



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV/AIDS E HEPATITES VIRAIS
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HV

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Expressão plasmática do microRNA (miR-122) e sua correlação com
marcadores, escores hepáticos e estadiamento do grau de fibrose: potencial
como biomarcador não invasivo na hepatite C crônica**

CARLOS ANDRÉ DE SOUZA PEREIRA RODRIGUES

RIO DE JANEIRO
2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV/AIDS E HEPATITES VIRAIS
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HV

Expressão plasmática do microRNA (miR-122) circulante e sua correlação com marcadores, escores hepáticos e estadiamento do grau de fibrose: potencial como biomarcador não invasivo na hepatite C crônica

CARLOS ANDRÉ DE SOUZA PEREIRA RODRIGUES

Sob a Orientação:

Carlos Eduardo Brandão Mello.

e Co-orientação:

Luiz Claudio Pereira Ribeiro.

Dissertação submetido como requisito parcial para obtenção no Grau de Mestre em Infecção HIV/AIDS e Hepatites Virais na Área de doenças infecciosas e parasitárias.

**RIO DE JANEIRO
2026**

RR696e Rodrigues, Carlos André de Souza Pereira
Expressão sérica do microRNA (miR-122) e sua correlação
com escores hepáticas e estadiamento do grau de fibrose:
potencial como biomarcador não invasivo na hepatite C
crônica / Carlos André de Souza Pereira Rodrigues, Carlos
André de Souza Pereira Rodrigues, Carlos André de Souza
Pereira Rodrigues. -- Rio de Janeiro : UNIRIO, 2026.
104f; 22 tabs; 4 Figs ; 9 grafos

Orientador: Carlos Eduardo Brandão Mello.
Coorientador: Luiz Claudio Pereira Ribeiro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Infecção
HIV/AIDS e Hepatites Virais, 2026.

1. Hepatite C. 2. MicroRNA (miR-122). 3. Biomarcador
de Estadiamento Hepático. I. de Souza Pereira Rodrigues,
Carlos André II. André de Souza Pereira Rodrigues, Carlos
III. Mello, Carlos Eduardo Brandão, orient. IV. Ribeiro,
Luiz Claudio Pereira , coorient. V. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – UNIRIO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INFECÇÃO HIV/AIDS E HEPATITES VIRAIS
MESTRADO PROFISSIONAL – PPGHIV/HV

CARLOS ANDRÉ DE SOUZA PEREIRA RODRIGUES

Expressão plasmática do microRNA (miR-122) circulante e sua correlação com marcadores, escores hepáticos e estadiamento do grau de fibrose: potencial como biomarcador não invasivo na hepatite C crônica

Dissertação apresentada por Carlos André de Souza Pereira Rodrigues, intitulada “Expressão plasmática do microRNA (miR-122) e sua correlação com escores hepáticos e estadiamento do grau de fibrose: potencial como biomarcador não invasivo na hepatite C crônica.”, aprovada em 21/07/2026, pela banca examinadora constituída por:

Dr. Carlos Eduardo Brandão Mello – UNIRIO (orientador)

Dr. Luiz Cláudio Pereira Ribeiro – UNIRIO (coorientador)

Dra. Márcia Maria Amendola Pires – UNIRIO (membro interno)

Dra. Livia Melo Villar – FIOCRUZ (membro externo)

Dr. Patrick Menezes Lourenço – UNIRIO (suplente interno)

Dra. Maria Helena Ornellas – UERJ (suplente externo)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Selma de Souza, pelo amor incondicional e pela presença constante ao longo de toda a minha vida. Ao seu companheiro, Otávio, pelo carinho e pelo suporte de sempre. À minha esposa, Luciana Couto, pela paciência, pelo cuidado e por ter sustentado tantos momentos em que precisei estar ausente para me dedicar a esta pesquisa. Aos meus filhos, Andressa, Pedro e Andriele, razões maiores de cada esforço empreendido, a vocês, todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação só foi possível graças ao apoio, à dedicação e à generosidade de muitas pessoas que, cada uma a seu modo, contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

Ao Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), meu campo de pesquisa, onde cada etapa desta investigação ganhou forma. Agradeço à coletora Ana, pela habilidade, pelo zelo e pela humanidade com que acolheu cada participante; à Dra. Márcia Amendola Pires, pelo atendimento dedicado e cuidadoso aos pacientes, e a todos os funcionários administrativos, pelo apoio logístico essencial ao cotidiano da pesquisa.

Ao LAPIA e a todos os colegas, pela contribuição técnica e pela disponibilidade que foram determinantes para o desenvolvimento deste trabalho, em especial a Andrea, a Ignez, o Dulcino, a Mauricea e o Wescley.

Ao amigo Farmacêutico do INTO Dr. Felipe Leal, pela orientação acadêmica em estatística avançada.

Aos colegas, funcionários, pesquisadores e professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), pela cooperação e pelo espírito de colaboração científica. Agradeço de forma especial ao Prof. Dr. Fábio Santiago, Coordenador do Laboratório de Biologia Molecular, pela valiosa contribuição científica e a Profa. Dra. Maria Helena Ornellas, pelo olhar crítico e por integrar a banca examinadora desta dissertação.

Ao meu co orientador, Prof. Dr. Luiz Claudio Pereira Ribeiro, pela orientação técnica precisa, pelo rigor metodológico e pela disponibilidade permanente para guiar os caminhos mais complexos desta investigação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Eduardo Brandão Mello, Hepatologista, Livre-Docente, pela confiança depositada desde o início, pela condução segura de todo o processo e pela exigência acadêmica que sempre elevou a qualidade deste trabalho. A todos que, direta ou indiretamente, participaram desta jornada, meu sincero reconhecimento e gratidão.

RODRIGUES, Carlos André de Souza Pereira. Expressão plasmática do microRNA (miR-122) circulante e sua correlação com marcadores e escores hepáticos e estadiamento do grau de fibrose: potencial como biomarcador não invasivo na hepatite C crônica. 2026. 129 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Infecção HIV/Aids e Hepatites Virais) — Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2026.

RESUMO

A infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) é considerada uma das principais causas de doença hepática crônica. Os miRs são pequenas moléculas de RNA não codificantes, transcritas a partir do genoma, e podem acoplar-se a região não traduzida dos seus RNA mensageiros alvo. Alterações de miR-122 na infecção pelo HCV podem indicar progressão da fibrose hepática e desta forma é interessante comparar essa variação, no estadiamento de fibrose hepática, com principais escores hepáticos e verificar sua função como biomarcador. Comparar o desempenho dos níveis de expressão plasmática de miR-122 circulante com os escores de estadiamento de fibrose hepático não invasivos (APRI e FIB-4) e investigar sua aplicabilidade como biomarcador não invasivo na hepatite C crônica. Realizado um estudo observacional analítico de delineamento transversal, com coleta prospectiva de amostras biológicas em dois grupos de comparação pré-definidos: Grupo Controle e Grupo HCV, atendidos no Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), entre março e novembro de 2025 em contraste com um grupo controles-saudáveis. Fibrose hepática avaliada por métodos não invasivos de enzimas hepáticas, APRI e FIB-4. Analisadas expressão dos miR-122 através da reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR em tempo real). A expressão do miR-122 foi significativamente maior nos pacientes com infecção pelo HCV do que no grupo controle e correlações diretas estatisticamente significativas com enzimas hepáticas e escores APRI e FIB-4, e inversa com as plaquetas. Foi encontrada associação com os estágios de fibrose. Foi observado a expressão de miR-122 maiores em pacientes com infecção pelo HCV, quando comparado com o grupo controle e a sua correlação da expressão do miR-122 com os principais biomarcadores e escores hepáticos.

Palavras-chave: MicroRna, Hepatite C, biomarcadores, infecção crônica

RODRIGUES, Carlos André de Souza Pereira. Plasma expression of circulating microRNA (miR-122) and its correlation with liver markers and scores and staging of the degree of fibrosis: potential as a non-invasive biomarker in chronic hepatitis C. 2026. 129 p. Dissertation (Professional Master's in HIV/AIDS Infection and Viral Hepatitis) — Federal University of the State of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2026.

ABSTRACT

Introduction: Hepatitis C virus (HCV) infection is considered one of the main causes of chronic liver disease. miRs are small non-coding RNA molecules, transcribed from the genome, and can bind to the untranslated region of their target messenger RNAs. Alterations in miR-122 in HCV infection may indicate progression of liver fibrosis, and therefore it is interesting to compare this variation in liver staging with major liver scores and verify its function as a biomarker. To compare the performance of circulating plasma miR-122 expression levels with non-invasive liver fibrosis staging scores (APRI and FIB-4) and to investigate its applicability as a non-invasive biomarker in chronic hepatitis C. A cross-sectional observational study was conducted in chronic HCV patients, ≥ 18 years old, treated at the Gastroenterology Outpatient Clinic of the Gaffrée e Guinle University Hospital (HUGG), between March and November 2025, in contrast to a healthy control group. Liver fibrosis assessed by non-invasive methods of liver enzymes, APRI, and FIB-4. miR-122 expression analyzed by real-time polymerase chain reaction (real-time RT-PCR). miR-122 expression was significantly higher in patients with HCV infection than in the control group, with statistically significant direct correlations with liver enzymes and APRI and FIB-4 scores, and an inverse correlation with platelets. An association with fibrosis stages was found. Higher miR-122 levels were observed in patients with HCV infection than in the control group, and a correlation between miR-122 expression and the activity of hepatic markers of inflammatory process and/or hepatic necrosis was found.

Keywords: miR-122, Hepatitis C, biomarkers, chronic infection

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Características demográficas e verificação de homogeneidade entre GC e GHCV.....	80
Tabela 2	–	Fatores de risco, exposição epidemiológica e características clínicas segundo grupo de estudo, HUGG, Rio de Janeiro, 2025	82
Tabela 3	–	Análise descritiva e comparação entre GC e GHCV por variável laboratorial e molecular pelo teste de Mann-Whitney.....	83
Tabela 4	–	Correlação de Spearman entre carga viral e miR-122 no (GHCV.)	84
Tabela 5	–	Comparações múltiplas <i>post-hoc</i> de Dunn com correção de Bonferroni para a variável AST (U/L).....	85
Tabela 6	–	Comparações múltiplas <i>post-hoc</i> de Dunn com correção de Bonferroni para ALT (U/L).....	87
Tabela 7	–	Comparações múltiplas <i>post-hoc</i> de Dunn com correção de Bonferroni para plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$).....	89
Tabela 8	–	Comparações <i>post-hoc</i> de Dunn com correção de Bonferroni para o índice FIB-4.....	91
Tabela 9	–	Comparações <i>post-hoc</i> de Dunn com correção de Bonferroni para o índice APRI.....	93
Tabela 10	–	Estatística descritiva dos níveis séricos de miR-122 por subgrupo de fibrose hepática no GHCV.....	95
Tabela 11	–	Comparação dos níveis de miR-122 entre subgrupos de fibrose hepática pelo teste <i>post-hoc</i> de Dunn com correção de Bonferroni	95
Tabela 12	–	Diagnóstico dos biomarcadores por comparação clínica....	98

LISTA DE FIGURA

Figura 1 –	Agente etiológico: Vírus da hepatite C (HCV).....	2
		7
Figura 2 –	Visão ampliada da estrutura e ciclo de vida do HCV.....	3
		0
Figura 3 –	Dados epidemiológicos da Hepatite C.....	3
		4
Figura 4 –	Visão ampliada do diagnóstico da infecção pela hepatite C.....	3
		7
Figura 5 –	Visão geral estadiamento da fibrose hepática da infecção HCV	4
		6
Figura 6 –	Visão geral tratamento HC antes e após a introdução dos DAA	4
		9
Figura 7 –	Visão geral biogênese dos miRs e mec. de silenciamento gênico....	5
		3
Figura 8 –	Síntese do mecanismo de ação dos miRnas.....	5
		6
Figura 9 –	Via geral da Biogênese, vias de ação do hsa-miR-122.....	5
		9

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Distribuição quantitativa de AST no estadiamento de fibrose hepático.....	86
Gráfico 2 –	Distribuição quantitativa de ALT no estadiamento de fibrose hepático.....	88
Gráfico 3 –	Distribuição quantitativa de plaquetas no estadiamento de fibrose.....	90
Gráfico 4 –	Distribuição quantitativa de FIB-4 no estadiamento de fibrose hepático.....	92
Gráfico 5 –	Distribuição quantitativa de APRI no estadiamento de fibrose hepático.....	94
Gráfico 6 –	Distribuição quantitativa miR-122 no estadiamento de fibrose hepático.....	96
Gráfico 7 –	Correlação de Spearman.....	97
Gráfico 8 –	GC e o GHCV.....	100
Gráfico 9 –	Fibrose significativa ($\leq F1$ vs $\geq F2$).....	101
Gráfico 10 –	Fibrose avançada ($\leq F2$ vs $F3/F4$).....	102

APÊNDICE

- Apêndice A – Resumo Miqe – Rt-Qpcr Para Mir (*Handbook*-Qiagen).
- Apêndice B – Participação no Congresso XXIV Semana Brasileira do Aparelho Digestivo
- Apêndice C – Participação no Congresso XXIX Congresso Brasileiro de Hepatologia
- Apêndice D – Parecer Consubstanciado do Cep
- Apêndice E – Pop Para Extração, RT e RT-qPCR de miR (Soro/Plasma) - Qiagen

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

SIGLA	SIGNIFICADO / EXTENSO
5'UTR	5' Untranslated Region (Região 5' não traduzida)
3'UTR	3' Untranslated Region (Região 3' não traduzida)
AAT	Aspartato Aminotransferase (ver AST)
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGO2	Argonauta 2 (proteína do complexo RISC)
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APRI	<i>Aspartate Aminotransferase-to-Platelet Ratio Index</i> (Índice AST/Plaquetas)
Arca	Repositório Institucional da Fiocruz
AST	Aspartato Aminotransferase
AUC	Area Under the Curve (Área Sob a Curva ROC)
BDTD	Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações
BVS	Biblioteca Virtual em Saúde
CAEE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCR4-NOT	<i>Carbon Catabolite Repressor 4</i> – Negative on TATA (complexo deadenilase)
CCN1	<i>Cyclin C1</i> (ciclina C1)
CCNG1	<i>Cyclin G1</i> (ciclina G1)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
CTA	Centro de Tratamento e Acompanhamento
CV	Coeficiente de Variação
DAA	Antivirais de Ação Direta (Direct-Acting Antivirals)
DAA DAAs	<i>Direct-Acting</i> Antivirals (Antivirais de Ação Direta)
DCP1/2	<i>Decapping mRNA 1/2</i> (enzimas de decapeamento do mRNA)

