

MICRORNAs E SINALIZAÇÃO VIA RECEPTORES DO TIPO TOLL LIKE – TLRs ASSOCIADOS À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE B – ALVOS TERAPÊUTICOS E DIAGNÓSTICOS

MICRORNAs AND SIGNALING THROUGH TOLL LIKE RECEPTORS - TLRs RECEIVERS ASSOCIATED WITH HEPATITIS B VIRUS INFECTION - THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC TARGETS

GEOVANA ALVES GENTIL¹, ISABELLA REGIS DA SILVA¹, ADIBE GEORGES KHOURI², ÁLVARO PAULO SILVA SOUZA², ADELIANE CASTRO DA COSTA², ALEXSANDER AUGUSTO DA SILVEIRA^{2*}

1. Acadêmico do curso de graduação de Farmácia da Faculdade Estácio de Sá de Goiás-FESGO; 2. Docente do curso de Farmácia da Faculdade Estácio de Sá de Goiás-FESGO

* Avenida Goiás, Quadra 2.1, Lote Área, Loja 2, , 2151 - Setor Central. CEP: 74063010. alexsander.silveira@estacio.br

Recebido em 11/09/2019. Aceito para publicação em 22/09/2019

RESUMO

A hepatite B crônica é considerada um grave problema de saúde pública. O vírus da hepatite B (HBV) afeta o fígado, podendo causar doença hepática aguda, bem como doenças hepáticas crônicas que podem levar à cirrose hepática e hepatocarcinoma celular (HCC). O HCC é uma das maiores causas de morte relacionadas ao câncer causadas pelo vírus da hepatite B. Ainda que tenha disponibilidade de novas drogas antivirais, a hepatite B crônica segue sendo um enorme desafio de tratamento. Atualmente vários estudos demonstram a participação dos microRNAs e a sinalização via receptores TLRs na infecção pelo vírus HBV associados e modulados. Os tratamentos atuais para o HCC giram em torno da utilização de drogas que possam inibir a replicação viral e diminuir os elevados níveis de carga viral. Porém, não há ainda nenhuma droga capaz de promover a erradicação completa do HBV. Nesta revisão iremos abordar a importante ação dos microRNAs como biomarcadores para o diagnóstico do HCC por HBV, o efeito antiviral mediadas por interferons (IFNs) e receptores Toll-like (TLR). No entanto, para que tenham resultados positivos no controle da replicação viral é necessário mais empenho de pesquisas na identificação de novos alvos para inibição da replicação viral e melhor compreensão do ciclo de vida viral

PALAVRAS-CHAVE: Hepatite B crônica; Análogos nucleosídeos/nucleotídeos; Interferons; Receptores Toll-like; MicroRNAs.

ABSTRACT

The Chronic hepatitis B is considered a serious public

health problem. The hepatitis B virus (HBV) affects the liver and can cause acute and chronic liver diseases as well that may lead to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). The HCC is a major cause of cancer related deaths caused by HBV. Nowadays there are availability of conventional and antiviral drugs, but still chronic hepatitis B remains a major challenge to treatment. Recent studies have been showed the involvement of the microRNAs and downstream signaling by toll like receptor (TLRs) modulated and associated with HBV infection. The Current treatments for HCC revolve around the use of drugs that inhibit viral replication and lower levels of viral load. However, there is still no drug that promotes the complete eradication of HBV. In this review we will address the important action of microRNAs as biomarkers for the diagnosis of HCC HBV infection, the antiviral effect mediated by interferons (IFNs) and Toll-like receptors (TLR). However, to have positive results in the control of viral replication is necessary to further research effort in identifying novel targets for inhibiting viral replication and better understanding of the viral life cycle.

KEYWORDS: Chronic hepatitis B; analogs nucleoside/nucleotide; interferons; Toll-like receptors, microRNAs

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Boletim Epidemiológico Hepatites Virais 2014 estima-se que no Brasil 800 mil pessoas já foram infectadas pelo vírus da hepatite B. A média de casos notificados no Brasil é de 6,9/100.000 habitantes, o que caracteriza a hepatite B um sério problema de saúde pública. Mais de 350 milhões de pessoas desenvolveram a forma crônica da doença em todo o

mundo (ZUCKERMAN; ZUCKERMAN, 2000; KAO; CHEN, 2002; SARKAR; CHAKRAVARTY, 2015).

O HBV é um pequeno vírus pertencente à família Hepadnaviridae e possui tropismo definido para os hepatócitos de células humanas (LOPES; SCHINONI, 2011). O vírus é constituído de um nucleocapsídeo, no qual abriga seu genoma de ácido desoxirribonucleico (DNA) com filamentos parcialmente duplos de tamanhos distintos, envolto por um envelope viral lipídico medindo 42nm de diâmetro, o que caracteriza a partícula infecciosa completa ou partícula de DANE. Outras estruturas incompletas não infecciosas constituídas apenas de envelope viral, desprovidas de nucleocapsídeo e ácidos nucleicos, medindo aproximadamente 22nm de diâmetro são produzidas e identificadas durante o processo de infecção (ALVARIZ, 2006; PORTILHO, 2013).

O HBV possui tropismo por moléculas e proteínas expressas nas membranas dos hepatócitos, com o estabelecimento de interações químicas com os receptores específicos e subsequente internalização para o citoplasma celular (COUTINHO, 2008). O seu ciclo de vida tem início com a degradação do nucleocapsídeo liberado no interior da célula e com consequente liberação e ativação da enzima transcriptase reversa, que sintetiza a fita dupla parcial de DNA a partir do RNA viral (LOPES; SCHINONI, 2011).

