.
67. Elmen, J., et al., *LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates*. *Nature*, 2008. **452**(7189): p. 896-9.
68. Iliopoulos, D., et al., *MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism*. *J Lipid Res*, 2010. **51**(6): p. 1513-23.
69. Moore, K.J., et al., *The role of microRNAs in cholesterol efflux and hepatic lipid metabolism*. *Annu Rev Nutr*, 2011. **31**: p. 49-63.
70. van der Meer, A.J., et al., *Sensitive detection of hepatocellular injury in chronic hepatitis C patients with circulating hepatocyte-derived microRNA-122*. *J Viral Hepat*. **20**(3): p. 158-66.
71. Jopling, C.L., *Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122*. *Biochem Soc Trans*, 2008. **36**(Pt 6): p. 1220-3.
72. Jopling, C.L., S. Schutz, and P. Sarnow, *Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome*. *Cell Host Microbe*, 2008. **4**(1): p. 77-85.
73. Jopling, C.L., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. *Science*, 2005. **309**(5740): p. 1577-81.
74. Lanford, R.E., et al., *Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection*. *Science*, 2010. **327**(5962): p. 198-201.
75. Esau, C., et al., *miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting*. *Cell Metab*, 2006. **3**(2): p. 87-98.
76. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. *Curr Biol*, 2002. **12**(9): p. 735-9.
77. Pfeffer, S., et al., *Identification of microRNAs of the herpesvirus family*. *Nat Methods*, 2005. **2**(4): p. 269-76.
78. Scheel, T.K. and C.M. Rice, *Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies*. *Nat Med*, 2013. **19**(7): p. 837-49.

79. Randall, G., et al., *Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(31): p. 12884-9.
80. Shan, Y., et al., *Reciprocal effects of micro-RNA-122 on expression of heme oxygenase-1 and hepatitis C virus genes in human hepatocytes*. Gastroenterology, 2007. **133**(4): p. 1166-74.
81. Miyanari, Y., et al., *The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(9): p. 1089-97.
82. Shavinskaya, A., et al., *The lipid droplet binding domain of hepatitis C virus core protein is a major determinant for efficient virus assembly*. J Biol Chem, 2007. **282**(51): p. 37158-69.
83. Norata, G.D., et al., *MicroRNAs and lipoproteins: a connection beyond atherosclerosis?* Atherosclerosis, 2012. **227**(2): p. 209-15.
84. Alvisi, G., V. Madan, and R. Bartenschlager, *Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection*. RNA Biol, 2011. **8**(2): p. 258-69.
85. Syed, G.H., Y. Amako, and A. Siddiqui, *Hepatitis C virus hijacks host lipid metabolism*. Trends Endocrinol Metab. **21**(1): p. 33-40.
86. Gayotto, L.C.C. and C. SBP/SBH, *Visão histórica e consenso nacional sobre a classificação das hepatites crônicas*. Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva 2000. **3**: p. 137-140.
87. Gennarino, V.A., et al., *MicroRNA target prediction by expression analysis of host genes*. Genome Res, 2009. **19**(3): p. 481-90.
88. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
89. Ramirez, C.M., L. Goedeke, and C. Fernandez-Hernando, *"Micromanaging" metabolic syndrome*. Cell Cycle. **10**(19): p. 3249-52.
90. Brase, J.C., et al., *Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 306.
91. Douglas, M.W. and J. George, *Molecular mechanisms of insulin resistance in chronic hepatitis C*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(35): p. 4356-64.
92. Davalos, A., et al., *miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A. **108**(22): p. 9232-7.
93. Everhart, J.E. and E.C. Wright, *Association of gamma-glutamyl transferase (GGT) activity with treatment and clinical outcomes in chronic hepatitis C (HCV)*. Hepatology, 2013. **57**(5): p. 1725-33.
94. Zhang, Y., et al., *Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases*. Clin Chem, 2010. **56**(12): p. 1830-8.
95. Fukuhara, T., et al., *Apolipoproteins, including ApoA1, ApoA2, ApoC1, ApoC2, ApoC3, ApoE and ApoB, possess redundant roles in the assembly of HCV*. PLoS Pathog 2014. **10**(12): p. 1004534.
96. Sabile, A., et al., *Hepatitis C virus core protein binds to apolipoprotein AII and its secretion is modulated by fibrates*. Hepatology, 1999. **30**(4): p. 1064-76.
97. Kraft, H.G., et al., *Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis*. J Clin Invest, 1989. **83**(1): p. 137-42.
98. Rainwater, D.L. and R.E. Lanford, *Production of lipoprotein(a) by primary baboon hepatocytes*. Biochim Biophys Acta, 1989. **1003**(1): p. 30-5.