DHCR7	7-Desidrocolesterol Redutase
DICER	<i>Endorribonuclease Dicer</i> (enzima processadora de pré-miRNA)
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8</i> (co-fator da Drosha)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
Drosha	Ribonuclease III tipo Drosha (enzima nuclear processadora de pri-miRNA)
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMC	Escola de Medicina e Cirurgia (UNIRIO)
FAPERJ	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
FIB-4	<i>Fibrosis-4 Index</i> (Índice de Fibrose-4)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GC	Grupo Controle
GHCv	Grupo Hepatite C (pacientes com infecção crônica pelo HCV)
GW182	<i>Glycine-Tryptophan Repeat Protein 182</i> (TNRC6A; componente do complexo RISC)
HBsAg	Antígeno de Superfície do Vírus da Hepatite B (<i>Hepatitis B Surface Antigen</i>)
HBV	Hepatitis B Virus (Vírus da Hepatite B)
HCC	Hepatocellular Carcinoma (Carcinoma Hepatocelular)
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> (Vírus da Hepatite C)
HCV-RNA	Ácido Ribonucleico do Vírus da Hepatite C (carga viral)
HMGCR	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase</i> (HMG-CoA Redutase)
HMGCS1	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase 1</i> (HMG-CoA Sintase 1)
HNF4α	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha</i> (Fator Nuclear Hepatocitário 4 Alfa)
HSP90	Heat Shock Protein 90 (Proteína de Choque Térmico 90)
HUGG	Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (UERJ)
IC	Intervalo de Confiança
IOC	Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz)
IQSP	Inquérito de Saúde no Estado de São Paulo
KMO	<i>Kaiser-Meyer-Olkin</i> (medida de adequação amostral para PCA)
LAPIA	Laboratório de Pesquisa Institucional Aplicada
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
LNA	<i>Locked Nucleic Acid</i> (Ácido Nucleico Bloqueado)

MANOVA	<i>Multivariate Analysis of Variance</i> (Análise de Variância Multivariada)
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2 Homolog</i> (oncoproteína reguladora de p53)
METAVIR	Sistema de Escore para Estadiamento Histológico da Fibrose Hepática
miR	MicroRNA (forma abreviada geral)
miR-103-3p	Controle Endógeno: hsa-miR-103a-3p
miR-122-5p	hsa-miR-122-5p (MicroRNA 122, fita 5p, Homo sapiens)
MIQE	<i>Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>
miRNA	MicroRNA (MicroÁcido Ribonucleico não codificante)
mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA Mensageiro)
MS	Ministério da Saúde
NBR	Norma Brasileira Regulamentada (ABNT)
NPV	<i>Negative Predictive Value</i> (Valor Preditivo Negativo)
NS5A/ NS5B	<i>Non-Structural Protein 5A / 5B</i> (Proteínas Não Estruturais do HCV)
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Quadro de Leitura Aberta)
p53	Proteína Supressora de Tumor p53 (TP53)
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PCDT	Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas
POP	Procedimento Operacional Padrão
PPGHIV/HV	Programa de Pós-Graduação em Infecção HIV/Aids e Hepatites Virais
PPV	Positive Predictive Value (Valor Preditivo Positivo)
pri-miRNA	<i>Primary MicroRNA</i> (MicroRNA Primário, produto inicial da transcrição)
pré-miRNA	<i>Precursor MicroRNA</i> (MicroRNA Precursor, após clivagem pela Drosha)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica de Operação do Receptor)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription Quantitative PCR</i>
Scopus	Base de dados bibliográfica Scopus (Elsevier)
Se	Sensibilidade
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TNRC6A	<i>Trinucleotide Repeat Containing 6A</i> (GW182; componente do RISC)
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
USP	Universidade de São Paulo
Vp	Valor Preditivo
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)
XPO5	Exportina-5 (proteína transportadora nuclear de pré-miRN)
XRN1	5'-3' Exoribonuclease 1 (enzima de degradação de mRNA)
ΔCt	Delta Ct (diferença entre Ct do gene alvo e Ct do controle endógeno)
$\Delta\Delta Ct$	Delta Delta Ct (método de quantificação relativa de expressão gênica)
η^2	Eta-quadrado (medida de tamanho de efeito para Kruskal-Wallis)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA (FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA)	23
2.1	HISTÓRICO NATURAL DA HEPATITE C	23
2.2	HCV NO BRASIL E NO MUNDO	25
2.3	AGENTE ETIOLÓGICO	26
2.3.1	Estrutura e ciclo de vida do HCV.	27
2.3.1.1	Mecanismo de entrada do HCV no hepatócito	28
2.3.1.2	Proteínas Estruturais	28
2.3.1.3	Proteínas não Estruturais	28
2.3.1.4	Dinâmica de replicação do HCV	29
2.3.1.5	Epidemiologia	31
2.4	TRANSMISSÃO DO HCV	35
2.5	DIAGNÓSTICOS DA INFECÇÃO PELO HCV	36
2.6	ESTADIAMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA	38
2.6.1	Diagnóstico da Fibrose Hepática	39
2.6.1.1	Biomarcadores séricos	39
2.6.1.2	Avaliação do estadiamento da fibrose hepática	40
2.6.1.3	Biópsia hepática	40
2.6.1.4	Metodologias não invasivas para avaliação de fibrose hepática	41
2.6.1.5	Elastografia hepática	43
2.6.1.6	Fatores extras que influenciam na rigidez hepática	44
2.7	TRATAMENTOS DA HC	47
2.7.1	Evolução do tratamento	47
2.7.2	Impacto econômico no Sistema Único de Saúde (SUS).	48
2.8	microRna	49
2.8.1	Sua Descoberta	49
2.8.2	Funções Regulatórias dos miRNs e Perspectivas Terapêuticas.	50
2.8.3	Biogênese	51
2.8.4	Mecanismo de ação	54

2.8.5	O miR-122	56
2.8.5.1	Biogênese e Mecanismo de Ação do miR-122.	57
2.8.5.2	Mecanismo de Ação Canônico: Silenciamento de Alvos Endógenos	57
2.8.5.3	Mecanismo de Ação Não Canônico: Interação com o RNA do HCV	58
2.8.6	O miR-122 - vias metabólicas e associação com doenças	59
2.8.7	O miR-122 e a Via metabólica da glicose - Diabetes Mellitus 2.	60
3	JUSTIFICATIVA	61
4	OBJETIVOS	63
4.1	OBJETIVO GERAL	63
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
5	METODOLOGIA	64
5.1	DESENHO DO ESTUDO	64
5.2	POPULAÇÃO	65
5.3	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	66
5.4	CÁLCULO AMOSTRAL	66
5.5	AMOSTRA	67
5.6	COLETA E INSTRUMENTOS DE COLETA	67
5.6.1	Aspectos éticos	69
5.6.2	Locais de Pesquisa	70
5.7	ETAPAS DO PROCESSOS DE QUANTIFICAÇÃO DE miR-122	70
5.7.1	Extração e avaliação de qualidade	70
5.7.1.1	Extração de RNA total, incluindo microRNA, a partir de soro/plasma	70
5.7.1.2	Síntese de cDNA por transcrição reversa	71
5.7.1.3	Quantificação dos miRs - RT-qPCR em tempo real	71
5.7.1.4	Normalização	71
5.7.1.5	Quadro-Resumo MIQE	75
5.7.1.6	Spike-in	75
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
6	RESULTADOS	79
6.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	79
6.2	MARCADORES HEPÁTICOS	84
6.2.1	AST	84
6.2.2	ALT	86

6.2.3	Plaquetas	88
6.3	ESCORES HEPÁTICOS	91
6.3.1	FIB-4	91
6.3.2	APRI	92
6.4	miR-122	95
6.5	MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN	97
6.6	ANÁLISE DE CURVA ROC	98
6.6.1	Comparações dos grupos em Curva ROC	99
6.6.2	Acurácia avaliada pela curva ROC	100
7	DISCUSSÃO	103
8	CONCLUSÃO	129
	REFERÊNCIAS	133
	APÊNDICE	158

1 INTRODUÇÃO

O vírus da hepatite C (HCV), identificado e caracterizado molecularmente em 1989 por Choo, Kuo e Houghton, representou marco decisivo para o desenvolvimento dos métodos diagnósticos e terapêuticos que fundamentam o presente estudo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu a Estratégia Global para eliminação das Hepatites Virais com metas até 2030, com foco em redução de incidência e mortalidade, ampliação do rastreio, diagnóstico e acesso ao tratamento antiviral.

Tais percentuais permaneciam muito aquém da meta global de 80% de cobertura de tratamento estabelecida para 2030. Segundo as estimativas mais recentes, a cobertura de tratamento do HCV manteve-se estagnada em torno de 20% das pessoas elegíveis desde 2015, e, em 2024, cerca de 11 milhões de indivíduos já diagnosticados ainda não haviam iniciado o tratamento, evidenciando a persistência das lacunas assistenciais e o distanciamento em relação às metas de eliminação previstas para 2030 (OMS, 2026).

Contudo, o progresso global até 2025 ainda não alcança os níveis necessários, especialmente em países de baixa e média renda, refletindo desafios para a eliminação do HCV (vírus da hepatite C) como problema de saúde pública (OMS, 2025).

O padrão ouro para o diagnóstico da infecção pelo HCV é a detecção e quantificação do RNA viral por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR), que permite confirmar a viremia ativa e monitorar a resposta ao tratamento (AASLD-IDSA, 2018; BRASIL, 2022).

A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) baseia-se no uso de *primers* complementares à sequência-alvo, o que permite a amplificação de regiões específicas do material genético e a detecção de pequenas quantidades de DNA (Ácido Desoxirribonucléico) (Sambrook, 2012).

O microRNA (miRNA) é uma forma de pequeno RNA (Ácido Ribonucleico) de fita simples, com 18 a 25 nucleotídeos de comprimento. Ele é transcrito a partir do DNA, em vez de ser traduzido em proteína, e regula as funções de outros genes na síntese proteica (Yu, 2024).

Moléculas de miR-122¹ (miR-122) têm sido associadas a diversas condições fisiológicas e patológicas, inclusive à infecção pelo HCV, sendo propostas como biomarcadores diagnósticos e prognósticos (Terrinoni *et al.*, 2019; Condrat *et al.*, 2020). O miR-122 é altamente liberado no fígado humano e, por isso, o mais descrito na literatura em estudos sobre a infecção do HCV, por estar, representando 70% da população total de miR em fígado adulto (Lima, 2022).

Ao contrário da maioria dos miRNAs, que reprimem seus alvos mediante ligação à região 3' não traduzida (3'-UTR) dos RNAs mensageiros, o miR-122 interage com dois sítios adjacentes localizados na região 5'-UTR do RNA genômico do HCV, promovendo a amplificação da replicação viral (Jopling *et al.*, 2005; Pedersen *et al.*, 2007).

Esse cenário motivou a realização do presente estudo em serviço de referência no município do Rio de Janeiro, com vistas a avaliar o potencial do miR-122 circulante como método não invasivo para o estadiamento da fibrose hepática, em comparação aos índices clínicos atualmente disponíveis, tais como, APRI (Índice de Relação AST/Plaquetas) e FIB-4 (Índice de Fibrose-4), na expectativa de identificar um biomarcador de maior especificidade e sensibilidade para a substituição da biópsia hepática.

Para isso, o presente estudo parte da hipótese de que os níveis de expressão plasmático do miR-122 se correlacionam com o grau de fibrose hepática avaliado por escores não invasivos APRI e o FIB-4 e, esses miRs diferem entre pacientes com hepatite C crônica e indivíduos sem doença hepática (saudáveis), configurando-se como potencial biomarcador de estadiamento de fibrose hepática.

¹Prefixo de três letras = espécie (*hsa*, *mmu*, *rno*), miR = miRNA maduro; mir (minúsculo) = gene ou, precursor, Sufixo -5p/-3p = braço do precursor processado, Número = ordem de descoberta no repositório. O uso de miR-122 sem prefixo de espécie é aceito apenas em contexto de revisão de literatura comparativa entre espécies ou em títulos e resumos onde a espécie já está estabelecida pelo contexto. O guideline MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) estabelece que toda entidade molecular quantificada por RT-qPCR deve ser identificada com nomenclatura inequívoca e rastreável na seção de Métodos e em todas as tabelas de resultados (Bustin, 2009).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HISTÓRIA NATURAL DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA HEPATITE C

Em 1974, Alter e colaboradores demonstraram que parcela significativa dos casos de hepatite pós-transfusional não poderia ser atribuída ao vírus da hepatite A (HAV) nem ao vírus da hepatite B (HBV), caracterizando uma entidade etiológicamente distinta denominada hepatite não-A, não-B (NANBH) (Alter *et al.*, 1975).

Somente em 1989, Choo *et al.* clonaram e sequenciaram o genoma do agente etiológico, identificando-o como vírus de RNA de fita simples pertencente à família Flaviviridae, ao qual foi atribuída a denominação de vírus da hepatite C .

Define-se a infecção crônica quando o HCV-RNA (PCR para Hepatite C) permanece detectável no sangue por mais de seis meses.

As aminotransferases plasmáticas (AST, ALT) podem estar elevadas, normais ou flutuantes, não constituindo, por si só, marcador confiável de atividade da doença

A infecção pelo HCV é uma das causas mais importantes de cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC) em todo o mundo e, também, de transplante de fígado na população adulta no mundo (Brasil, 2021).

A história natural da hepatite C (HCV) é marcada por evolução silenciosa e crônica, onde aproximadamente 70% a 85% dos casos agudos evoluem para infecção crônica, com alto risco de cirrose (15-30% em 20 anos) e carcinoma hepatocelular (Martinello *et al.*, 2023).

A hepatite C crônica caracteriza-se, na maioria dos casos, por evolução assintomática por décadas, o que dificulta o diagnóstico precoce e favorece a progressão silenciosa da fibrose hepática (Martinello *et al.*, 2023), as manifestações clínicas iniciais são inespecíficas e frequentemente negligenciadas pelo paciente.

As aminotransferases plasmáticas podem estar elevadas ou não, não constituindo, por si só, marcador confiável de atividade da doença nem de estadiamento histológico. Manifestações extra-hepáticas associadas à infecção crônica pelo HCV (glomerulonefrite e manifestações linfoproliferativas de células B, etc) também podem ocorrer e agravar o prognóstico clínico (Asrani *et al.*, 2019).

A progressão da hepatite C para cirrose resulta do acúmulo gradual de fibrose hepática, processo mediado pela ativação persistente das células estreladas

hepáticas em resposta à agressão viral crônica, com deposição de colágeno no espaço de Disse e distorção progressiva da arquitetura vascular lobular (Ginès *et al.*, 2021).

Pode ser classificada em duas fases de distintas implicações prognósticas:

Fase compensada: Caracterizada pela ausência de complicações clínicas e sobrevida mediana superior a doze anos, Entre dez e vinte por cento dos pacientes com cirrose compensada evoluem para a fase descompensada em um período de cinco anos (Asrani *et al.*, 2019).

Fase descompensada, definida pelo surgimento de pelo menos uma complicação relacionada à hipertensão portal ou à insuficiência hepática, com sobrevida mediana que se reduz drasticamente para dois a quatro anos (Ginès *et al.*, 2021).

A hipertensão portal, definida pelo gradiente de pressão venosa hepática (GPVH) superior a 5 mmHg e clinicamente significativa acima de 10 mmHg, é o principal mecanismo fisiopatológico das complicações da cirrose descompensada (Ginès *et al.*, 2021).

A ascite é a complicação mais frequente e, em geral, a primeira a se manifestar, acometendo cerca de cinquenta por cento dos pacientes com cirrose compensada ao longo de dez anos de seguimento (Ginès *et al.*, 2021).

A hemorragia digestiva alta por ruptura de varizes gastroesofágicas, resultante do desenvolvimento de circulação colateral de alto fluxo em resposta ao aumento da resistência intra-hepática, representa complicação de elevada mortalidade, estimada entre quinze e vinte por cento por episódio (Asrani *et al.*, 2019).

A encefalopatia hepática, é o acúmulo de substâncias neurotóxicas, em razão da redução da capacidade de depuração hepática e do desvio portossistêmico, pode manifestar-se de forma episódica ou persistente, com repercussão significativa sobre a qualidade de vida e a capacidade funcional do paciente (Ginès *et al.*, 2021).