A infecção pelo HBV pode ser aguda ou crônica, sendo que a maioria dos infectados pelo vírus são assintomáticos. A cronicidade da infecção é determinada pela permanência do vírus por mais de seis meses, diagnosticados pelos métodos sorológicos. O risco de desenvolver hepatocarcinoma celular (HCC) e cirrose hepática aumenta com os fatores genéticos, hábitos ou exposição a substâncias tóxicas como fumo, ingestão de álcool. Fatores sócio-epidemiológicos como idade, histórico familiar e gênero masculino também podem estar associados com a progressão para o HCC e cirrose hepática (ALVARIZ, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O indivíduo cronicamente infectado deve ser submetido à terapia com medicamentos antirretrovirais: análogos nucleosídeos/nucleotídeos e os interferons com o objetivo de diminuir as chances de progressão da doença para cirrose hepática e HCC (BRUCE; CARRATÉ; JIMÉNEZ, 2009). A desvantagem da utilização dos análogos são as taxas altas de resistência viral, além da necessidade de terapia prolongada (ALMEIDA *et al.*, 2009). A compreensão do mecanismo de resistência do HBV à terapia e o desenvolvimento de novas drogas e associações de medicamentos é um grande passo para melhorar a eficácia do tratamento e diminuir a carga viral das pessoas infectadas pelo vírus (FERREIRA; BORGES, 2007).

Atualmente vários estudos demonstram a participação dos microRNAs e a sinalização via receptores TLRs na infecção pelo vírus HBV associados e modulados. Nesta revisão iremos abordar

a importante ação dos microRNAs como biomarcadores para o diagnóstico do HCC por HBV, o efeito antiviral mediadas por interferons (IFN) e receptores Toll-like (TLR). No entanto, para que tenham resultados positivos no controle da replicação viral é necessário mais estudos e pesquisas na identificação de novos alvos moleculares para inibição da replicação viral e melhor compreensão dos mecanismos regulatórios positivos e negativos do ciclo de vida viral. Deve estar em recuo de 2 cm em itálico.

As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Goiás (UFG).

Abaixo segue um modelo de parágrafo para que fique representado o modo de citação no padrão ABNT, utilizado pelo periódico RSS-FESGO.

No Brasil, o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) registrou 39.521 mil casos de intoxicação humana, chegando a 142 óbitos registrados pelos centros de informação e Assistência Toxicológica em todo Brasil. Estes dados apontam que os medicamentos (40,10%) foram os principais agentes causadores de intoxicações em seres humanos no ano de 2016. Neste mesmo ano, 26,70% do total dos casos é composto por crianças e a faixa etária mais atingida se refere a crianças menores de quatro anos de idade. Já em relação ao sexo, 6.330 registros são de intoxicação de indivíduos masculinos e 9.447 de indivíduos femininos. Além disso, 3.475 dos 15.846 de intoxicação por medicamento se referem a casos de intoxicação com medicamentos por conta de tentativas de suicídio (SINITOX, 2016).

De acordo com Silva (2009), sabe-se que os erros relacionados a medicamentos acontecem rotineiramente na maioria dos hospitais não só dos EUA e do Brasil. A comparação entre os dois países não difere muito, pois está é uma questão que acontece diariamente, o que aponta para uma demanda por programas que possam diminuir e até mesmo chegar a percentuais mínimos de ocorrência.

A utilização de medicamentos visa contribuir de forma significativa à melhora na qualidade de vida das pessoas. No entanto, seu uso não é isento de riscos, podendo ocorrer tanto incidentes decorrentes de fatores intrínsecos ao remédio quanto por fatores extrínsecos, como “falhas” ou “erros” no processo de seu uso. Nesse sentido, ressalta-se a importância de uma administração segura, prescrições claras e legíveis, especificação certa da posologia, de maneira que se obedeça rigorosamente tais especificações no uso da medicação, evitando a intoxicação ou a morte desses pacientes (GIMENES; SANTOS, 2010).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão de literatura exploratória, realizada por meio de consultas nas bases de dados da Scientific Electronic Library Online (SciELO e Google Acadêmico). Para a seleção dos artigos foram utilizados

como descritores para a pesquisa os termos Hepatite B crônica; Análogos nucleosídeos/nucleotídeos; Intérferons; Receptores Toll-like; MicroRNAs. Foram incluídos e selecionados para o desenvolvimento do estudo de revisão, principalmente estudos dos anos de 2006 à 2016, além dos artigos clássicos relacionados ao assunto proposto nos idiomas português e inglês.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

AVANÇOS NA TERAPIA DA HEPATITE B

Atualmente surgem novas opções de drogas e terapias para o tratamento da hepatite B. Como exemplo de nova implementação de terapia temos aprovados formulações contendo intérferons (IFN), o intérferon-alfa e a associação do intérferon-alfa-peguilado e cinco análogos de nucleotídeos e nucleosídeos, como Lamivudina, Adefovir, Telbivudina, Entecavir e o Tenofovir (WEI *et al.*, 2015).

O benefício da terapia com IFNs consiste em um menor tempo de tratamento e na ausência de resistência a droga. Os intérferons tem como função, aumentar a capacidade do organismo de combater agentes infecciosos. O interferon alfa é caracterizado por sua rápida absorção, metabolização e por seus diversos efeitos adversos tais como cansaço, cefaleia, febre e mialgia, o que pode estimular o paciente a desistir da terapia. O intérferon alfa peguilado confere a uma adição da molécula polietilenoglicol ao interferon alfa que o torna mais eficaz por possuir meia vida prolongada, redução de toxicidade, e por promover supressão viral constante (BEZERRA; OLIVEIRA, 2007).