99. Drosatos, K., et al., *A dominant negative form of the transcription factor c-Jun affects genes that have opposing effects on lipid homeostasis in mice*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 19556-64.
100. Cheung, O., et al., *Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression*. Hepatology, 2008. **48**(6): p. 1810-20.
101. Hourieux, C., et al., *The genotype 3-specific hepatitis C virus core protein residue phenylalanine 164 increases steatosis in an in vitro cellular model*. Gut, 2007. **56**(9): p. 1302-8.
102. Pazienza, V., et al., *Gene expression profile of Huh-7 cells expressing hepatitis C virus genotype 1b or 3a core proteins*. Liver Int, 2009. **29**(5): p. 661-9.
103. Piodi, A., et al., *Morphological changes in intracellular lipid droplets induced by different hepatitis C virus genotype core sequences and relationship with steatosis*. Hepatology, 2008. **48**(1): p. 16-27.

APÊNDICE

APÊNDICE

Apêndice A: Quantificação e avaliação da pureza do RNA extraído de sangue total dos indivíduos infectados pelo genótipo 1 do HCV.

Amostras	Quantidade [ng/μL]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)	Amostras	Quantidade [ng/μL]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)
1	138,00	1,90	29	89,30	1,85
2	49,60	1,87	30	57,10	1,69
3	46,00	1,58	31	30,10	1,79
4	38,10	1,79	32	59,80	1,79
5	140,00	1,88	33	37,10	1,62
6	23,80	1,82	34	55,10	1,64
7	52,00	1,75	35	26,60	1,55
8	116,00	1,85	36	69,50	1,57
9	47,60	1,82	37	88,20	1,56
10	48,80	1,60	38	70,20	1,67
11	52,60	1,77	39	70,40	1,82
12	42,60	1,94	40	117,00	1,88
13	74,70	1,78	41	57,90	1,86
14	60,80	1,57	42	50,80	1,90
15	27,40	1,75	43	73,00	1,63
16	61,30	1,60	44	98,70	1,75
17	41,30	1,90	45	59,60	1,73
18	50,60	1,99	46	64,60	1,77
19	132,00	1,74	47	28,50	1,86
20	30,50	1,89	48	22,60	0,93
21	26,20	2,03	49	48,10	1,84
22	31,70	1,66	50	15,70	1,65
23	63,6	1,63	51	21,50	1,81
24	81,4	1,60	52	36,60	1,72
25	55,7	1,71	53	47,00	1,68
26	27,9	1,78	54	9,80	1,83
27	75,5	1,66	55	19,60	1,65
28	86,5	1,52			

ng – Nanograma; **μl** – Microlitro; **nm** – Nanômetro

Apêndice B: Quantificação e avaliação da pureza do RNA extraído de tecido hepático dos indivíduos infectados pelo genótipo 1 do HCV.

Amostras	Quantidade [ng/μL]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)	Amostras	Quantidade [ng/μL]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)
1	220,00	1,90	29	41,00	1,95
2	318,00	1,96	30	323,00	1,95
3	11,30	1,97	31	186,00	1,92
4	137,00	1,94	32	194,00	1,82
5	70,20	2,07	33	287,00	1,96
6	29,60	2,02	34	150,00	1,81
7	117,00	1,94	35	242,00	1,92
8	98,00	1,96	36	189,00	1,95
9	12,20	2,00	37	472,00	1,84
10	45,70	2,03	38	520,00	2,01
11	103,00	1,99	39	105,00	1,79
12	229,00	1,98	40	175,00	1,99
13	127,00	1,93	41	462,00	1,98
14	81,90	1,98	42	162,00	1,87
15	74,80	2,01	43	323,00	1,88
16	51,00	1,95	44	285,00	1,82
17	303,00	2,03	45	213,00	1,81
18	446,00	1,96	46	389,00	2,02
19	452,00	2,02	47	212,00	2,00
20	147,00	1,95	48	135,00	1,98
21	215,00	1,97	49	570,00	1,95
22	176,00	1,99	50	483,00	1,89
23	82,50	1,99	51	147,00	1,87
24	335,00	1,97	52	103,00	1,95
25	339,00	1,94	53	346,00	1,99
26	226,00	1,93	54	148,00	1,89
27	197,00	1,96	55	312,00	2,03
28	168,00	2,01			