Complicações adicionais incluem a peritonite bacteriana espontânea (PBE), a síndrome hepatorenal (SHR) e a síndrome hepatopulmonar (SHP), todas expressões do estado circulatório hiperdinâmico e da disfunção imune sistêmica que caracterizam os estágios avançados da doença (Asrani *et al.*, 2019).

O carcinoma hepatocelular (CHC) representa a principal complicação oncológica da cirrose pelo HCV. A incidência anual de CHC em pacientes com cirrose

por HCV varia entre 1,4% e 6,9%, justificando a recomendação de vigilância semestral por ultrassonografia abdominal (Brasil, 2024).

A cirrose descompensada decorrente da infecção crônica pelo HCV constitui, ainda, a principal indicação de transplante hepático em adultos em diversas regiões do mundo (Asrani *et al.*, 2019).

Essa variabilidade se expressa na diferença do estadiamento fibrótico observada, mesmo entre pacientes com perfis epidemiológicos semelhantes. A compreensão da progressão é fundamental para o adequado manejo clínico e para a definição de estratégias terapêuticas (OMS, 2024)

2.2 A INFECÇÃO PELO HCV NO BRASIL E NO MUNDO

No Brasil, a preocupação com as hepatites virais como um problema de saúde pública intensificou-se a partir da década de 1980. Em 1996, as hepatites virais foram incorporadas ao rol de doenças de notificação compulsória do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), medida que possibilitou o monitoramento sistemático dos casos e subsidiou a elaboração dos boletins epidemiológicos nacionais (BRASIL, 2022).

Essa medida possibilitou às autoridades sanitárias estimar, com maior precisão, a amplitude do agravo e seus padrões epidemiológicos, favorecendo o desenvolvimento de políticas públicas mais robustas de vigilância, prevenção e controle (BRASIL, 2022)

Estimativas de 2017 indicavam que mais de 500 milhões de pessoas em todo o mundo conviviam com infecção crônica pelas hepatites B e C (Chaves *et al.*, 2017).

Entre 2019 e 2022, o percentual de diagnósticos elevou-se de 21% para 36%, e a cobertura de tratamento aumentou de 13% para 20%, progresso positivo, mas ainda insuficiente para o cumprimento das metas de eliminação (OMS, 2024).

Cerca de 20% (12,5 milhões) receberam tratamento curativo até o final desse ano (OMS, 2025). No mesmo período, registraram-se 2,2 milhões de novas infecções por hepatites virais, em comparação com 2,5 milhões em 2019, incluindo quase 1 milhão de novas infecções pelo HCV (OMS, 2024).

Dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde estimam, em 2024, aproximadamente 240 milhões de pessoas vivendo com infecção crônica pelo HBV e

47 milhões pelo HCV, totalizando cerca de 287 milhões de indivíduos acometidos pelas hepatites virais crônicas B e C (OMS, 2026).

Apesar desses avanços, os resultados globais permanecem aquém das metas estabelecidas pela OMS para 2030, que preveem o tratamento de 80% das pessoas com diagnóstico confirmado de hepatite C (OMS, 2021).

2.3 AGENTE ETIOLÓGICO

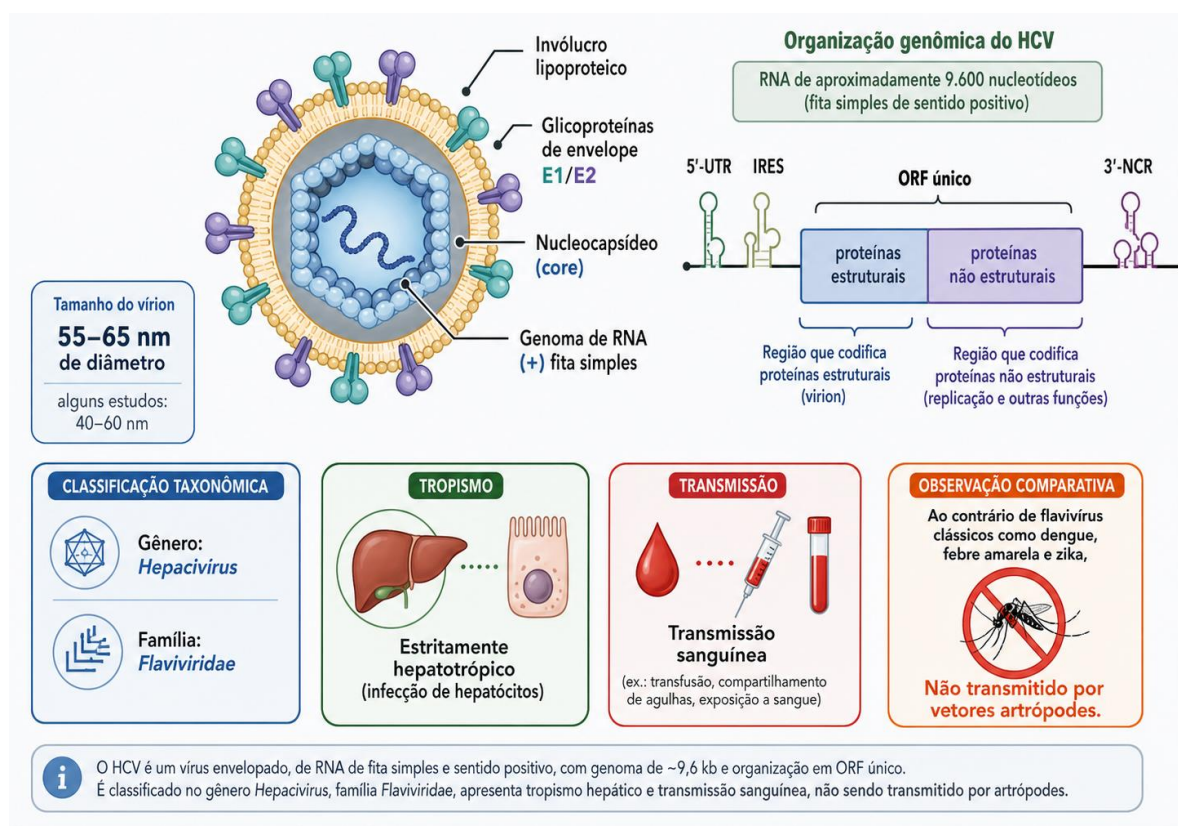
O HCV possui genoma constituído por RNA, de fita simples e polaridade positiva, com aproximadamente 9.600 nucleotídeos. Sua organização genômica compreende uma região 5' não traduzida (5'-UTR), que contém um sítio interno de entrada do ribossomo (IRES), um único quadro de leitura aberto que codifica proteínas estruturais e não estruturais, e uma região 3' não codificante (3'-NCR) (Hoofnagle, 2002), conforme figura 1.

Os vírions do HCV medem entre 55 e 65 nm de diâmetro (alguns estudos relatam valores entre 40 e 60 nm), são revestidos por um invólucro lipoproteico e pertencem ao gênero *Hepacivirus*, família *Flaviviridae* (GHANY *et al.*, 2023).

Ao contrário dos membros clássicos do gênero *Flavivirus*, como os vírus da dengue, da febre amarela e do Zika, transmitidos obrigatoriamente por vetores artrópodes, o HCV, classificado no gênero *Hepacivirus* da família *Flaviviridae*, não possui vetor invertebrado conhecido, sendo sua transmissão estritamente parenteral e, em menor escala, sexual (King *et al.*, 2017; ICTV, 2024).

A transmissão sexual, embora de menor eficiência comparada à via parenteral, ganhou relevância epidemiológica crescente, em especial entre homens que fazem sexo com homens (HSH), população na qual a incidência de HCV é substancialmente superior à da população geral (Platt *et al.*, 2020).

Figura 1: Agente etiológico: Vírus da hepatite C (HCV)



Fonte: Adaptado pelo autor de GHANY *et al.*, 2023

2.3.1 Estrutura e ciclo de vida do HCV.

A estrutura do HCV e seu ciclo replicativo no hepatócito são apresentados de forma integrada na Figura 2, que ilustra esquematicamente as etapas sequenciais do processo: desde o mecanismo de entrada celular, passando pela tradução e processamento proteolítico da poliproteína viral, pela atuação coordenada das proteínas estruturais e não estruturais, até a replicação do genoma, a montagem e a liberação de novos vírions.

2.3.1.1 Mecanismo de entrada do HCV no hepatócito

A entrada do HCV no hepatócito é um processo de múltiplas etapas iniciado pela ligação do vírion aos receptores de superfície celular CD81, LDLR e SR-BI, constituindo a etapa inicial de reconhecimento celular (Pileri, 1998; Agnello, 1999; Scarselli, 2002).

Em etapas subsequentes, claudina-1 e ocludina atuam como co-receptores de junção estreita, completando a sequência de ligação que precede a internalização viral (Fletcher *et al.*, 2016).

A endocitose mediada por clatrina promove a internalização do vírion em vesícula endossomal, cuja acidificação induz mudança conformacional nas glicoproteínas de envelope E1/E2 (Dubuisson, 2002; Fletcher *et al.*, 2016).

A queda de pH intraluminal desencadeia a fusão das membranas viral e endossomal mediada por E1/E2, culminando na liberação do RNA viral de polaridade positiva no citoplasma do hepatócito (Dubuisson, 2002; Fletcher *et al.*, 2016; Ketelaar *et al.*, 2021).

2.3.1.2 Proteínas estruturais

O Core forma o nucleocapsídeo viral e, após processamento proteolítico, migra às gotículas lipídicas por meio do domínio hidrofóbico D2, contribuindo para o acúmulo lipídico intracelular e a esteatose hepática observada na infecção crônica (Roingeard, 2012; Awadh *et al.*, 2023).

As glicoproteínas E1 e E2 integram o envelope viral e são indispensáveis para a fusão de membranas durante a entrada celular (Dubuisson, 2002; Fletcher *et al.*, 2016).

A proteína p7, classificada como viroporina, forma canais de cátions nas membranas do retículo endoplasmático, sendo essencial para a infecção produtiva *in vivo* (Sakai *et al.*, 2003).

2.3.1.3 Proteínas não estruturais

As proteínas não estruturais NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A e NS5B são geradas pela clivagem co- e pós-traducional da poliproteína precursora por peptidases do hospedeiro e pelas proteases virais NS2 e NS3/4A (Pallaoro *et al.*, 2001; Lamarre *et al.*, 2003; Ketelaar *et al.*, 2021).

A NS3/4A exerce dupla atividade enzimática, serino protease e helicase/NTPase, constituindo alvo prioritário para inibidores de protease (Lamarre *et al.*, 2003).

A NS4B reorganiza membranas intracelulares, formando a membranous web, plataforma indispensável para o complexo de replicação viral (Egger *et al.*, 2002). A NS5A regula a replicação do RNA viral e a montagem de partículas virais (Masaki *et al.*, 2008).

A NS5B, RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), catalisa a síntese de novas cópias genômicas e é igualmente alvo relevante para intervenção antiviral (Bressanelli *et al.*, 2002; Riva *et al.*, 2021).

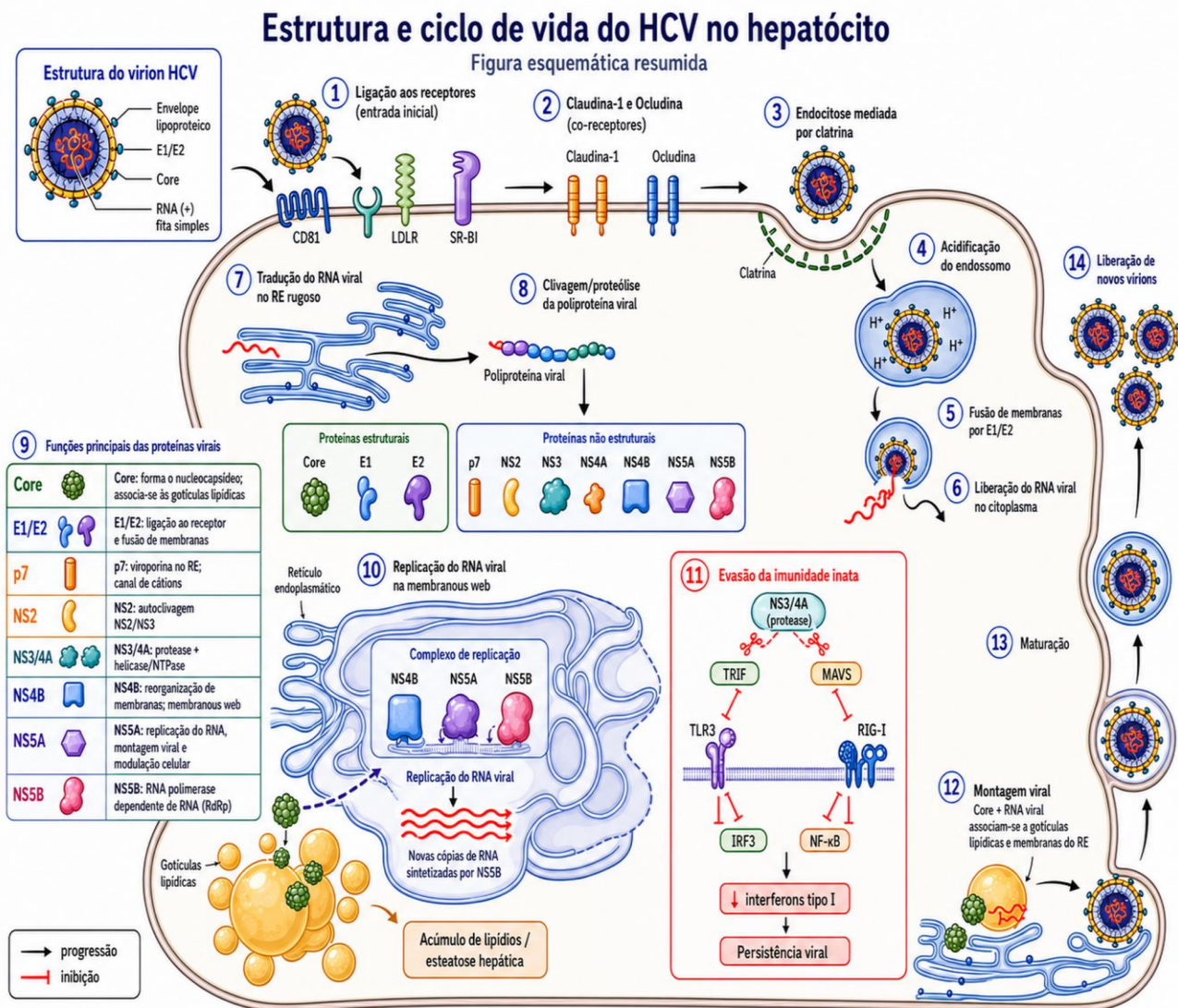
Adicionalmente, a NS3/4A cliva as proteínas adaptadoras TRIF e MAVS, comprometendo as vias TLR3 e RIG-I, inibindo IRF3 e NF- κ B, reduzindo a produção de interferons do tipo I e favorecendo a persistência viral (Li *et al.*, 2005a; Li *et al.*, 2005b; Ferreón *et al.*, 2005).

2.3.1.4 Dinâmica de replicação do HCV.

Após a liberação do RNA viral no citoplasma, os ribossomos do retículo endoplasmático rugoso traduzem o genoma de polaridade positiva, gerando a poliproteína precursora única de aproximadamente 3.000 aminoácidos codificada pelo ORF do HCV (Ketelaar *et al.*, 2021; Riva *et al.*, 2021).