Já os análogos nucleotídeos/nucleosídeos (AN) orais, especialmente a nova geração, apresentam uma grande eficácia na inibição da replicação de DNA do HBV, normalizando os níveis das enzimas alanina-transaminase (ALT), que indica a gravidade da hepatite B e na melhoria da histologia. No entanto, a utilização de AN baseia-se em um longo período de tratamento, o que permite a seleção de HBV resistentes (WIELAND *et al.*, 2005). Para que o vírus não volte a se replicar após a parada do tratamento com AN, recentemente tem sido explorada a combinação de AN e IFN para minimizar as deficiências associadas a essas drogas. O objetivo dessa combinação reside num sinergismo entre os fármacos e bioativos uma vez que apresentam diferentes mecanismos de ação (WEI *et al.*, 2015).

Os ANs são utilizados por via oral, inibindo a transcrição reversa, incorporando-se à cadeia de DNA que o vírus produz, tornando essa cadeia defeituosa, inibindo a replicação do vírus (DEPARTAMENTO DE DST, AIDS E HEPATITES VIRAIS). O mecanismo de ação da Lamivudina consiste na inibição da transcriptase reversa viral e na síntese do DNA viral, além de agir no restabelecimento á resposta das células T (LEUNG, 2000). Porém, sua eficácia é limitada por sua elevada incidência de resistência. O Adefovir tem

como ação a inibição da cadeia terminal da replicação viral, mostrando efetividade em suprimir HBV-DNA no soro em pacientes resistentes a Lamivudina, possuindo baixa frequência de resistência. Entecavir e Tenofovir também mostram grande eficácia em controlar a replicação do HBV, e mesmo em tratamentos prolongados possuem o mínimo desenvolvimento de resistência frente ao HBV. Já a Telbivudina, tem um maior potencial do que a Lamivudina em suprimir o DNA do HBV. (FERREIRA; BORGES, 2007; MINISTERIO DA SAÚDE, 2009).

Os IFNs são capazes de induzir um grande número de genes denominados como genes de IFN-estimulados (ISGs), expressos através dos elementos responsivos à estimulação por intérferons (ISREs) (SAMUEL, 2001; PEI; CHEN; LU, 2014). Os ISGs têm diversas funções e podem inibir a replicação do HBV em diferentes etapas do seu ciclo replicativo infeccioso (PEI; CHEN; LU, 2014). Dentre os ISGs que aumentam sua expressão em resposta ao intérferon, está a enzima 2', 5' oligoadenilato sintetase, esta enzima ação antiviral e inibe a replicação viral ativando a ribonuclease latente (RNase L) que degrada o RNA mensageiro e em relação a sua atividade antitumoral está ligada a liberação da citocina interleucina 2 (IL-2), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que inibem a angiogênese e aumentam os níveis de linfócitos T citotóxicos e células NK (ANTONIAZZI *et al.*, 2011; HASSEL *et al.*, 1993; PLAYER *et al.*, 1998; MALATHI *et al.*, 2005).

O efeito antiviral de IFNs sobre a entrada e as etapas do ciclo de vida do vírus ainda não foi estudada no sistema de infecção *in vitro* para o HBV e suas funções antivirais contra o HBV foram analisadas principalmente em células de hepatocarcinoma humano estavelmente transfectadas com genomas de HBV capazes de replicar o vírus em ratos transgênicos. Além disso, os intérferons desempenham funções imunomoduladoras (PEI; CHEN; LU, 2014).

IFN- α INDUZ MODIFICAÇÃO EPIGENÉTICA DE MINICROMOSSOMOS DE cccDNA

O ciclo de vida do HBV depende da enzima transcriptase reversa (TR) do RNA viral que sintetiza a fita dupla parcial do DNA necessária para a sua replicação. A replicação começa com a entrada do vírus na célula hospedeira (hepatócito), tendo em vista que o mesmo possui tropismo por células hepáticas (LOPES; SCHINONI, 2011). Ao atravessar a membrana da célula, o vírus chega ao citoplasma e posteriormente no núcleo do hepatócito, onde ele perde seu envelope e modifica a fita positiva do DNA em DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) (ALVARIZ, 2006).

O cccDNA serve como modelo para a síntese da fita negativa de DNA em RNA pré-genômico (pgRNA) pela ação da enzima RNA polimerase. No citoplasma o pgRNA é encapsulado e através da transcriptase reversa inicia-se a síntese da fita positiva e negativa do DNA. Ainda no citoplasma o nucleocapsídeo contendo as fitas de DNA é envelopado e por um processo de

brotamento deixa o hepatócito para o fluido extracelular (PORTILHO, 2013).

Um ponto importante é que o cccDNA persiste e permite a recorrência da infecção pelo vírus da hepatite B em pacientes resolvidos, uma vez que esse cccDNA persiste latente no fígado de pacientes infectados e serve como molde para o início da replicação do vírus. Belloni e colaboradores estudaram o papel do IFN- α na transcrição do cccDNA do HBV através de um sistema de transfecção usando o genoma linear monomérico do vírus de comprimento completo para mostrar que o IFN- α suprime a transcrição do cccDNA do HBV (PEI; CHEN; LU, 2014). Os elementos responsivos à estimulação por interferons (ISRE) também medeiam e estimulam o recrutamento de proteínas transdutoras de sinais e ativadoras de transcrição (STATs) de cccDNA por IFN- α . Porém, estudos futuros são necessários para determinar se e como o IFN- α influencia na estabilidade do cccDNA do HBV e controlam a replicação do HBV (SUNG *et al.*, 2005). A acetilação ou metilação de proteínas epigenéticas como as histonas do HBV estão ligados ao tratamento com IFN- α , mas ainda precisa ser melhor elucidado (LIU *et al.*, 2013).