ng - Nanograma; **μl** - Microlitro; **nm** - Nanômetro

Apêndice C: Quantificação e avaliação da pureza do RNA extraído de sangue total dos indivíduos infectados pelo genótipo 3 do HCV.

Amostras	Quantidade [ng/μL]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)	Amostras	Quantidade [ng/μL]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)
1	62,40	1,84	8	47,00	1,84
2	24,40	2,01	9	42,70	1,74
3	18,00	1,63	10	33,60	1,74
4	64,50	1,92	11	37,00	1,75
5	18,70	1,55	12	34,80	1,82
6	54,60	1,94	13	210,00	1,87
7	34,50	1,80			

ng - Nanograma; **μl** - Microlitro; **nm** - Nanômetro

Apêndice D: Quantificação e avaliação da pureza do RNA extraído de tecido hepático dos indivíduos infectados pelo genótipo 3 do HCV.

Amostras	Quantidade [ng/μL]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)	Amostras	Quantidade [ng/μL]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)
1	50,40	2,00	8	402,00	1,97
2	39,90	2,06	9	354,00	2,02
3	218,00	2,03	10	377,00	1,97
4	177,00	1,89	11	328,00	1,95
5	358,00	2,00	12	470,00	2,00
6	169,00	2,01	13	23,60	2,06
7	382,00	1,99			

ng - Nanograma; **μl** - Microlitro; **nm** - Nanômetro

Apêndice E: Quantificação e avaliação da pureza do RNA extraído de tecido parafinado dos indivíduos infectados pelo genótipo 3 do HCV.

Amostras	Quantidade[ng/ μ L]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)	Amostras	Quantidade[ng/ μ L]	Absorbância (nm) Pureza (A260/A280)
1	47,80	1,92	17	25,00	1,97
2	38,50	1,78	18	16,00	1,92
3	42,40	2,01	19	21,20	1,89
4	21,80	1,99	20	28,20	1,99
5	123,00	1,98	21	23,20	1,78
6	25,20	2,03	22	24,60	1,77
7	58,00	2,00	23	36,80	1,94
8	41,80	1,97	24	12,20	1,97
9	32,20	1,87	25	52,80	2,00
10	70,60	1,86	26	124,00	2,01
11	42,00	1,77	27	27,00	1,94
12	58,00	1,93	28	99,20	1,98
13	36,60	1,93	29	35,00	1,76
14	33,20	2,03	30	19,20	1,81
15	47,20	2,00			
16	58,00	2,01			

ng - Nanograma; **μ L** - Microlitro; **nm** - Nanômetro

Apêndice F: Valores de expressão ($2^{-\Delta CT}$) do miR-33a e miR-122 em amostras de tecido hepático e sangue periférico de 55 indivíduos infectados pelo HCV genótipo 1.