A replicação do RNA viral ocorre na membranous web, pelo complexo NS4B–NS5A–NS5B, com síntese de novas cópias genômicas catalisada pela NS5B (RdRp) (Egger *et al.*, 2002; Bressanelli *et al.*, 2002; Riva *et al.*, 2021).

Figura 2 : Visão ampliada da estrutura e ciclo de vida do HCV



Fonte: adaptado pelo autor de Awadh *et al.*, 2023) Nota: (1) Ligação do vírion aos receptores CD81, LDLR e SR-BI. (2) Participação de claudina-1 e ocludina como co-receptores. (3) Endocitose mediada por clatrina. (4) Acidificação do endossomo com mudança conformacional em E1/E2. (5) Fusão membranar mediada por E1/E2. (6) Liberação do RNA viral no citoplasma. (7) Tradução pelo RE rugoso, geração da poliproteína (~3.000 aa). (8) Clivagem proteolítica, geração das ptn estruturais (Core, E1, E2, p7) e não estruturais (NS2–NS5B). (9) Funções específicas das proteínas virais: Core → nucleocapsídeo e gotículas lipídicas; p7 → canal de cátions; NS3/4A → protease/helicase; NS4B → membranous web; NS5A → replicação e montagem; NS5B → RdRp. (10) Replicação do RNA viral na membranos web pelo complexo NS4B–NS5A–NS5B. (11) Evasão da imunidade inata: NS3/4A cliva TRIF e MAVS → inibe IRF3/NF-κB → reduz IFN-I → persistência viral. (12) Montagem viral: associação de Core, RNA replicado e envelope nas membranas do retículo endoplasmático. (13) Maturação das partículas virais. (14) Liberação dos novos vírions por exocitose (~10¹² partículas/dia). Setas contínuas indicam progressão do ciclo; setas vermelhas indicam inibição. Awadh *et al.*, 2023)

A montagem viral envolve a associação do Core ao RNA genômico replicado e às gotículas lipídicas, enquanto E1/E2 integram o envelope nas membranas do

retículo endoplasmático, formando partículas virais imaturas (Roingeard, 2012; Masaki *et al.*, 2008).

As partículas imaturas maturam em associação com lipoproteínas e membranas do retículo endoplasmático, adquirindo infecciosidade plena, e são liberadas por exocitose, completando o ciclo replicativo com produção estimada de aproximadamente 10^{12} partículas virais por dia no hospedeiro infectado (Dahari *et al.*, 2007).

A replicação do HCV é caracterizada por elevada dinâmica viral, com meia-vida estimada em aproximadamente 2 a 3 horas e produção e depuração diárias de cerca de 10^{12} vírions no hospedeiro infectado (Dahari *et al.*, 2007).

2.3.1.5 Epidemiologia

O HCV apresenta sete genótipos (1 a 7), o CDC confirma a identificação de 7 genótipos e 67 subtipos do HCV (CDC, 2025).

Campiotto *et al.* (2005), em estudo de referência sobre a distribuição genotípica no Brasil, identificaram predominância do genótipo 1 (64,9%), seguido do genótipo 3 (30,2%), genótipo 2 (4,6%), genótipo 4 (0,2%) e genótipo 5 (0,1%). Historicamente, o genótipo viral era determinante para a escolha do esquema terapêutico e a estimativa de resposta ao tratamento.

No entanto, com a incorporação dos esquemas pangenotípicos ao SUS a partir de 2018, a genotipagem deixou de ser obrigatória como critério para início do tratamento (BRASIL, PCDT, 2018).

O panorama epidemiológico da hepatite C, caracterizado por subdiagnóstico, mortalidade e acesso ainda limitado ao tratamento, evidencia a urgência de biomarcadores não invasivos capazes de qualificar o estadiamento da doença e ampliar a cobertura diagnóstica no âmbito do SUS, contexto no qual se insere o presente estudo (Figura 3).

De acordo com o relatório global de hepatite de 2024 da Organização Mundial da Saúde (OMS), somente 36% das pessoas infectadas com HCV no mundo foram diagnosticadas e 20% receberam tratamento curativo (OMS, 2024).

Segundo o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais (Brasil, 2022), o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), no período de 2000 a 2021

confirmou 718.651 casos de hepatites virais no Brasil , sendo que desse total, 342.328 (41,5%) são de hepatite pelo HCV (Brasil, 2025).

Com base nos dados do Sistema de Informações de Mortalidade (SIM), foram registrados pelo menos 72.242 óbitos relacionados à hepatite C (como causa básica ou associada) entre 2000 e 2024, confirmando a hepatite C como a principal causa de morte entre as hepatites virais no Brasil (BRASIL, 2025).

Os boletins mais recentes apontam tendência de redução da mortalidade associada ao aumento da cobertura pelos antivirais de ação direta (BRASIL, 2025)

A taxa de detecção de casos confirmados de hepatite C, após o salto metodológico de 2015, o Brasil registrou 19.343 casos de hepatite C, correspondendo a aproximadamente 9,0/100 mil habitantes (BRASIL, 2025).

O cenário epidemiológico da hepatite C no Brasil é heterogêneo, com variações nas taxas de detecção por região geográfica, faixa etária e segmentos populacionais específicos (BRASIL, 2023).

Entre 2000 e 2023, foram confirmados 318.916 casos de hepatite C no país (BRASIL, 2024). Entre 2000 e 2023, foram confirmados 318.916 casos de hepatite C no Brasil (BRASIL, 2024).

Desde a incorporação dos Antivirais de Ação Direta (DAA) ao Sistema Único de Saúde (SUS), em 2015, cerca de 150 mil pessoas haviam sido diagnosticadas, tratadas e curadas da hepatite C no Brasil até 2022 (BRASIL, 2023).

A meta global da OMS para eliminação das hepatites estabelece que 80% dos diagnosticados recebam tratamento. No Brasil, a incorporação dos Antivirais de Ação Direta (DAA) ao SUS a partir de 2015 ampliou progressivamente o acesso ao tratamento da hepatite C, com taxas de cura superiores a 95%, conforme preconizado pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções (BRASIL, 2018; BRASIL, 2023).

O Plano Nacional para Eliminação da Hepatite C anunciado em 2017 previa tratar 657 mil pessoas, número baseado em modelo matemático com dados até 2016. Já a estimativa mais recente do Ministério da Saúde indica que aproximadamente 520 mil pessoas ainda necessitam de diagnóstico e tratamento (BRASIL, 2023).

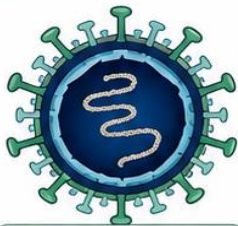
Os esquemas pangenotípicos atualmente disponibilizados pelo SUS para o tratamento de primeira linha da hepatite C crônica, a partir da Nota Técnica nº 5/2025, todos os esquemas de antivirais de ação direta (DAA) disponíveis passaram a ser

considerados pangenotípicos, tornando dispensável a genotipagem do HCV como critério para início do tratamento e definindo a escolha do esquema com base no escore APRI e, quando pertinente, na Classificação de Child-Pugh (BRASIL, 2018; BRASIL, 2025).

Tais esquemas apresentam taxas de resposta virológica sustentada superiores a 95% na maioria dos casos, configurando terapias de elevada eficácia e boa tolerabilidade (BRASIL, 2018, 2025).

EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE C (HCV)

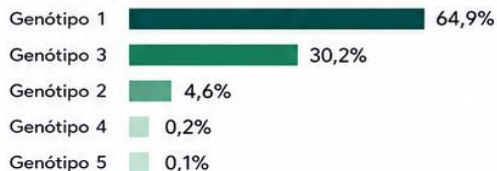
1 GENÓTIPOS DO HCV



7 genótipos
e 67 subtipos
(CDC, 2025)

O HCV apresenta 7 genótipos
(1 a 7) e 67 subtipos
(CDC, 2025).

Distribuição genotípica no Brasil
(Campiotto et al., 2005)



Historicamente o genótipo
guiava o tratamento.



Com os esquemas
pangenotípicos no SUS
a partir de 2018, a
genotipagem deixou de
ser obrigatória para início
do tratamento.

2 PANORAMA GLOBAL (OMS, 2024)



das pessoas infectadas
com HCV no mundo
foram diagnosticadas

das pessoas infectadas
com HCV receberam
tratamento curativo



O cenário global evidencia
subdiagnóstico, mortalidade
e acesso ainda limitado
ao tratamento.

3 PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO NO BRASIL



Casos confirmados
(SINAN)
2000 a 2021

718.651
casos de hepatites
virais no Brasil



Hepatite C
(SINAN)
2000 a 2021

342.328
casos de hepatite C
(41,5%)



Óbitos relacionados
à hepatite C (SIM)
2000 a 2024

72.242
óbitos



Variações regionais
e populacionais

Cenário heterogêneo
por região geográfica,
faixa etária e
segmentos
populacionais.



4 DIAGNÓSTICO, TRATAMENTO E META DE ELIMINAÇÃO



Diagnóstico, tratamento
e cura no SUS

Desde a incorporação dos
DAA ao SUS a partir de
2015, cerca de

150 mil
pessoas haviam sido
diagnosticadas, tratadas
e curadas até 2022.*

*Dado acumulado até 2022.



Casos confirmados
de hepatite C
no Brasil

Entre 2000 e 2023

318.916
casos confirmados



Meta global da OMS

80% dos diagnosticados
recebendo tratamento
até 2030.



Plano Nacional para
Eliminação da Hepatite C

Anunciado em 2017,
previa tratar

657 mil
pessoas.



Estimativa mais recente

≈ **520 mil**
pessoas ainda necessitando
de diagnóstico e
tratamento.

5 TRATAMENTO ATUAL NO SUS



Sofosbuvir/Velpatasvir

Pangenotípico

1 comprimido/dia



Glecaprevir/Pibrentasvir

Pangenotípico

3 comprimidos/dia



Sofosbuvir/Daclatasvir

Para situações
específicas



Taxas de resposta virológica
sustentada (RVS) > 95%
na maioria dos casos.
(BRASIL, PCDT, 2018; BRASIL, 2025)

6 MENSAGEM CENTRAL



O panorama epidemiológico da hepatite C, caracterizado por subdiagnóstico, mortalidade e acesso ainda limitado ao tratamento, evidencia a urgência de biomarcadores não invasivos capazes de qualificar o estadiamento da doença e ampliar a cobertura diagnóstica no SUS, contexto no qual se insere o presente estudo.



Fontes resumidas: OMS, 2024; CDC, 2025; Campiotto et al., 2005; Brasil, 2022, 2023, 2024, 2025; PCDT Hepatite C, 2018.

Fonte: Adaptação do autor (2025)

Em maio de 2025, a Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente (SVSA) lançou o *Guia para a Eliminação das Hepatites Virais no Brasil até 2030*, reforçando

o compromisso institucional com a eliminação das hepatites virais como problema de saúde pública. O documento visa orientar a implantação de ações integradas de prevenção, diagnóstico, tratamento e vigilância em todos os níveis do SUS, com atenção às diversidades regionais e às especificidades dos territórios (Brasil, 2025).

2.4 TRANSMISSÃO DO HCV

A transmissão do HCV ocorre predominantemente por via parenteral, mediante exposição a sangue ou hemoderivados contaminados (Spearman *et al.*, 2019).

As principais vias incluem: uso compartilhado de equipamentos para drogas ilícitas injetáveis; procedimentos médicos, odontológicos ou de hemodiálise sem adequado controle de biossegurança; uso de materiais perfurocortantes contaminados, como instrumentos de tatuagem, piercing, manicure e pedicure, e lâminas de barbear (Martinello *et al.*, 2024).

A transmissão sexual é possível, embora de menor eficiência, sendo mais frequente em contextos de práticas de alto risco (OMS, 2023)

A transmissão do HCV pelo leite materno não está documentada, e a OMS não contraindica o aleitamento materno em mulheres com hepatite C (OMS, 2024). O contato casual (como beijos, abraços ou compartilhamento de utensílios e alimentos) não constitui via de transmissão.

A transmissão vertical do HCV, de mãe para filho, ocorre predominantemente em gestantes virêmicas, sendo negligenciável nas mães anti-HCV positivas sem viremia detectável. (Benova *et al.*, 2014).

Antes da década de 1990, os bancos de sangue não realizavam triagem para o anti-HCV, o que torna indivíduos que receberam transfusões sanguíneas, hemoderivados ou imunoglobulinas anti-D no período gestacional durante esse intervalo, populações de alto risco para infecção pelo HCV (Spearman *et al.*, 2019). As diretrizes nacionais recomendam a busca ativa e testagem desses indivíduos (BRASIL, 2022).

No Brasil, a triagem sorológica obrigatória para o anti-HCV nos bancos de sangue, implementada no início da década de 1990, resultou em redução expressiva da transmissão transfusional do HCV, conforme documentado nos boletins epidemiológicos nacionais (Brasil, 2024).

2.5 DIAGNÓSTICOS DA INFECÇÃO PELO HCV.

A evolução histórica do diagnóstico da infecção pela hepatite C, da identificação molecular do vírus à implementação sequencial de imunoenaios de geração crescente e testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) que reflete o progressivo aprimoramento da sensibilidade diagnóstica, está sintetizada na Figura 4.

Estudos prospectivos realizados nos Estados Unidos na década de 1970 demonstraram que a hepatite pós-transfusional ocorria em 5 a 12% dos receptores de sangue de doadores voluntários, sendo que aproximadamente 90% desses casos correspondiam à hepatite não-A, não-B (AACH *et al.*, 1981).

A identificação molecular do HCV em 1989, viabilizou o desenvolvimento de testes sorológicos específicos para detecção do anti-HCV (Choo *et al.*, 1989; Kuo *et al.*, 1989), transformando radicalmente a abordagem diagnóstica da doença.

Os imunoenaios enzimáticos (EIA) de primeira geração foram desenvolvidos em 1989/1990 e implementados como triagem obrigatória de doadores de sangue nos Estados Unidos a partir de 1990 (ALTER *et al.*, 1989).

Contudo, esses testes apresentavam janela imunológica de aproximadamente 16 semanas, período em que a infecção está presente, mas os anticorpos ainda não são detectáveis, mantendo um risco residual de transmissão transfusional (BRASIL, 2018).

Na década de 1990, os EIAs de segunda geração incorporaram epítomos adicionais derivados do *core* e da NS3, e os de terceira geração adicionaram antígenos das regiões NS4 e NS5, ampliando a sensibilidade diagnóstica e reduzindo o número de resultados falso-negativos (Alter *et al.*, 1992).

A introdução dos testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAT) para HIV e HCV representou avanço significativo na segurança transfusional, reduzindo a janela imunológica para 12 dias. No Brasil, o NAT nacional foi conduzido pela Bio-Manguinhos/Fiocruz a partir de 2002, e tornou-se obrigatório em 2014 (Brasil, 2025).