Recente estudo sobre as funções antivirais de IFN- α em cccDNA HBV de pato (DHBV) analisado em cultura celular e sua interação com células, demonstra que o IFN- α suprime a transcrição do cccDNA, a qual está associada com a redução de lisinas histona H3 acetilada 9 (H3K9) e 27 (H3K27) em cccDNA minicromossomais. O IFN- α pode induzir a deterioração acelerada do cccDNA do HBV, ainda que o metabolismo e regulação da transcrição de cccDNA de aves possa ser diferente daquela de mamíferos, o estudo sobre cccDNA de DHBV torna-se importantes para biologia do cccDNA do HBV e o mecanismo antiviral do IFN- α (GUO *et al.*, 2003; CIVITICO; LOCARNINI, 1994; PEI; CHEN; LU, 2014).

A estabilidade do cccDNA do HBV é diferente *in vivo* e *in vitro*, visto que o cccDNA hepadnaviral é deteriorado dentro de alguns dias em cultura de células, enquanto que no fígado provavelmente é significativamente mais longo. Dessa forma o mecanismo de regulação da estabilidade cccDNA vem sendo realizado num modelo *in vivo* subsequente (GUO *et al.*, 2003; CIVITICO; LOCARNINI, 1994; PEI; CHEN; LU, 2014).

Foi demonstrado também que os IFNs podem ser responsáveis pela redução de HBV contendo pgRNA e pela inibição de montagem do capsídeo do HBV. A inibição da formação do capsídeo por IFNs pode ocorrer em um ou vários passos no processo de montagem do vírion, tais como a dimerização de proteínas do núcleo, a interação entre a polimerase de pgRNA HBV, a encapsidação de polimerase-pgRNA, e a formação do capsídeo icosaédrico. Porém, não foi confirmada a influência dos IFN sobre a formação de capsídeos do HBV contendo pgRNA como descrito acima. No entanto, os IFNs podem interferir com as diferentes etapas de formação do capsídeo de HBV

através da ativação dos efetores a jusante. Sendo assim os estudos demonstram que os ISGs podem estar envolvidos na inibição da formação do nucleocapsídeo (WIELAND *et al.*, 2005; PEI; CHEN; LU, 2014).

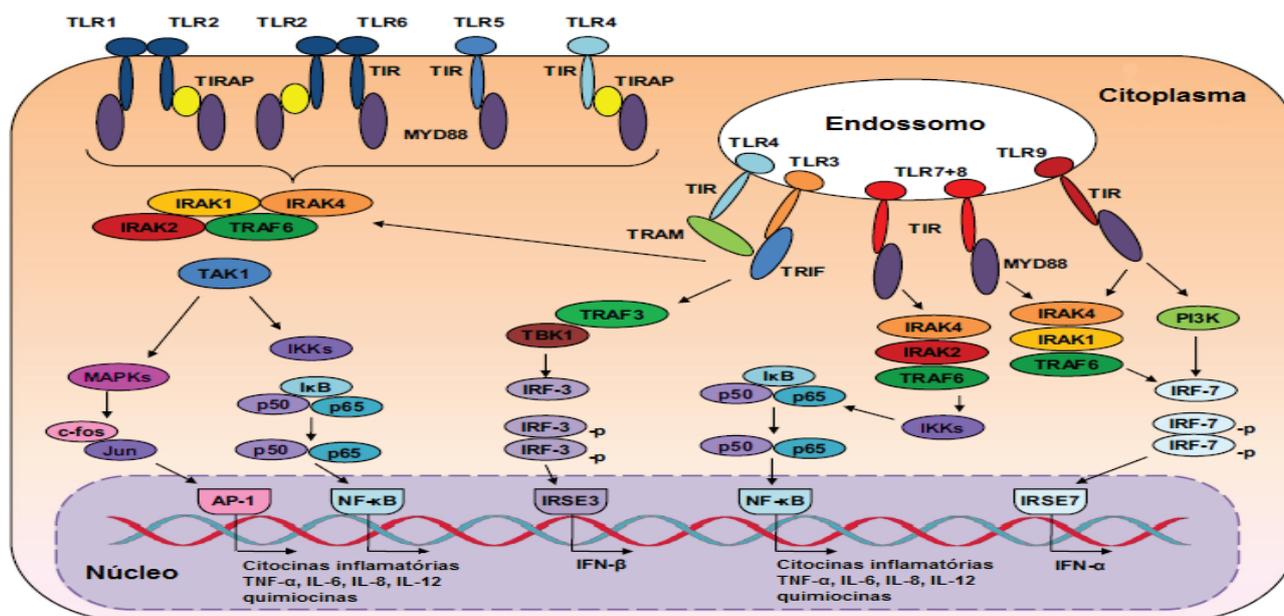
RECEPTORES TLRs INIBEM A REPLICAÇÃO DO HBV

Os interferons são sintetizados e liberados através da interação do vírus aos receptores do tipo toll (TLRs), um grupo de moléculas que desempenham um papel crucial no reconhecimento de estruturas microbianas e na geração de sinais e são expressos em receptores de células de defesas como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B. Os TLRs são caracterizados estruturalmente por um ectodomínio constituído por repetições ricas em leucina para interação com padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e uma longa calda citoplasmática contendo domínios TIR de homologia para moléculas adaptadoras e sinalizadoras. Há 11 TLRs diferentes descritos na literatura capazes de reconhecer diferentes PAMPs, padrões estes existentes ou característicos de microrganismos e ausentes em células humanas. Os TLR3, TLR7 TLR8 e TLR9 são capazes de reconhecer ácidos nucleicos como exemplo o DNA e o RNA viral, já os TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 reconhecem elementos da membrana celular, bem como algumas proteínas virais (FERRAZ *et al.*, 2011; ZHANG; LU 2015). A Figura 1 esquematiza as vias de sinalização dos TLR humanos.