Valores de expressão $2^{-\Delta CT}$														
Amostras	miR-33a Sangue	miR-33a Tecido	miR-122 Sangue	miR-122 Tecido	Amostras	miR-33a Sangue	miR-33a Tecido	miR-122 Sangue	miR-122 Tecido	Amostras	miR-33a Sangue	miR-33a Tecido	miR-122 Sangue	miR-122 Tecido
1	-	0,02	-	75,99	20	-	0,04	-	74,28	39	-	0,09	-	21,82
2	1,43	0,04	0,03	56,20	21	2,05	0,05	0,06	78,27	40	0,03	0,29	0,00	172,28
3	2,12	0,03	0,05	50,63	22	5,24	0,04	0,38	54,57	41	0,03	0,02	0,00	13,37
4	2,19	0,04	0,05	59,89	23	2,34	0,05	0,06	25,78	42	0,12	0,02	0,01	7,98
5	0,10	0,04	0,00	45,11	24	0,16	0,10	0,00	84,64	43	0,04	0,06	0,00	10,60
6	0,10	0,03	0,00	55,26	25	0,15	0,06	0,02	49,80	44	0,02	0,03	0,00	3,34
7	1,08	0,02	0,02	90,71	26	0,03	0,03	0,00	23,74	45	0,06	0,04	0,00	7,89
8	0,13	0,01	0,01	40,16	27	0,04	0,02	0,00	42,38	46	0,03	0,04	0,00	9,76
9	0,70	0,00	0,00	5,83	28	0,07	0,03	0,00	10,95	47	0,04	0,03	0,00	9,93
10	11,96	0,01	0,06	15,91	29	0,37	0,04	0,01	15,17	48	2,33	0,01	0,28	11,95
11	2,38	0,01	0,03	31,80	30	0,07	0,32	0,00	333,69	49	0,01	0,02	0,01	22,81
12	64,88	0,01	0,47	20,48	31	0,10	0,15	0,01	164,86	50	0,34	0,05	0,01	14,26
13	12,10	0,01	0,59	9,31	32	0,20	0,12	0,01	84,88	51	0,03	0,03	0,00	15,95
14	44,88	0,01	1,64	19,16	33	0,03	0,16	0,00	177,69	52	0,08	0,02	0,00	4,79
15	3,41	0,01	0,02	23,07	34	0,26	0,03	0,03	36,31	53	0,19	0,02	0,01	25,12
16	0,11	0,01	0,00	15,46	35	0,16	0,06	0,00	58,47	54	0,07	0,03	0,00	10,76
17	1,37	0,01	0,02	19,98	36	0,30	0,03	0,00	14,48	55	0,05	0,04	0,01	25,86
18	0,07	0,01	0,00	26,82	37	0,16	0,06	0,00	8,02					
19	0,06	0,01	0,00	23,81	38	0,10	0,09	0,00	16,11					

Apêndice G: Valores de expressão ($2^{-\Delta CT}$) do miR33a e miR122 em amostras de tecido Hepático fresco e sangue periférico de 13 indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3.

Valores de expressão $2^{-\Delta CT}$				
Amostras	miR-33a Sangue	miR-33a Tecido	miR-122 Sangue	miR-122 Tecido
1	1,17	0,02	0,04	33,69
2	0,09	0,02	0,00	45,47
3	0,56	0,03	0,06	41,75
4	0,09	0,02	0,00	20,26
5	0,08	0,02	0,00	20,22
6	0,07	0,02	0,01	21,37
7	0,03	0,00	0,01	7,63
8	0,04	0,00	0,00	8,35
9	0,04	0,01	0,03	8,74
10	0,06	0,01	0,01	9,40
11	0,06	0,01	0,02	29,38
12	0,02	0,00	0,00	10,39
13	0,00	0,00	0,00	12,20

Apêndice H: Valores de expressão ($2^{-\Delta CT}$) do miR33a e miR-122 em amostras de tecido hepático parafinado de 30 indivíduos infectados pelo HCV genótipo 3.

Amostras	miR-33a Tecido Parafinado	miR-122 Tecido Parafinado	Amostras	miR-33a Tecido Parafinado	miR-122 Tecido Parafinado
1	0,01	100,97	17	0,03	133,32
2	0,01	116,39	18	0,01	60,98
3	0,12	850,83	19	0,04	184,50
4	0,04	415,64	20	0,03	118,15
5	0,15	451,36	21	0,01	109,09
6	0,02	177,92	22	0,84	1025,22
7	0,02	188,00	23	2,48	597,19
8	0,01	225,08	24	3,15	646,86
9	0,04	391,80	25	1,47	537,74
10	0,12	565,00	26	10,31	980,68
11	0,02	93,25	27	1,31	1503,33
12	0,08	0,11	28	2,17	587,81
13	0,06	434,68	29	1,53	503,32
14	0,01	147,35	30	6,54	281,61
15	0,02	108,13			
16	0,00	12,67			