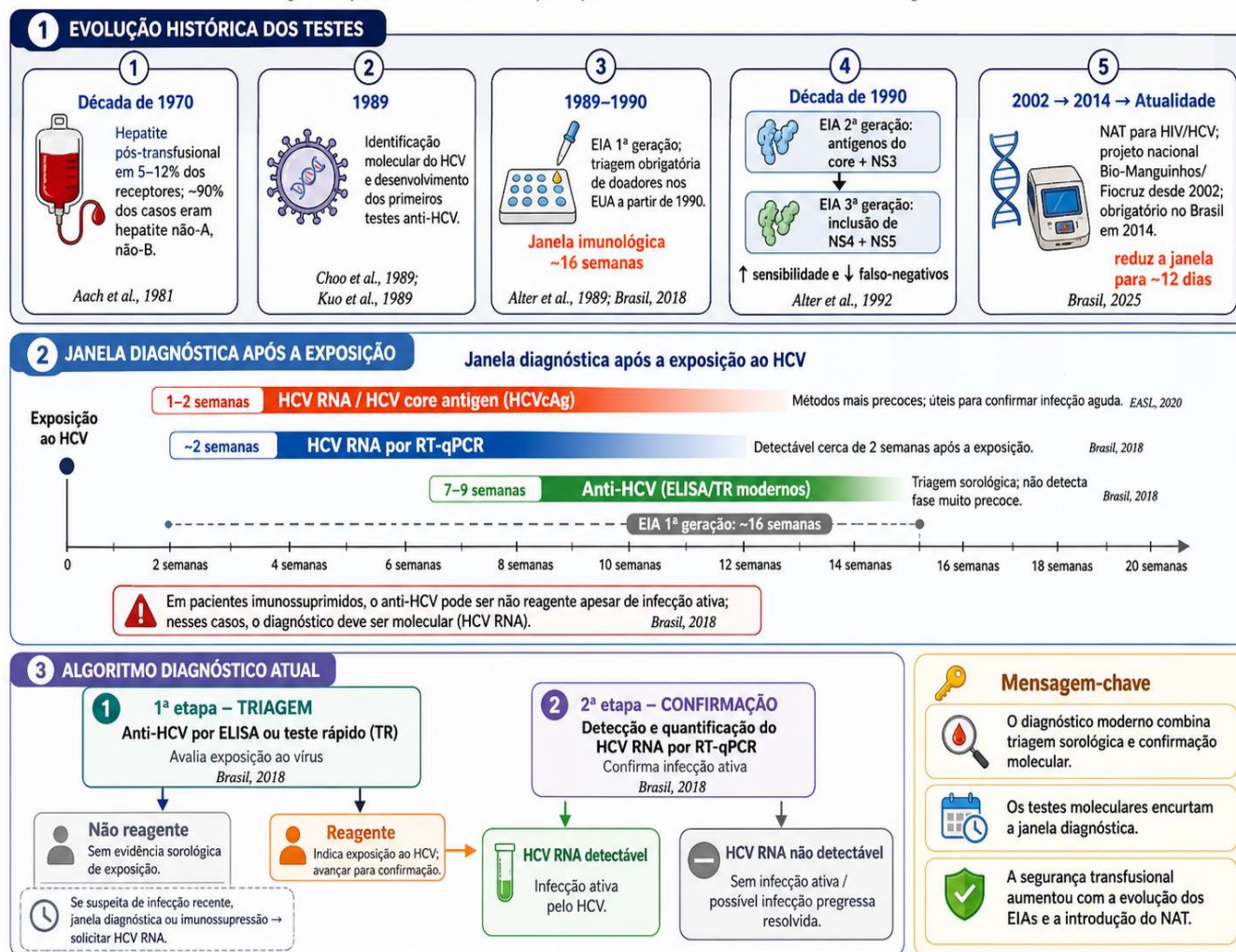
Os ensaios baseados em anticorpos são, todavia, incapazes de detectar a infecção durante a janela imunológica, período de 7 a 9 semanas após a exposição, nos EIAs modernos.

A detecção do HCV RNA ou do antígeno do *core* (HCVcAg), com janela de 1 a 2 semanas, é recomendada para encurtar esse intervalo e confirmar infecção aguda (EASL, 2020).

Figura 4: Visão ampliada do diagnóstico da infecção pela hepatite C

Diagnóstico da hepatite C (HCV): evolução histórica, janela diagnóstica e algoritmo atual

Figura esquemática baseada nas principais referências históricas e diretrizes diagnósticas



Referências resumidas: Aach et al., 1981; Choo et al., 1989; Kuo et al., 1989; Alter et al., 1989; Alter et al., 1992; Brasil, 2018; Brasil, 2025; EASL, 2020.

Em pacientes imunossuprimidos, a resposta imunológica pode estar ausente ou reduzida, resultando em anti-HCV não reagente apesar de infecção ativa. Nesses casos, o diagnóstico deve ser realizado pela detecção molecular do HCV RNA (Brasil, 2018).

Atualmente, o diagnóstico da infecção pelo HCV é realizado em duas etapas sequenciais: na primeira, procede-se à detecção do anti-HCV por imunoensaio enzimático (ELISA) ou teste rápido (TR), para triagem da exposição ao vírus (Brasil, 2018).

Na segunda, em casos com resultado reagente, realiza-se a detecção e quantificação do HCV RNA por RT-qPCR, que se torna detectável aproximadamente duas semanas após a exposição (Brasil, 2018).

2.6 ESTADIAMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA

O estadiamento da fibrose hepática, que evolui do padrão-ouro representado pela biópsia e pela escala METAVIR para a validação progressiva de métodos não invasivos como APRI, FIB-4 e elastografia hepática, constitui etapa central no manejo clínico da hepatite C crônica, estabelecendo o prognóstico, a elegibilidade terapêutica e a vigilância pós-cura, conforme sintetizado na Figura 5.

A fibrose hepática caracteriza-se pelo acúmulo progressivo de matriz extracelular e pela consequente modificação da arquitetura normal do fígado, resultante de agressão hepática crônica. Esse processo compromete progressivamente a função do órgão e representa um dos principais determinantes do prognóstico em pacientes com hepatite C crônica (Kisseleva; Brenner 2021).

A fibrose hepática avançada pode evoluir para cirrose hepática e hipertensão portal, condições associadas a risco aumentado de carcinoma hepatocelular (CHC) (Liu *et al.*, 2024).

A reversibilidade da fibrose avançada e cirrose tem sido objeto de crescente investigação, embora o risco de CHC permaneça mesmo após a supressão do agente causal (vírus ou álcool) (Ahumada *et al.*, 2021)

A biópsia percutânea do fígado, que permite o estudo anatomopatológico de fragmento hepático, é considerada um “padrão-ouro” para determinar o grau de fibrose (Rockey *et al.* (2009)

Contudo, a biópsia hepática é um procedimento invasivo, associado a riscos de sangramento, dor e, raramente, complicações graves, o que limita sua aplicabilidade como método de estadiamento de rotina (Thomaides-Brears *et al.*, 2022).

Diante dessas limitações, métodos não invasivos de avaliação da fibrose, incluindo escores séricos como APRI e FIB-4 e técnicas de elastografia hepática, foram crescentemente validados e incorporados às diretrizes clínicas como alternativas à biópsia (Sterling *et al.* ,2006; SBH, 2020; EASL, 2021; AASLD, 2025).

2.6.1 Diagnóstico da Fibrose Hepática

2.6.1.1 Biomarcadores séricos

Biomarcadores hepáticos são medidas objetivas (funcionais, fisiológicas ou bioquímicas) que refletem o estado funcional do parênquima hepático, seja no nível celular ou molecular. Incluem marcadores de lesão hepatocelular, como as aminotransferases (AST e ALT) e a gama-glutamiltransferase (GGT), os marcadores de função hepática, como albumina, TAP e bilirrubina. E, os marcadores de colestase, como a fosfatase alcalina (FA) e a gama-glutamiltransferase (GGT) (Toro-Restrepo, 2011)

A enzima AST é uma transaminase que catalisa a conversão de aspartato e alfa-cetoglutarato em oxaloacetato e glutamato. Está presente em quase todos os tecidos, com níveis mais altos no fígado e no músculo esquelético. Apresenta-se elevada após hematomas, traumas e processos inflamatórios do fígado ou músculo (Eugster *et al.*, 1966). Embora seja considerado um marcador menos específico de lesão hepática do que a ALT, tem sido comumente usada como biomarcador de fibrose hepática (Yang, 2014)

As plaquetas, embora não sejam marcadores de função hepática propriamente dito, refletem indiretamente o grau de fibrose hepática e de hipertensão portal e fibrose avançada (Johannes *et al.*, 2025).

Na prática clínica, é rotina a solicitação de exames para avaliação da função hepática, utilizando os biomarcadores bioquímicos tais como: ALT, AST, GGT, FA, bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), albumina e TAP ((Tempo de Atividade da Protrombina) (Brasil, 2022).

Nas últimas décadas, a avaliação da doença hepática crônica migrou do foco exclusivo na atividade necroinflamatória (ALT/AST) para a quantificação da fibrose hepática como principal determinante do prognóstico.

Nessa circunstância, foram desenvolvidos e validados índices séricos não invasivos de estadiamento, destacando-se o APRI, e o FIB-4, influenciado pela idade, AST, ALT e contagem de plaquetas (Sterling *et al.*, 2025). Ambos os índices são recomendados pelo Ministério da Saúde como ferramentas de estadiamento não invasivo da hepatite C (BRASIL, 2025).

O hábito de solicitar o painel bioquímico hepático persiste, mas a interpretação atual concentra-se em fase da doença (aguda/crônica), presença de fibrose (APRI/FIB-4) e uso de testes rápidos e PCR.

2.6.1.2 Avaliação do estadiamento da fibrose hepática

O estadiamento do grau de fibrose hepática é fundamental para orientar o acompanhamento clínico dos pacientes com hepatite C crônica, especialmente na identificação daqueles com fibrose avançada ou cirrose, que requerem vigilância prolongada mesmo após a obtenção de RVS (BRASIL, 2025).

Enquanto, em 2014, o estadiamento da fibrose tinha como objetivo primário identificar os pacientes elegíveis para tratamento, então restrito a casos de fibrose avançada (METAVIR F3/F4). Diretrizes atuais deslocam o foco para a vigilância oncológica prolongada após a cura virológica (Brasil, 2018).

Nesse contexto, pacientes com fibrose avançada (F3) ou cirrose estabelecida (F4) devem ser submetidos a rastreamento semestral de carcinoma hepatocelular (CHC) por ultrassonografia abdominal, independentemente da obtenção de resposta virológica sustentada, dado que o risco residual de CHC persiste mesmo após a eliminação do vírus (Brasil, 2025).

2.6.1.3 Biopsia hepática

A escala METAVIR (por meio da biópsia hepática) é um dos escores mais utilizados para definir o grau de fibrose hepática (Bedossa, 1996).

O sistema METAVIR classifica a fibrose hepática em cinco estágios: F0 - ausência de fibrose; F1 - fibrose portal sem septos; F2 - fibrose portal com poucos septos; F3 - numerosos septos sem cirrose; F4 - cirrose (Bedossa, 1996). O sistema avalia também a atividade necroinflamatória em escores de A0 a A3, permitindo estadiamento simultâneo da lesão estrutural e da atividade inflamatória.

2.6.1.4 Metodologias não invasivas para avaliação de fibrose hepática

O APRI é calculado pela fórmula $(AST/LSN \times 100)/\text{plaquetas}$ ($10^9/L$), onde LSN corresponde ao limite superior da normalidade da AST (WAI *et al.*, 2003). Os pontos de corte validados para estadiamento da fibrose são: $< 0,5$ para exclusão de fibrose

significativa (F0/F1); 0,5–1,5 para fibrose moderada (F2); e $> 1,5$ para fibrose avançada e cirrose (F3/F4) (Viganò *et al.*, 2022).

Entretanto, ao se tratar de hepatite aguda, o APRI pode ter resultado falso positivo, pois o aumento dos níveis séricos das aminotransferases, altera diretamente o escore (Yoon, 2014)

O FIB-4 foi inicialmente formulado para avaliação de fibrose hepática avançada em coinfeção HIV/HCV, e posteriormente validado para avaliação de fibrose avançada na Hepatite C (Ragazzo, 2016)

Por incorporar adicionalmente a ALT e a idade do paciente, apresenta bom desempenho junto ao APRI, sendo atualmente reconhecido como marcador de primeira linha para triagem de fibrose avançada em pacientes com hepatites virais crônicas e doença hepática gordurosa não alcoólica (BRASIL, 2025; OMS, 2024).

As diretrizes vigentes recomendam, para a hepatite C crônica, o FIB-4 com ponto de corte inferior a 1,45 para exclusão de fibrose avançada (elevado valor preditivo negativo) e superior a 3,25 para sua sugestão diagnóstica (STERLING *et al.*, 2006; EASL, 2021; AASLD, 2024).

APRI e, principalmente, o FIB-4 são considerados de primeira linha para triagem inicial em pacientes com doença hepática crônica pelo HBV, HCV ou MASLD (doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica) (Brasil, 2024).

Ressalta-se que, em pacientes com idade superior a 65 anos, recomenda-se ajuste do ponto de corte superior para 3,25, a fim de reduzir a taxa de falsos positivos associada ao envelhecimento (OMS, 2024; EASL, 2021).

Historicamente, esses marcadores foram utilizados como critério de elegibilidade para o tratamento (restrito a $F \geq 2$ até 2014). Atualmente, seu papel é necessário para: (1) monitoramento da regressão fibrótica pós-RVS e (2) identificação de pacientes de alto risco para CHC (BRASIL, 2025).

Embora consolidados na prática clínica, os métodos não invasivos apresentam limitações relevantes: não permitem o estadiamento preciso de fibrose moderada, podendo superestimar o grau fibrótico na presença de intensa atividade necroinflamatória. Nessas situações, a integração com métodos complementares é recomendada para adequada estratificação do paciente (Ouzan *et al.*, 2024; BRASIL, 2024).

As diretrizes atuais enfatizam que, se o APRI/FIB-4 for discordante da

elastografia, a elastografia tem maior acurácia para definir a fibrose significativa, reduzindo a necessidade de biópsia hepática (Brasil, 2024).

O escore APRI foi modelado especificamente para hepatite C como uma avaliação laboratorial simples de predição de cirrose e fibrose avançada, conforme preconizado pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções (BRASIL, 2018), atualizado pela Nota Técnica nº 5/2025 (BRASIL, 2025)

Pontos positivos

É o marcador mais simples e acessível disponível, usa apenas dois exames de rotina (AST e plaquetas), sem custo adicional (Wai, 2003). Está amplamente validado especificamente em HCV, com boa performance para excluir cirrose (alto VPN).

É recomendado como teste de 1ª linha em contextos de baixa renda pela OMS e pelo Ministério da Saúde brasileiro (OMS, 2023). A AST eleva-se proporcionalmente à intensidade da necroinflamação e a trombocitopenia reflete hiperesplenismo por hipertensão portal.

Limitações e confundidores:

A AST é uma enzima não hepática-específica, elevações extrahepáticas (doença muscular, infarto do miocárdio, hemólise, exercício físico intenso, miopatia por estatinas) inflam falsamente o escore (Han, 2022).

A trombocitopenia por causas não relacionadas à cirrose, como plaquetopenia imune (PTI), hiperesplenismo por esquistossomose, HIV, medicamentos mielossupressores, também superestima o APRI. Em pacientes com MASLD, a acurácia prognóstica do APRI foi baixa, com AUC variando de 0,65 a 0,72 em diferentes estudos (Abdelhameed, 2024).

A zona indeterminada entre os pontos de corte (0,5–1,0) não permite classificação e representa um percentual substancial dos pacientes. Não discrimina bem os estágios intermediários (F1 vs F2). Em mulheres com HCV, o APRI apresentou taxa de falsos negativos de 33 a 40% para fibrose significativa quando comparado à elastografia transitória (Correia, 2021).

2.6.1.5 Elastografia hepática

A elastografia hepática é um método físico não invasivo que avalia as propriedades viscoelásticas do parênquima hepático, estimando indiretamente o grau de fibrose por meio da medida da rigidez tecidual (Dietrich *et al.*, 2017).