A ativação da sinalização de TLR inibe a replicação de HBV e é considerada uma nova estratégia terapêutica para o tratamento de infecção crônica por HBV (ZHANG *et al.*, 2012). Os ligantes específicos para o TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 foram examinadas quanto à sua capacidade para controlar a replicação de HBV em camundongos transgênicos (ISOGAWA *et al.*, 2005). Todos os ligantes, exceto o TLR2 foram capazes de reduzir a replicação do HBV em camundongos transgênicos (PEI; CHEN; LU, 2014; LANFORD *et al.*, 2013).

Ligantes de TLR não apenas ativam a resposta imune inata, mas também estão envolvidos na modulação da resposta imunitária adaptativa. Além das respostas imune inata e adaptativa, a estimulação de TLR também modula a expressão de vários microRNAs (LI; SHI, 2013; QUINN; O'NEILL, 2011). Foi demonstrado que microRNAs podem controlar a replicação do HBV através de ligação direta ou através de mecanismos indiretos (ZHANG *et al.*, 2011; ZHANG; HOU; LU, 2013). O controle da replicação do HBV por agonista TLR pode também ser parcialmente alcançado e apresentar uma regulação em nível de microRNAs (PEI; CHEN; LU, 2014).

Figura 1: Sinalização intracelular dos receptores TLRs .



Fonte: (Adaptado de Zhang & Mengji, 2015).

Recentemente, o protótipo GS-9620, um agonista do TLR7, foi administrado em chimpanzés com infecção crônica por HBV e diminuiu eficazmente as cargas de DNA de HBV no soro e no fígado (LANFORD et al., 2013). O efeito antiviral de ligantes de TLR pode ser mediada pela ativação de sinalização dos TLR tanto em hepatócitos, células não-parenquimatosas do fígado, ou macrófagos extra-hepáticos e células dendríticas, ou pela modulação da resposta imune adaptativa (XIA et al., 2008).

A sinalização pelos receptores TLRs ativam uma série de moléculas e proteínas adaptadoras, como MYD88, TIRAP, TRIF, TRAM uma vez que essas proteínas possuem domínios de morte que se complementam com os domínios TIR intracelulares do TLRs. Esses recrutamentos de proteínas sinalizam e ativam cascatas bioquímicas que ativam fatores de transcrição (FTs) (AP-1, NF-κB, IRSE3 e IRSE7) que se encontram inativos no citoplasma, uma vez ativados são translocados para o núcleo da célula. Essa translocação permite a regulação de regiões promotoras no genoma com consequente produção de citocinas pró-inflamatórias de combate ao HBV (PEI; CHEN; LU, 2014).

As proteínas virais HBx, HBs e HBc/e assim como a enzima *pol* são capazes de modular negativamente as cascatas intracelulares ativadoras de FTs, assim com vários pontos intracelulares sem ativação e produção de uma resposta efetora e protetora contra o HBV. Esse mecanismo de escape favorece e permite o sucesso da infecção e a contínua replicação viral (ZHANG; MENGJI, 2015). A Figura 2 representa a interação da via de sinalização de TLR3 com HBV.

Frente ao conhecimento dos mecanismos moleculares e moduladores de evasão e escape do HBV, os agonistas de TLRs são uma proposta

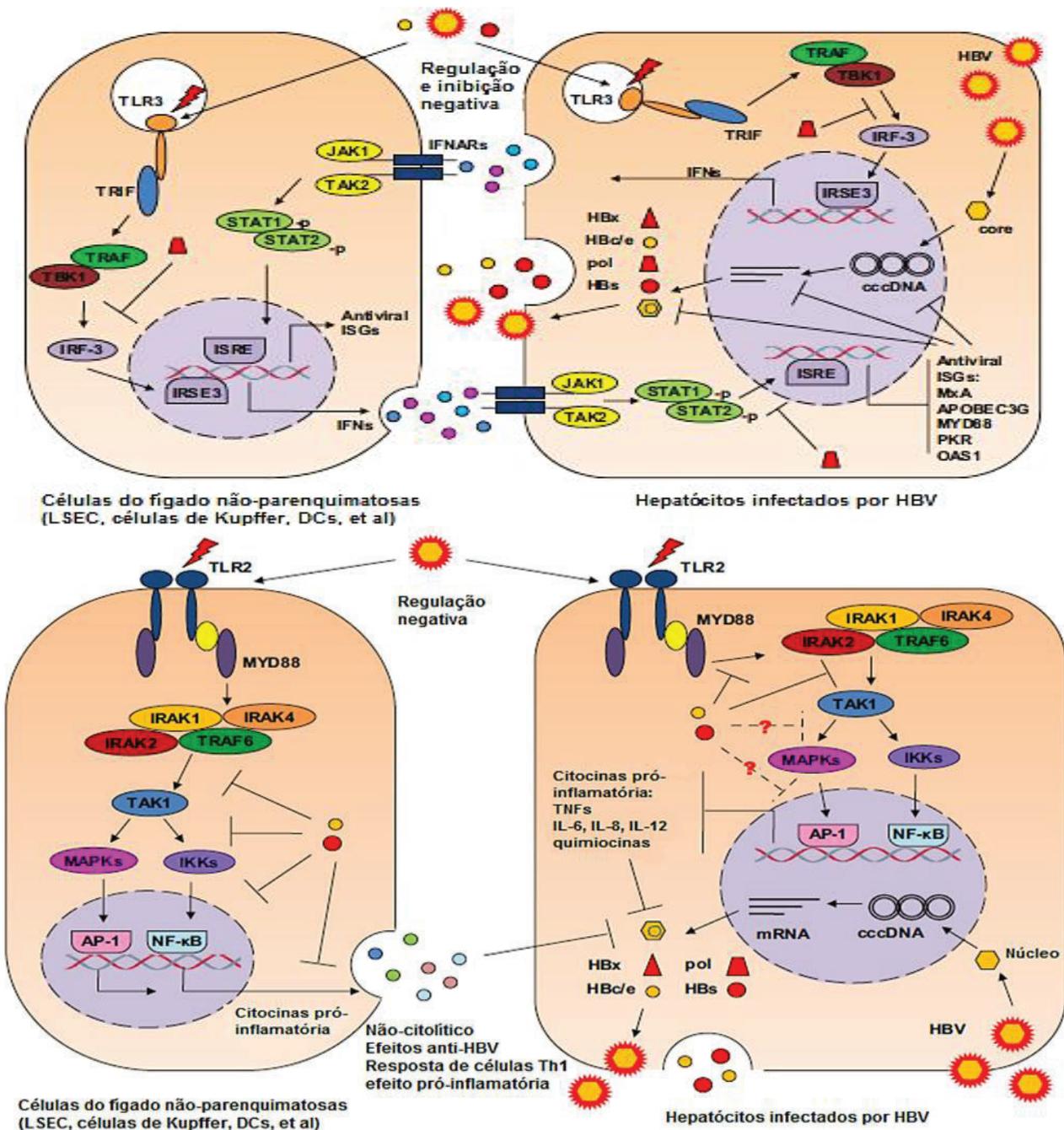
inovadora e eficaz de associação com as terapias convencionais, uma vez que os mecanismos de destruição do HBV são “ligados” com uma proposta de uma melhor resolução da doença e otimização de terapia (ZHANG; MENGJI, 2015).

MICRORNAs COMO BIOMARCADORES PARA O DIAGNÓSTICO DO HCC

A falta de eficácia no tratamento do HCC levaram a estudos clínicos com microRNAs (miR), uma classe altamente conservada de RNAs não codificadas de aproximadamente 22 nucleotídeos. Os microRNAs são capazes de regular a expressão de vários genes e possuem um importante papel em processos celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. (HUANG; HE, 2011)

MicroRNAs maduros podem interagir com regiões não codificadoras 3' (UTRs) de RNA mensageiros (mRNA) alvos para a formação de complexos RNA silenciadores induzidos (RISCs), resultando na inibição da transcrição ou na clivagem de mRNAs (KIM, 2005; YEKTA; SHIH; BARTEL, 2004; KIM; HAN; SIOMI, 2009). Recentes estudos demonstram que os microRNAs podem regular a expressão genica em nível pós-transcricional e possuem papel regulador da maquinaria epigenética (BRACONI; HUANG; PATEL, 2010; WEI, 2013). Um grande numero de microRNAs celulares podem modular a expressão genica e replicação do HBV de maneira negativa e positiva, a depender das suas funções fisiológicas. Enquanto a maioria dos microRNAs exercem um efeito inibitório na replicação do HBV, vários microRNAs, incluindo miR-1, foram relatados com atividade de estimulação da replicação viral do HBV.

Figura 2: Modulação das vias intracelulares pelas proteínas do HBV e bloqueio da estimulação via TLR2 e TLR3.



Fonte: Adaptado de Zhang & Mengji, 2015

Levando em consideração a somatória dos fatores envolvidos, a maquinaria de microRNAs parece trabalhar negativamente ante a infecção pelo HBV (WANG, 2013). A Figura 3 elucidada os pontos alvos de regulação negativos e positivos no genoma do HBV, no qual as setas indicam os microRNAs ativando e as setas com barras indicam um efeito inibitório dos microRNAs na Hepatite B crônica é um fator de risco

para o HCC. Crescentes evidências indicam que o HBV altera a expressão gênica das células hospedeiras pela supra regulação ou baixa regulação selecionadas pelos microRNAs. Connolly e colaboradores em 2008 realizaram um *screen* do perfil de microRNAs associados a infecção pelo vírus da hepatite B associados à cirrose hepática, HCC em comparação com um fígado normal, e uma elevada expressão do miR-17-92 policistron e miR-21 foram relatados em alta expressão em comparação as células hepáticas