A fibrose hepática altera as propriedades viscoelásticas do parênquima, tornando o tecido progressivamente mais rígido. A elastografia quantifica essa rigidez por meio da velocidade de propagação de ondas de cisalhamento geradas mecanicamente pelo equipamento (Dietrich *et al.*, 2017)

Até recentemente, a biópsia hepática constituía o método de referência para estadiamento da fibrose. Contudo, as diretrizes de 2024 ratificam a elastografia como o principal método não invasivo, indicando-a para avaliação pré e pós-tratamento com DAAs (Brasil, 2024).

A elastografia por ondas de cisalhamento, por sua vez, constitui o grupo de maior aplicação no estadiamento da fibrose hepática e reúne as modalidades já descritas, a elastografia transitória (FibroScan®), a elastografia pontual (pSWE) e a bidimensional (2D-SWE)(Brasil, 2024).

As duas últimas baseiam-se na tecnologia de impulso de força de radiação acústica (*Acoustic Radiation Force Impulse* – ARFI), na qual o próprio feixe ultrassonográfico gera as ondas de cisalhamento, permitindo posicionar a região de interesse sob visualização direta da imagem em modo B e integrando-se aos aparelhos de ultrassonografia convencionais (Brasil, 2024).

Essa integração confere às técnicas ARFI vantagens operacionais em relação à elastografia transitória, que opera sem imagem anatômica simultânea.

Além das modalidades baseadas em ultrassonografia, a elastografia por ressonância magnética (ERM ou *Magnetic Resonance Elastography* – MRE) representa a técnica de maior acurácia diagnóstica entre os métodos não invasivos, sendo frequentemente adotada como padrão de referência para a validação das demais modalidades.

Nela, um transdutor mecânico acoplado à parede corporal gera ondas de cisalhamento que se propagam pelo parênquima hepático e são captadas por uma sequência de ressonância magnética sensível ao movimento, resultando em um mapa quantitativo de rigidez (elastograma) que abrange todo o órgão, e não apenas uma pequena amostra. (Brasil, 2024).

Estudos comparativos diretos demonstram que a ERM oferece acurácia superior às técnicas ultrassonográficas particularmente nos estágios iniciais de fibrose, com taxas de sucesso técnico elevadas mesmo em pacientes obesos ou com ascite, situações que frequentemente comprometem a elastografia transitória.

Suas principais limitações residem no custo elevado, na necessidade de infraestrutura de ressonância magnética e de *hardware* dedicado, e nas contra indicações inerentes ao exame de ressonância, o que restringe sua disponibilidade e a torna, na prática, um método de segunda linha ou reservado a contextos de discordância diagnóstica.

Cabe ressaltar que os valores de rigidez expressos em quilopascals (kPa) não são intercambiáveis entre as diferentes modalidades: os pontos de corte da ERM situam-se em faixa numérica distinta e inferior à das técnicas ultrassonográficas, e mesmo entre estas, TE, pSWE e 2D-SWE, os limiares variam conforme o equipamento, o fabricante e a etiologia da doença hepática.

Por essa razão, o acompanhamento longitudinal de um mesmo paciente deve, idealmente, empregar a mesma modalidade e, sempre que possível, o mesmo equipamento, a fim de assegurar a comparabilidade das medidas (Dietrich *et al.*, 2017).

2.6.1.6 Fatores que podem influenciar na rigidez hepática

Dietrich *et al.*, 2017 apontam em seus estudos que muitos fatores de confundimento foram descritos para a elastografia hepática transitória. A rigidez hepática pode refletir muitas outras condições fisiológicas e patológica, não se limitando somente pela quantidade de fibrose hepática, mas sim por outras patologias.

Dentre os fatores que superestima a rigidez hepática na elastografia, além da fibrose por HCV (Elastrobrasil, 2024), estão: A) Inflamação hepática ativa (ALT elevada) B) Icterícia/Colestase: Aumenta rigidez. C) Jejum inadequado: Refeições aumentam o fluxo sanguíneo hepático e a rigidez. D) Obesidade/Ascite: Podem causar falha na aquisição da medida (necessidade de transdutor XL).

Segundo Tapper (2015), não há consenso sobre a influência da esteatose na rigidez hepática. Processos que também podem causar a redução da rigidez hepática são: abstinência alcoólica e cura da HC.

A obtenção de RVS com esquemas pangenotípicos resulta em redução significativa da rigidez hepática, mensurável pela elastografia transitória, após seis a doze meses do término do tratamento, refletindo a regressão fibrótica associada à eliminação do agente causal (SILVA, 2025; KISSELEVA; BRENNER, 2021)

Figura 5: Visão geral do estadiamento da fibrose hepática da infecção pelo HCV

ESTADIAMENTO DA FIBROSE HEPÁTICA

Avaliação clínica, biópsia, métodos não invasivos e fatores que influenciam a rigidez hepática na hepatite C crônica

AValiação DO ESTADIAMENTO DA FIBROSE



Até 2014:
objetivo principal = identificar pacientes elegíveis para tratamento, então restrito à fibrose avançada (METAVIR F3/F4).



Diretrizes atuais:
foco na estratificação de risco e vigilância pós-cura, especialmente em F3/F4.



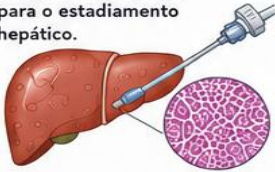
Pacientes com fibrose avançada (F3) ou cirrose (F4) devem realizar rastreamento semestral para CHC por ultrassonografia, mesmo após RVS.



O risco residual de CHC persiste após a eliminação viral.

BIÓPSIA HEPÁTICA – ESCALA METAVIR

A biópsia hepática é o padrão-ouro tradicional para avaliar a fibrose e continua sendo o método invasivo de referência para o estadiamento hepático.



Fibrose (F)	Descrição
F0	ausência de fibrose
F1	fibrose portal sem septos
F2	fibrose portal com poucos septos
F3	numerosos septos sem cirrose
F4	cirrose

Atividade necroinflamatória	
A0	ausente
A1	leve
A2	moderada
A3	grave



Procedimento invasivo; pode causar dor, sangramento e raras complicações graves; não é indicado como método de rotina.

METODOLOGIAS NÃO INVASIVAS – ÍNDICES SÉRICOS

APRI

Fórmula: $(AST / LSN \times 100) / \text{plaquetas } (10^9/L)$



Pontos de corte

< 0,5	exclui fibrose significativa (F0/F1)
0,5 – 1,5	fibrose moderada (F2)
> 1,5	fibrose avançada/cirrose (F3/F4)



Pontos positivos

- simples e acessível
- usa apenas AST e plaquetas
- baixo custo
- validado especificamente em HCV



Limitações / confundidores

- AST não é totalmente específica do fígado
- pode superestimar o escore em hepatite aguda
- trombocitopenia por outras causas também altera o resultado
- baixa discriminação em estágios intermediários
- zona indeterminada em torno do corte

FIB-4

Fórmula: $\text{idade (anos)} \times AST \text{ (U/L)} / [\text{plaquetas } (10^9/L) \times \sqrt{ALT \text{ (U/L)}}]$



Pontos de corte

< 1,30	exclui fibrose avançada (alto VPN)
1,30 – 2,67	zona intermediária / requer segunda linha
> 2,67	sugere fibrose avançada
> 65 anos:	considerar ponto de corte superior = 3,25



Pontos positivos

- incorpora idade, AST, ALT e plaquetas
- bom desempenho para fibrose avançada
- recomendado como teste de primeira linha



Limitações

- desempenho limitado em fibrose moderada
- pode superestimar na presença de necroinflamação intensa
- se discordante da elastografia, a elastografia tem maior acurácia



Uso atual: monitoramento da regressão fibrótica pós-RVS e identificação de pacientes com maior risco para CHC.

ELASTOGRAFIA HEPÁTICA



Método físico não invasivo que estima o grau de fibrose pela medida da rigidez hepática.

A fibrose aumenta a rigidez do parênquima; a elastografia quantifica essa rigidez pela propagação de ondas de cisalhamento.

Modalidades:
elastografia transitória (FibroScan®), pSWE e 2D-SWE.

Vantagens

- ✓ alta acurácia para fibrose avançada
- ✓ recomendada na avaliação pré e pós-tratamento
- ✓ reduz a necessidade de biópsia hepática



Observação

Atualmente, é considerada o principal método não invasivo de referência em muitas diretrizes.

FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR A RIGIDEZ HEPÁTICA



AUMENTAM / SUPERESTIMAM A RIGIDEZ

- inflamação hepática ativa (ALT elevada)
- icterícia / colestase
- jejum inadequado / refeição recente
- obesidade
- ascite (pode dificultar a aquisição)



PODEM REDUZIR A RIGIDEZ OU DIFICULTAR A INTERPRETAÇÃO

- esteatose: influência ainda controversa
- abstinência alcoólica pode reduzir a rigidez
- cura da hepatite C (RVS) tende a reduzir a rigidez em 6–12 meses



Se APRI/FIB-4 e elastografia forem discordantes, a elastografia costuma ter maior acurácia para definir fibrose significativa.



MENSAGEM-CHAVE: O estadiamento da fibrose hepática é central no manejo da hepatite C crônica. A prática clínica migrou da biópsia para métodos não invasivos, especialmente APRI, FIB-4 e elastografia, com foco atual em prognóstico, vigilância pós-cura e identificação do risco residual de CHC.



Fontes resumidas: Kisselova & Brenner, 2021; Liu et al., 2024; Ahumada et al., 2021; Rockey et al., 2009; Thomaidis-Brears et al., 2022; Boursier et al., 2015; Pagadala et al., 2017; Wong et al., 2021; EASL Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis C, 2020; AASLD-ISA HCV Guidance, 2023; WHO Guidelines for Global Hepatitis Programmes, 2022; European Association for the Study of the Liver (EASL), 2021.

Fonte: adaptado pelo autor (2025)

2.7 TRATAMENTOS DA HC

2.7.1 Evolução do tratamento

A trajetória terapêutica da hepatite C, da era do interferon à incorporação progressiva dos antivirais de ação direta pangenotípicos, ilustra uma das transformações mais expressivas da hepatologia contemporânea, com taxas de resposta virológica sustentada (RVS) superiores a 95%, sintetizadas na Figura 6.

A evolução pode ser compreendida em duas grandes eras. A era do interferon, vigente até aproximadamente 2014, caracterizou-se por esquemas imunomoduladores com taxas de RVS inferiores a 50% e perfil de toxicidade significativo.

O advento dos DAAs inaugurou uma nova era no tratamento da hepatite C, caracterizada por esquemas seguros, bem tolerados e de elevada eficácia, com RVS superiores a 95% em regimes de 12 semanas (EASL, 2020). Fundamentando essa abordagem, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para Hepatite C e Coinfecções, aprovado pela Portaria SCTIE/MS nº 84/2018, adotou a análise de custo-minimização, priorizando alternativas com menor impacto financeiro ao SUS, sem prejuízo ao acesso a terapias seguras e igualmente eficazes (BRASIL, 2018).

Com a aprovação, em 2014, do sofosbuvir (inibidor de NS5B) e do simeprevir, agentes de primeira geração, ainda não pangenotípicos, iniciou-se a transição para a era dos antivirais de ação direta (DAAs), consolidada entre 2015 e 2018 e na progressiva incorporação de esquemas pangenotípicos ao Sistema Único de Saúde (SUS).

A Nota Técnica nº 5/2025-CGHV/DATHI/SVSA/MS, que revogou e substituiu integralmente a Nota Técnica nº 280/2023, estabelece os esquemas terapêuticos vigentes para tratamento inicial e retratamento da hepatite C no SUS, estratificados com base no estadiamento de fibrose hepática pelo escore APRI (BRASIL, 2025).

Para pacientes sem cirrose (APRI < 1), sem tratamento prévio com DAA, com contagem de plaquetas superior a 150.000/mm³ e sem sinais de esplenomegalia ou nódulos hepáticos à ultrassonografia, o esquema preconizado é sofosbuvir (400 mg/dia) associado a daclatasvir (60 mg/dia), administrado por 12 semanas, podendo ser conduzido na Atenção Primária à Saúde (BRASIL, 2025).

Para pacientes com APRI ≥ 1 ou cirrose compensada (Child-Pugh A), o esquema indicado é a coformulação de sofosbuvir/velpatasvir (SOF/VEL) em comprimido único diário, por 12 semanas, sem ribavirina. Nos casos de cirrose descompensada (Child-Pugh B ou C) ou com histórico de descompensação hepática, o mesmo esquema SOF/VEL é mantido, com extensão da duração do tratamento para 24 semanas (BRASIL, 2025).

No que se refere ao retratamento dos pacientes que não obtiveram resposta virológica sustentada (RVS) a um esquema prévio de antivirais de ação direta, assim considerados aqueles sem RVS entre a 12^a e a 24^a semana após o término do tratamento, a NT nº 5/2025 preconiza a combinação tripla sofosbuvir/velpatasvir/voxilaprevir (SOF/VEL/VOX) por 12 semanas para indivíduos sem cirrose ou com cirrose compensada (Child-Pugh A).

Nos casos de cirrose descompensada (Child-Pugh B ou C), o voxilaprevir, por tratar-se de inibidor de protease, é contraindicado, recomendando-se o retratamento com sofosbuvir/velpatasvir (SOF/VEL) por 24 semanas. Também no retratamento, todos os esquemas são pangenotípicos, dispensando a genotipagem do HCV, e a ribavirina não é indicada em nenhuma situação (BRASIL, 2025).

Cabe destacar que a NT nº 5/2025 também formalizou a descontinuidade do fornecimento de ribavirina (RBV 250 mg) para o tratamento de adultos, em decorrência da interrupção definitiva da produção pelo único fabricante nacional, em setembro de 2024, respaldada por evidências que não demonstram vantagem clínica na adição de ribavirina aos esquemas de DAA, incluindo pacientes com cirrose compensada pelo genótipo 3 (BRASIL, 2025).

Todos os esquemas disponíveis são pangenotípicos, o que dispensa a realização de genotipagem prévia do HCV para a definição do tratamento (BRASIL, 2025).

2.7.2 Impacto econômico no Sistema Único de Saúde (SUS).

Devido às negociações de preços do Ministério da Saúde (MS) e à produção local de medicamentos genéricos, o custo médio do tratamento com DAAs reduziu significativamente nos últimos anos (Brasil, 2025 ou Xavier *et al.*, 2023).

Contudo, Quental *et al.* (2008) destacam que, apesar da política de genéricos, os custos agregados ao sistema de saúde permanecem elevados em razão do

monitoramento contínuo dos pacientes e do manejo das complicações associadas à doença avançada, como cirrose e carcinoma hepatocelular, especialmente em pacientes diagnosticados tardiamente.

Figura 6 — Visão geral do tratamento para HC antes e após a introdução dos DAA.



Fonte: Adaptado do autor de Brasil (2025)

2.8 MICRORNA (miR)

2.8.1 Sua descoberta.

Os microRNAs (miRNAs) foram identificados pela primeira vez no nematódeo *Caenorhabditis elegans**, a partir da caracterização do gene *lin-4*. Descrito em 1993, o *lin-4* codifica um pequeno RNA endógeno capaz de regular, por complementaridade de sequência, a expressão do gene *lin-14* e outros genes envolvidos no controle temporal do desenvolvimento (WIGHTMAN *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 1993)

Esses achados, publicados independentemente por Lee, Feinbaum e Ambros, e por Wightman, Ha e Ruvkun, inauguraram o campo de conhecimento dos miRNAs, como uma nova classe de reguladores gênicos pós-transcricionais (Lee *et al.* 1993; Wightman *et al.* 1993)

Em reconhecimento a essa descoberta e ao seu impacto na biologia molecular, Victor Ambros e Gary Ruvkun receberam o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2024 (YU; Wang, 2024).