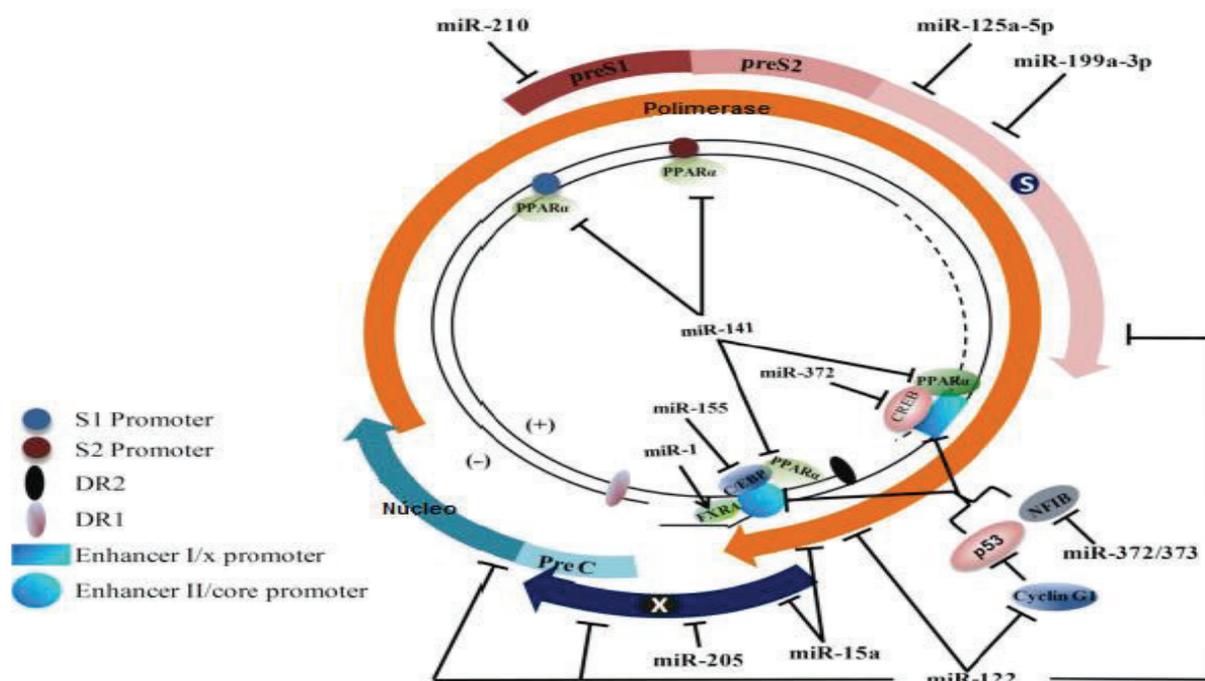
sadias. Gao e colaboradores em 2011 investigaram a mudança de expressão de 7 microRNAs relacionados a processos de neoplasias durante o estágio inicial de hepatocarcinogênese. Eles encontraram um persistente baixa expressão dos miR-145 e miR-199b e uma alta expressão do miR-224 associado com nódulos de displasia pré malignos e a progressão para o hepatocarcinoma celular. Estes estudos demonstram que os miRs estão envolvidos no HCC na proliferação celular, migração e invasão, e mudanças em suas expressões foram eventos iniciais associados com o desenvolvimento de HCC.

A frequência de microRNAs desregulados encontrados no HCC junto à imprecisão e insensibilidade de usar a corrente de alfa-fetoproteína (AFP), uma glicoproteína sintetizada pelo fígado como principal biomarcador do soro para HCC moveu pesquisas com vários participantes para determinar um painel estável de microRNAs no soro podendo ser bastante útil no diagnóstico do HCC. Essa pesquisa demonstrou um quadro de 6 microRNAs com elevada precisão no diagnóstico do HCC, sendo eles: microRNA-122, microRNA-192, microRNA-21, microRNA-223, microRNA-26 e microRNA-801 ambos distinguem com sucesso HCC saudáveis, porém vários outros microRNAs estão presentes, sendo expressos e regulados, no entanto de maneira aleatória

e sem precisão para serem relacionados com HCC (TAN; CHEN, 2014).

Outras pesquisas indicam que as concentrações séricas de microRNA-122 poderia ajudar na diferenciação de indivíduos com ou sem infecção pelo HBV, Além disso, o microRNA-122 os níveis séricos correlacionam-se com os níveis de alanina aminotransferase, expressão do DNA de HBV, e lesões no fígado. Estes resultados sugerem que microRNAs no soro podem servir como biomarcadores para o diagnóstico de infecção por HBV particularmente em pacientes com infecção pelo vírus da hepatite B oculto caracterizada pela existência de infecção do HBV sem antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) detectável no soro. Além do envolvimento no diagnóstico os microRNAs também tem um potencial promissor na terapia do HCC. Com base na modulação da atividade do microRNA novos métodos de tratamento estão a ser concebidos para regular negativamente a expressão de microRNAs que atuam como oncogenes e regular a expressão de microRNAs positivamente na supressão do tumor. No entanto muito trabalho ainda é preciso para obter um conhecimento mais abrangente e detalhado sobre esses processos. (XIE *et al.*, 2014).

Figura 3: O genoma do vírus da hepatite B (HBV) e sítios alvos de regulação pelos microRNAs celular.



Fonte : Adaptado de Kun, 2014.

4. CONCLUSÃO

Globalmente aproximadamente 240 milhões de pessoas estão cronicamente infectadas pelo HBV e aproximadamente 25% dos indivíduos crônicos eventualmente progridem para o desenvolvimento do

HCC. Várias evidências indicam desregulações pelos microRNAs como um importante papel na infecção por este vírus e na progressão para o HCC.

Os microRNAs estão envolvidos com vários aspectos da biologia do HBV, eles podem estar diretamente ou indiretamente impedindo a replicação

do vírus. A descoberta recente dos microRNAs como moduladores epigenéticos integrantes da função de genes, motiva vários pesquisadores a utilizá-los como uma abordagem terapêutica e diagnóstica antiviral. Por outro lado sobre a sua regulação no soro de doentes de hepatocarcinoma celular pode servir como um biomarcador eficiente, além disso é um supressor de tumor.

As limitações do uso de ANs como uma estratégia de terapia e a ausência de um marcador biológico adequado que indique o estágio da doença hepática relacionada ao HBV, tem direcionado várias pesquisas em todo mundo. Na busca de novas terapias efetivas contra o HBV temos os interferons associados aos NA, tendo como benefício um menor tempo de tratamento, apresentando um sinergismo terapêutico e ausência de resistência às drogas frente ao HBV. A ativação de sinalização dos receptores TLRs é considerada uma possível rota estratégica no tratamento do HBV e alguns agonistas ativadores destas rotas intracelulares já estão sendo disponibilizados para o mercado.

O progresso recente na terapia do HBV permitiu expectativas de cura tanto para o HCV quanto para outras infecções virais crônicas. Os principais desafios para uma erradicação do HBV e os novos conceitos para serem explorados tem sido discutido durante os estudos. O principal finalidade é desenvolver novos sistemas modelo para caracterizar os mecanismos moleculares do ciclo de replicação do HBV, em particular a formação e regulamentação do cccDNA, melhorar a compreensão sobre os fatores virais envolvidos na patogênese do HBV, incluindo respostas antivirais imune inata e adaptativa, revelar biomarcadores da progressão da doença para melhor identificar os doentes que estão em risco de desenvolver cirrose e HCC e definir alvos novos para a terapia antiviral afim de alcançar uma cura para o HBV.