Posteriormente, a descrição do *let-7* no mesmo organismo demonstrou que esses pequenos RNAs regulatórios não constituíam um fenômeno isolado de *C. elegans*, mas integravam uma classe conservada de moléculas com relevância biológica mais ampla (Reinhart *et al.*, 2000)

Em seguida, estudos publicados em 2001 ampliaram substancialmente esse conceito ao demonstrar a existência de numerosos pequenos RNAs regulatórios em diferentes espécies animais, consolidando os miRNAs como uma ampla classe de RNAs, não codificantes, envolvidos no controle fino da expressão gênica Lagos-Quintana *et al.* (2002)..

Os miRNAs passaram a ser reconhecidos como reguladores centrais da expressão gênica em nível pós-transcricional, participando de processos como proliferação, diferenciação, apoptose e resposta ao estresse celular.(Zhang *et al.*, 2021).

2.8.2 Funções Regulatórias dos miRs e Perspectivas Terapêuticas

Os miRNAs têm sido denominados 'microgestores da expressão gênica', sendo reconhecidos como reguladores centrais da homeostase celular e da evolução da complexidade dos metazoários, com influência sobre mais de 60% dos genes humanos (BARTEL; CHEN, 2018)

Com a premiação de Victor Ambros e Gary Ruvkun em 2024, o papel dos miRs como reguladores-mestres foi consolidado, justificando a sua importância fisiológica no desenvolvimento celular, diferenciando tecidos e controlando o tempo de resposta das células (Yu; Wang, 2024).

As pesquisas mais recentes mostram a dificuldade, mas o alto potencial de usar miméticos de miRNA ou inibidores de miR na terapia contra o câncer, focando no alvo específico (Seyhan *et al.*, 2024).

2.8.3 Biogênese.

A biogênese dos miRNAs, iniciada pela transcrição nuclear do pri-miRNA é processada sequencialmente pelo complexo Drosha/DGCR8, exportina-5, DICER e

proteína Argonauta no complexo RISC, configura um mecanismo altamente regulado de silenciamento pós-transcricional (Figura 7).

A biogênese dos miRNAs é descrita por duas vias principais: a canônica e a não canônica. Os genes de miRNAs podem ter origem intragênica (localizados em íntrons e éxons de genes codificadores de proteínas) ou intergênica, constituindo unidades transcricionais independentes (O'Brien *et al.*, 2018).

A via canônica inicia-se no núcleo, onde a RNA polimerase II transcreve um longo transcrito primário (o pri-miRNA) contendo *cap* 5' e cauda poli (A). (Kim *et al.*, 2016).

Ainda no núcleo, o complexo Drosha/DGCR8 cliva a estrutura em alça (*hairpin*) do pri-miRNA, gerando um precursor de aproximadamente 60–70 nucleotídeos denominado pré-miRNA, que é exportado ao citoplasma pela exportina-5 (Orang *et al.*, 2014).

No citoplasma, a DICER processa o pré-miRNA, gerando um duplex de aproximadamente 22 nucleotídeos (Starega-Roslan, 2015).

Embora a via canônica seja dependente do processamento nuclear pela DROSHA e citoplasmático pela DICER, Kim *et al.* (2016), ao deletarem *DROSHA*, *XPO5* e *DICER*, tornou-se evidente que DROSHA é essencial para a biogênese canônica (Orang *et al.*, 2014)

A ausência de DICER aciona a produção residual de miRNAs da fita 5p por meio da proteínas AGO, sugerindo maturação por vias alternativas, independentes da etapa citoplasmática convencional (Starega-Roslan, 2015).

A via não canônica, representada pelos mirtrons, difere da canônica por prescindir da clivagem pela Drosha e pelo DGCR8. (Kim *et al.*, 2016).

Os mirtrons derivam do *splicing* de íntrons, processados como pré-miRNAs após a excisão do íntron, sendo independentes do processamento nuclear inicial e potencialmente mais rápidos na resposta regulatória (Bofill-de Ros; Ørom, 2023).

Outras vias não canônicas relevantes incluem o processamento do miR-451 pela proteína AGO2, dispensando inteiramente a etapa de clivagem pela DICER (Cheloufi *et al.*, 2010; Cifuentes *et al.*, 2010), e a geração de miRNAs a partir de pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs), como demonstrado para o ACA45 (Ender *et al.*, 2008).

Essas vias alternativas evidenciam que a biogênese de miRNAs é mais plástica do que o modelo canônico inicialmente proposto, sendo relevante observar que o miR-122, por seguir integralmente a via canônica, com implicações potenciais para contextos fisiopatológicos nos quais componentes da maquinaria canônica se encontram alterados (Trebicka *et al.*, 2013).

Independente da via de origem, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma, onde a enzima Dicer (RNase III) cliva a alça terminal do *hairpin*, gerando um duplex de miRNA de aproximadamente 22 nucleotídeos (Orang *et al.*, 2014).

Esse processamento representa não apenas uma etapa de maturação, mas um ponto de controle crítico da biogênese, cuja eficiência determina a formação subsequente do complexo RISC (Bartel, 2018).

A eficiência da formação do complexo RISC-miR é maior quando o pré-miR é clivado pela *Dicer*, sugerindo que a produção e o silenciamento são processos acoplados. (Wilson, 2015).

O duplex de miRNA é incorporado à proteína Argonauta (AGO), que constitui o núcleo catalítico do complexo RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), responsável pela execução do silenciamento gênico (Divisato *et al.*, 2021).

Logo depois o RISC promove a separação das duas fitas do duplex de miRNA: 1) a fita guia, que corresponde ao miRNA maduro funcional, é retida no complexo 2) a fita passageira é degradada (Jin, 2022).

O silenciamento gênico mediado por miRNAs não é exclusivo da AGO. miRISC reconhece o mRNA-alvo, a AGO recruta o GW182/TNRC6(*scaffold*) e conecta o complexo aos maquinários de deadenilação² (CCR4-NOT e PAN2-PAN3). (Jonas; Izaurralde, 2015).

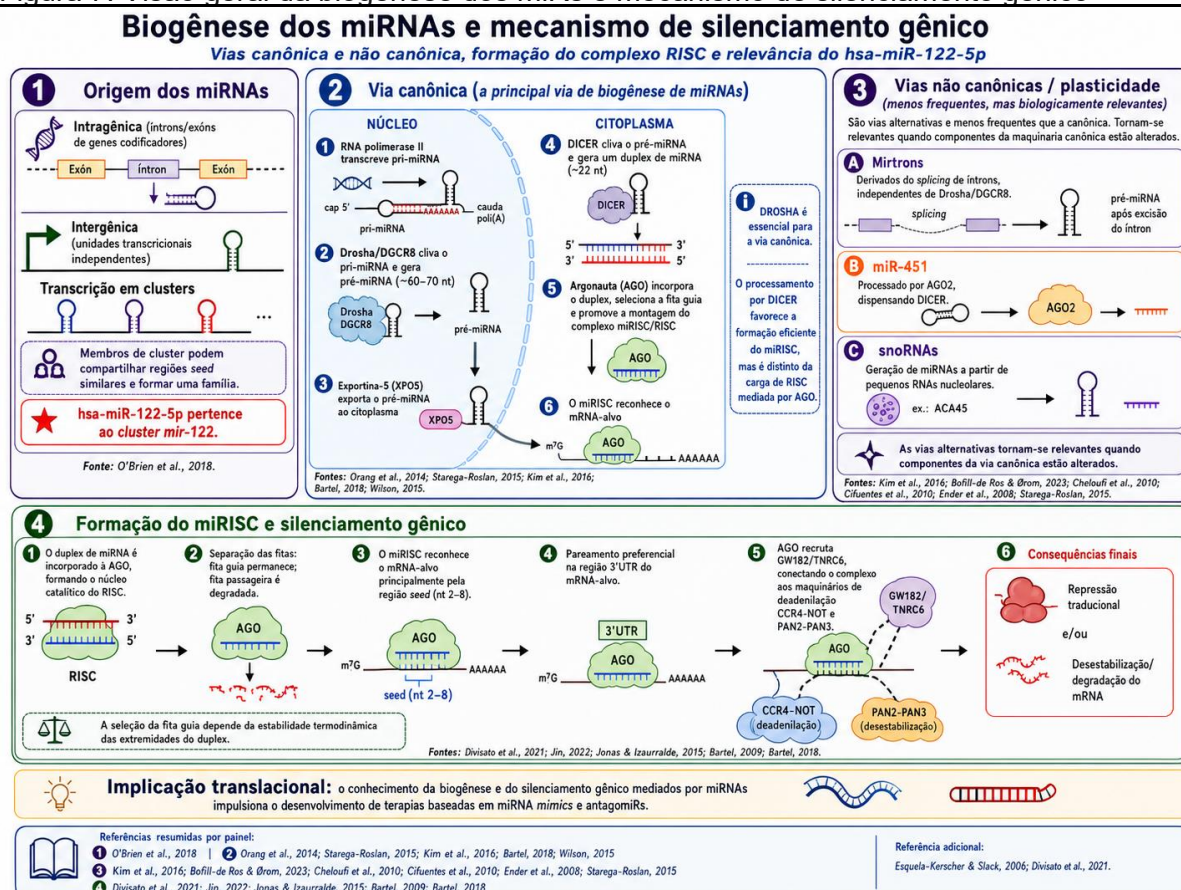
O RISC ativo, contendo o miRNA maduro de fita simples, reconhece sequências-alvo em mRNAs por meio de pareamento de bases predominantemente com a região *seed* (os nucleotídeos 2 a 8 da extremidade 5' do miRNA), que constitui o determinante primário da especificidade de reconhecimento do alvo (Bartel, 2009).

Esse pareamento ocorre preferencialmente na região 3' não traduzida (3'UTR) do mRNA-alvo, desencadeando o silenciamento pós-transcricional por meio de repressão traducional e/ou desestabilização do transcrito (Jin, 2022).

² E desencadeia a remoção da cauda poli(A) do mRNA-alvo, iniciando sua degradação, seguida pelo *decapping* e pelo decaimento 5'→3'

Bartel (2018) enfatiza que o complexo RISC não escolhe fitas aleatoriamente. A seleção da fita guia é baseada na estabilidade termodinâmica das extremidades do duplex. Isso explica por que mutações em um miR podem desregular genes inesperados.

Figura 7: Visão geral da biogênese dos miRs e mecanismo de silenciamento gênico



Fonte: Adaptação do autor (2025)

O acúmulo de conhecimento sobre silenciador gênico mediado por miRNAs e suas consequências e impactos, seja ela na disfunção da maquinaria de biogênica, oncomiRs e supressores tumorais (Esquela-Kerscher; Slack, 2006), tem impulsionado o desenvolvimento de estratégias terapêuticas baseadas em miRNA mimics e antagonists (Divisato et al., 2021).

2.8.4 Mecanismo de ação.

O mecanismo de ação dos miRNAs, com predomínio do repressor via ligação à 3'-UTR do mRNA-alvo pelo complexo RISC, com indução de deadenilação, *decapping* e degradação exonucleolítica, comporta exceções biologicamente relevantes, conforme ilustrado na Figura 8.

O alvo canônico dos miRNAs é a região 3' não traduzida (3'-UTR) dos mRNAs, à qual o miRNA maduro se liga por complementaridade³ de sequência por meio do complexo RISC (Djuranovic *et al.*, 2012)

Estudos recentes demonstraram que a ligação de miRNAs não se restringe à 3'-UTR. A interação com a 5'-UTR e regiões codificantes (CDS) também foi documentada, com consequências funcionais variáveis conforme o contexto celular (DIENER *et al.*, 2024).

Em mamíferos, o predomínio do silenciamento mediado por miRNAs ocorre por desestabilização do mRNA-alvo, iniciada por deadenilação mediada pelo recrutamento do complexo CCR4-NOT pela proteína GW182/TNRC6, seguida de remoção do *cap* (*decapping*) e degradação exonucleolítica 5'→3' (Jonas; Izaurralde, 2015).

A clivagem endonucleolítica direta, dependente da atividade catalítica (*slicer*) exclusiva da proteína AGO2 entre as quatro Argonautas humanas (AGO1–4), constitui mecanismo alternativo restrito a situações de elevada complementaridade entre miRNA e alvo, condição rara para miRNAs endógenos em animais, mas predominante em plantas (Meister *et al.*, 2004; Jonas; Izaurralde, 2015)

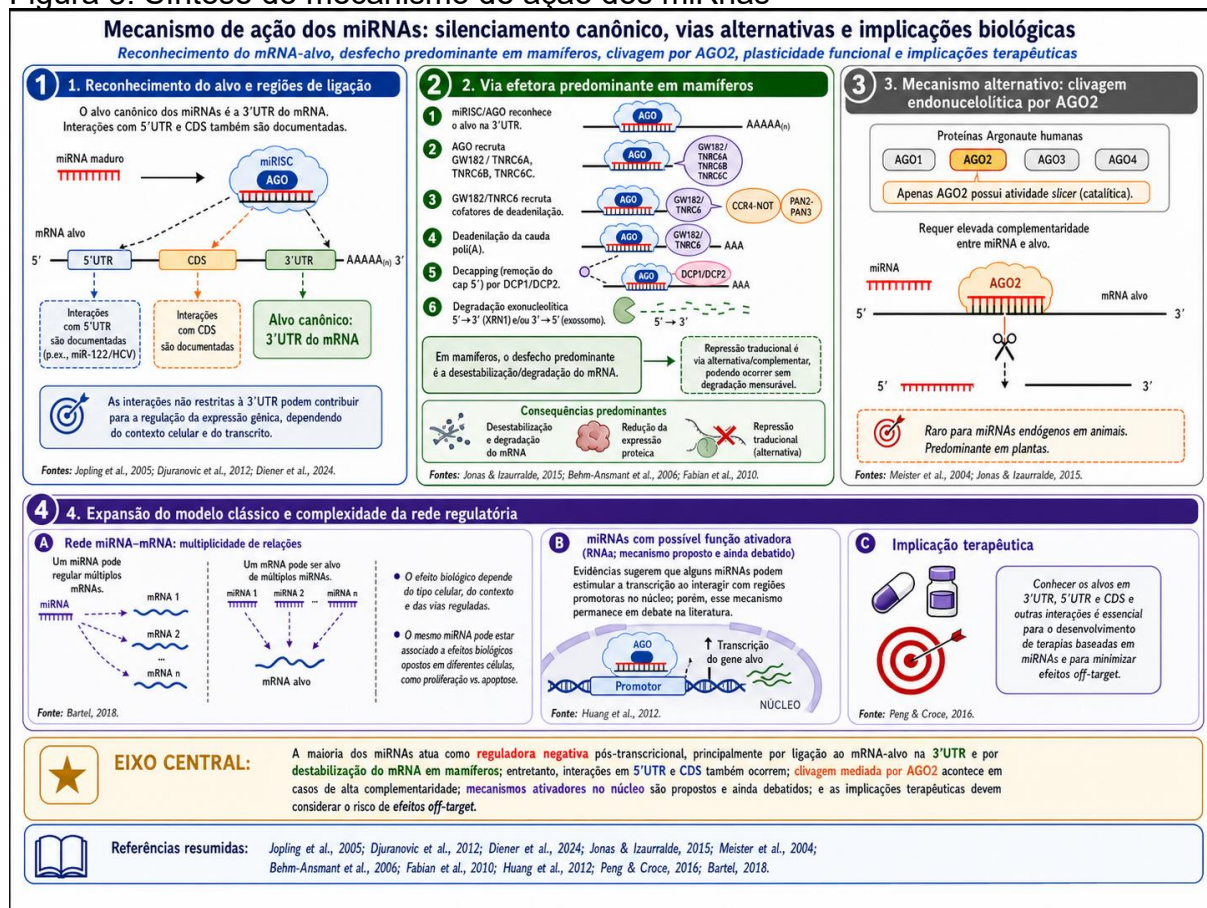
Meister *et al.* (2004), relataram que, de todas as Argonautas em humanos (AGO1-4), apenas a AGO2 possui capacidade de clivagem direta (*slicer activity*).