5. REFERÊNCIAS

- [1] ALMEIDA, A.M; SILVA, D.I; GUERRA, A.A; SILVA, G.D; ACURCIO, F.A. Revisão sistemática da eficácia do interferon alfa (convencional, peguilado) e lamivudina para o tratamento da hepatite crônica B. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 25 (8): 1667-1677, ago, 2009.
- [2] ALVARIZ, R.C. Hepatite crônica pelo vírus B (HBV). *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ*. p.16-34, jan/jun, 2006.
- [3] ANTONIAZZI, A.Q; HENKES, L.E; OLIVEIRA, J.F.C; HANSEN, T.R. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.41, n.1, p.176-185, jan, 2011
- [4] BELLONI, L; ALLWEISS, L; GUERRIERI, F; PEDICONI, N; VOLZ, T; POLLICINO, T; PETERSEN, J; RAIMONDO, G; DANDRI, M; LEVRERO, M. IFN- α inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest*. p.529-537, 2012.
- [5] BEZERRA, C.A; OLIVEIRA, J.S. Comparação do interferon alfa convencional com o interferon alfa peguilado no tratamento de pacientes com hepatite C crônica. *ConScientiae Saúde*, São Paulo, v.6, n.1, p. 19-28, 2007.
- [6] BRACONI, C; HUANG, N; PATEL, T. MicroRNA-dependent regulation of DNA methyltransferase-1 and tumor suppressor gene expression by interleukin-6 in human malignant cholangiocytes. *Hepatology*. V.51, p.881-890, 2010.
- [7] BRASIL. Ministério da Saúde. Avaliação do interferon peguilado comparado com interferon recombinante e análogo de nucleosídeos no tratamento da hepatite B crônica. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos Departamento de Ciência e Tecnologia. Brasília, 2009.
- [8] BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Hepatite Viral Crônica B e Coinfecções. Serie A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, 2011.
- [9] BRASIL. Lei nº 13.021, de 8 de agosto de 2014. Dispõe sobre o exercício e a fiscalização das atividades farmacêuticas. Brasília, 8 ago. 2014
- [10] BRASIL. Boletim Epidemiológico Hepatites Virais - 2014. Secretaria de Estado da Saúde. 2014. Disponível em:<<http://www.visa.goias.gov.br/post/ver/181227/boletim-epidemiologico-das-hepatites-virais-de-2014---goias>>. Acessado em: 12 de março de 2015.
- [11] BRUCE, A.A; CARRETÉ, J.A; JIMÉNEZ, G.G. Tratamiento de La hepatitis B: nuevas drogas y oportunidades. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. Camagüey. v.13 n.5. set/out, 2009.
- [12] CIVITICO, G.M; LOCARNINI, S.A. The half-life of duck hepatitis B virus supercoiled DNA in congenitally infected primary hepatocytecultures. *Virology*, v.203, p.81-89, 1994.
- [13] COUTINHO, E.M.S. Hepatites Virais Frequência do antígeno de superfície da hepatite viral tipo B nos portadores do HIV e grávidas atendidos no Laboratório Elisa-Blot do Hospital Agostinho Neto Praia em 2006 e 2007. 47 f. Dissertação (Licenciatura em Biologia Vertente Educacional) - Instituto Superior De Educação, Cabo Verde, 2008.
- [14] CONNOLLY E, MELEGARI M, LANDGRAF P, ET AL. Elevated expression of the mir-17-92 polycistron and mir-21 in hepadnavirus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol.*; 173: 856-864, 2008.
- [15] Departamento de DST, AIDS e Hepatites Virais. Disponível em:<<http://www.aids.gov.br/pagina/hepatite-b>>. Acessado em: 30 de Abril de 2015.

- [16] FERRAZ, E.G; SILVEIRA, B.B.B; SARMENTO, V.A; SANTOS, J.N. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. RGO - Rev Gaucha Odontol., Porto Alegre, v.59, n.3, p.483-490, jul/set, 2011.
- [17] FERREIRA, M.S; BORGES, A.S. Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus B. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40, n.4, p.451-462, jul/ago, 2007.
- [18] GAO P, WONG CC, TUNG EK, ET AL. Deregulation of microrna expression occurs early and accumulates in early stages of hbv-associated multistep hepatocarcinogenesis. J Hepatol.; 54: 1177-1184, 2011.
- [19] GUO, J.T; PRYCE, M; WANG, X; BARRASA, M.I; HU, J; SEEGER, C. Conditional replication of duck hepatitis B virus in hepatomacells. J Virol, v.77, p.1885-1893, 2003.
- [20] HASSEL, B.A, ZHOU, A, SOTOMAYOR, C, et al. A dominant negative mutant of 2 5 A-dependent RNase suppresses antiproliferative and antiviral effects of interferon. EMBO J., Oxford, v. 12, p. 3297-304, Ago, 1993.
- [21] HUANG, S; HE, X. The role of microRNAs in liver cancer progression. Br J Cancer. v.104, p.235-240, 2011.
- [22] ISOGAWA, M; ROBEK, M.D; FURUICHI, Y; CHISARI, F.V. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. J Virol. v.79, p.7269-7272, 2005.
- [23] KAO, J.H; CHEN, D.S. Global control of hepatitis B virus infection. Lancet Infect. v. 2, p.395-403, 2002.
- [24] KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol. v.6, p.376-385, 2005.
- [25] KIM, V.N; HAN, J; SIOMI, M.C. Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol. v.10, p.126-139, 2009.