A rede de interação miRNA-mRNA é complexa, um miR pode ter consequências biológicas opostas em células diferentes, além disto, um mRNA pode ser alvo de múltiplos miRNAs e um miRNA pode regular múltiplos mRNAs. Assim, um determinado miR pode regular processos opostos em distintos tipos celulares, como, por exemplo, aumentar a proliferação celular e da taxa de apoptose (Bartel, 2018).

Embora a maioria dos miRNAs atue como reguladores negativos da expressão gênica, evidências recentes sugerem a existência de miRNAs com função ativadora, capazes de estimular a transcrição ao interagir com regiões promotoras no núcleo (Huang *et al.*, 2012), esse mecanismo representa uma expansão do modelo clássico de ação dos miRNAs.

³ A complementaridade parcial favorece a repressão traducional, ao passo que complementaridade extensa favorece a clivagem endonucleolítica do transcrito. A região de ligação e o grau de complementaridade são determinantes para a consequência biológica da interação (BARTEL, 2009)

Figura 8: Síntese do mecanismo de ação dos miRNas



Fonte: Adaptação do autor (2025).

No debate terapêutico, evidências indicam que o conhecimento de múltiplos alvos (3'UTR e outros) é essencial para o desenvolvimento de fármacos baseados em miR, para evitar efeitos "off-target" (Peng; Croce, 2016).

2.8.5 miR-122

O miR-122 é o miRNA mais abundante no hepatócito adulto humano, com expressão regulada por fatores de transcrição hepatoespecíficos e função dual de silenciador de alvos endógenos oncogênicos pela via canônica e de fator pró-replicativo do HCV pela interação não canônica com a 5'-UTR viral. Configura simultaneamente um possível marcador de homeostase hepatocitária e um elemento central na fisiopatologia da hepatite C crônica, conforme ilustrado na Figura 9.

2.8.5.1 Biogênese e Mecanismo de Ação do miR-122.

O miR-122-5p pertence ao *cluster mir-122* e segue a via canônica de biogênese dos miRNAs, iniciada pela transcrição nuclear do pri-miRNA pela RNA polimerase II (Orang *et al.*, 2014), Com subsequente clivagem pelo complexo DROSHA/DGCR8, exportação do pré-miRNA ao citoplasma pela Exportina-5 e processamento pela DICER, gerando um duplex de aproximadamente 22 nucleotídeos (O'Brien *et al.*, 2018).

O duplex é incorporado à proteína Argonauta (AGO), que constitui o núcleo catalítico do complexo RISC. A fita guia, correspondente ao miRNA maduro funcional, é retida, enquanto a fita passageira é degradada (Jin, 2022).

A seleção da fita guia é determinada pela assimetria termodinâmica das extremidades do duplex, com preferência pela fita cuja extremidade 5' apresenta menor estabilidade (Bartel, 2018).

O hsa-miR-122-5p é o miRNA mais abundantemente expresso no fígado adulto humano, representando aproximadamente 70% do *pool* total de miRNAs hepáticos (Bandiera *et al.*, 2015; Jopling, 2012). Sua expressão é regulada por fatores de transcrição hepatoespecíficos, notadamente HNF1 α , HNF3 β e HNF4 α , o que confere ao miR-122 um papel central na manutenção da identidade e da homeostase hepatocitária (Li *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2015).

2.8.5.2 Mecanismo de Ação Canônico: Silenciamento de Alvos Endógenos

O mecanismo de ação canônico do hsa-miR-122-5p ocorre por complementaridade parcial da região *seed* (nucleotídeos 2–8 da extremidade 5') com a 3'UTR de mRNAs-alvo, resultando em recrutamento de GW182/TNRC6, ativação dos complexos de deadenilação CCR4-NOT e PAN2-PAN3, *decapping* e degradação exonucleolítica 5'→3' do transcrito (Bartel, 2009; Jonas; Izaurralde, 2015).

Por esse mecanismo, o miR-122 regula negativamente alvos endógenos envolvidos no metabolismo hepático, entre eles *ALDOA*, *SLC7A1*, *CCNG1*, e genes da síntese lipídica e do colesterol, exercendo função supressora sobre processos proliferativos e metabólicos aberrantes (Esau *et al.*, 2006; Jopling, 2012).

A perda experimental de miR-122 em modelos murinos associa-se ao desenvolvimento progressivo de esteato-hepatite, fibrose e carcinoma hepatocelular

(CHC), decorrente da desrepressão de múltiplos genes oncogênicos normalmente controlados por esse miRNA (Kojima *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2012).

Esses achados indicam que a redução do miR-122 não constitui apenas consequência da transformação neoplásica, mas pode contribuir causalmente para a hepatocarcinogênese.

2.8.5.3 Mecanismo de Ação Não Canônico: Interação com o RNA Genômico do HCV

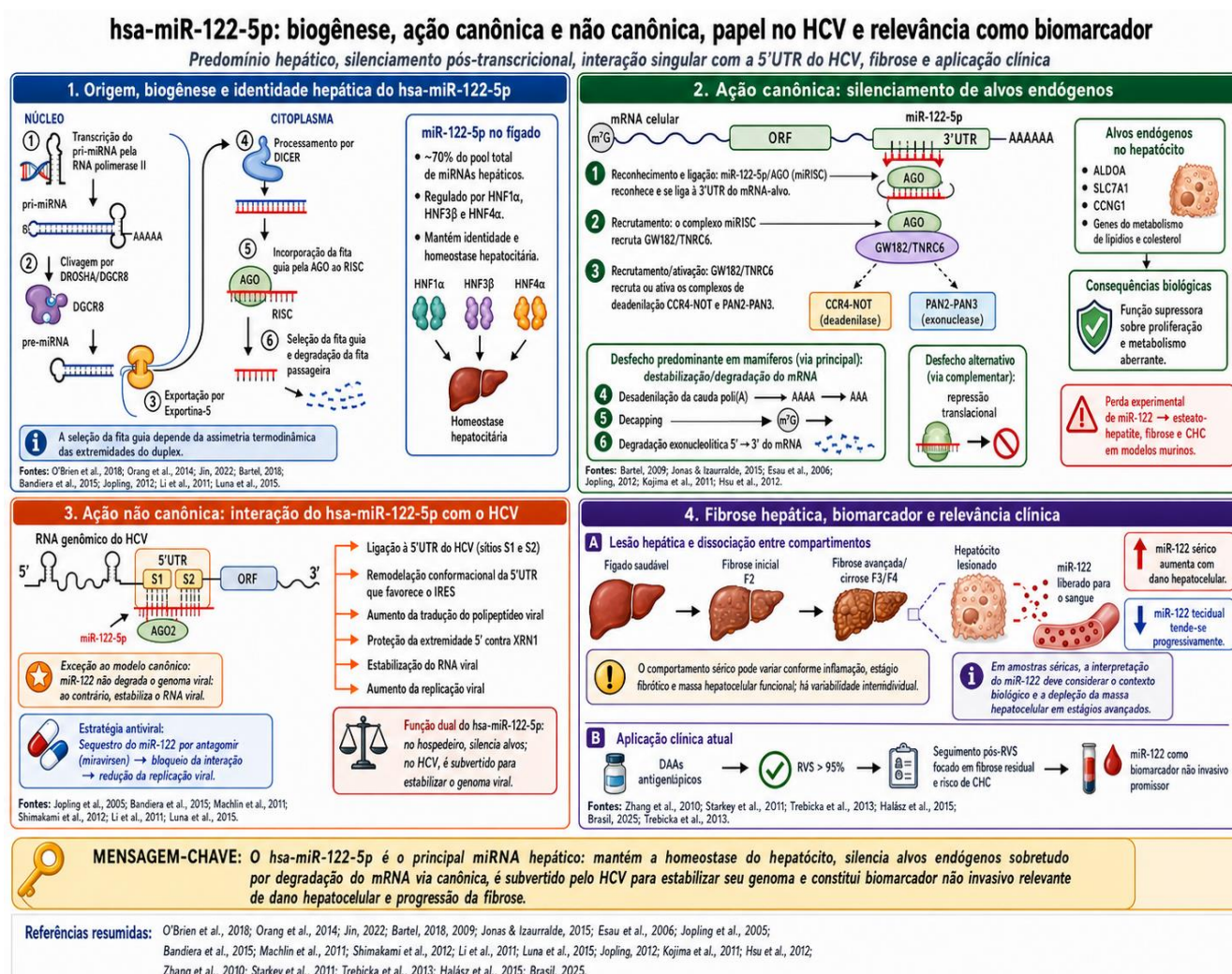
O hsa-miR-122-5p apresenta uma interação biologicamente singular com o vírus da hepatite C (HCV), que representa uma exceção ao modelo canônico repressor. Ao contrário do silenciamento de mRNAs celulares pela 3'UTR, o miR-122 liga-se a dois sítios conservados e adjacentes na 5'UTR do RNA genômico do HCV (sítios S1 e S2), por meio de complementaridade de sequência dependente da região *seed* (Jopling *et al.*, 2005).

Essa interação não resulta em degradação do transcrito viral, mas em efeitos opostos ao silenciamento canônico: estabilização do RNA genômico viral, incremento da eficiência de tradução mediada pelo IRES e aumento da replicação (Jopling *et al.*, 2005; Bandiera *et al.*, 2015).

O complexo AGO2/miR-122 formado sobre a 5'UTR viral protege a extremidade 5' do RNA do HCV da degradação pela exorribonuclease XRN1 do hospedeiro, prolongando a meia-vida do genoma viral (Machlin *et al.*, 2011; Shimakami *et al.*, 2012).

Adicionalmente, a ligação do miR-122 induz uma remodelação conformacional da 5'UTR que favorece a formação da estrutura IRES canônica, estimulando a tradução da poliproteína viral (Jopling *et al.*, 2005

Figura 9: Visão geral da Biogênese, vias de ação do hsa-miR-122



Fonte: Adaptação do autor (2025)

O miR-122 configura, portanto, uma molécula de função dual⁴ no contexto da infecção pelo HCV: é essencial para a homeostase hepatocelular e exerce função supressora sobre vias oncogênicas, mas é simultaneamente recrutado pelo vírus como fator pró-replicativo, em mecanismo que subverte a função canônica de silenciamento (Li *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2015).

2.8.6 O miR-122 - vias metabólicas e associação com doenças

⁴ Esse mecanismo pró-viral, diametralmente oposto ao silenciamento canônico, evidencia a plasticidade funcional do miR-122 e fundamenta sua relevância fisiopatológica central na infecção crônica pelo HCV (Jonas, 2018).

O miR-122, altamente enriquecido no fígado, participa da regulação da homeostase metabólica e tem sido associado a diferentes condições fisiopatológicas (Scott, 2022).

Embora estudos extra-hepáticos tenham relacionado sua expressão a processos inflamatórios e proliferativos em doenças respiratórias, retinopatia diabética, osteoartrite e câncer, o significado biológico dessas alterações é heterogêneo e dependente do contexto tecidual e do desenho experimental (Wang *et al.*, 2016).

No caso das neoplasias, por exemplo, Li *et al.* (2019) relatam que o miR-122 pode exercer funções distintas, atuando como supressor tumoral em alguns contextos e como modulador pró-tumoral em outros.

2.8.7 O miR-122 e a Via metabólica da glicose - Diabetes Mellitus 2.

Na DM2, o aumento do miR-122 circulante parece refletir disfunção hepato-metabólica progressiva, frequentemente associada à resistência à insulina, dislipidemia e esteatose hepática (Willeit, 2017).

Estudos populacionais e caso-controle demonstraram que a superexpressão plasmática de miR-122 se correlaciona com glicemia, LDL-colesterol e resistência à insulina. Em nível mecanístico, estudos em hepatócitos mostraram que o miR-122 pode modular a sensibilidade à insulina por meio da regulação do eixo IGF-1R/PI3K/Akt, influenciando a produção hepática de glicose (Willeit *et al.*, 2017).

Nessa condição, devem ser citadas corretamente as enzimas gluconeogênicas PCK1 e G6PC, sendo esta última a subunidade catalítica da glicose-6-fosfatase, e não a glicose-6-fosfato desidrogenase (Mokhtari, 2023).

3 JUSTIFICATIVA

Importa considerar que, no âmbito global, aproximadamente 50 milhões de pessoas vivem com HCV, e no Brasil, em um cenário realista, estimativas recentes apontam que de 700.000 a 1.000.000 de pessoas convivam cronicamente com o HCV.

A OMS estipulou uma meta ousada para erradicação da hepatites virais como ameaça à saúde pública até 2030 (OMS, 2025). Um dos pilares para a meta de erradicação do HCV é a testagem e diagnóstico de forma massificada.

Para isso, existe uma necessidade de desenvolver e expandir tecnologias de diagnóstico confiáveis para confirmar a presença de infecção virêmica pelo HCV, seu estadiamento e acompanhamento posterior ao tratamento (OMS, 2025).

Por outro lado, pesquisas em desenvolvimento em novas tecnologias de análises em biologia molecular, tais como, micro biossensor (voltametria de onda quadrada) prometem revolucionar e atender a demanda em relação a custos, boa seletividade, alta eficiência e reprodutibilidade (Zhai *et al.*, 2023).

Nesse contexto, o hsa-miR-122-5p emerge como um dos biomarcadores circulantes de maior relevância para a hepatite C crônica, por razões que transcendem a sua utilidade diagnóstica geral (Jopling *et al.*, 2005; Jopling *et al.*, 2008).

No plano diagnóstico e de estadiamento, estudos pioneiros apontaram que os níveis séricos de hsa-miR-122-5p estão elevados em pacientes com hepatite C crônica e correlacionam-se com marcadores de necroinflamação hepática (Bihrer *et al.*, 2011; Cermelli *et al.*, 2011).

Trebicka *et al.* (2013) demonstraram, por meio de análise de biópsias hepáticas pareadas com amostras séricas de pacientes com HCV crônico, que os níveis circulantes de hsa-miR-122-5p variam em função do estágio de fibrose.

Adicionalmente, Cermelli *et al.* (2011) confirmaram que os níveis séricos de hsa-miR-122-5p correlacionam-se positivamente com o grau de fibrose histológica e com a atividade inflamatória em pacientes com hepatite C crônica.

A pertinência clínica dessas observações é reforçada pelo fato de que o hsa-miR-122-5p foi o biomarcador de miRNA circulante com maior acurácia individual para discriminar estágios de fibrose avançada (Schwarzenbach *et al.*, 2016).

O conjunto dessas evidências justifica a investigação do hsa-miR-122-5p plasmático como biomarcador não invasivo de estadiamento de fibrose hepática na hepatite C crônica, constituindo a premissa central do presente estudo.

Por esse contexto, é necessário que pesquisas com miRs se aprofundem no conhecimento e nos testes comparativos entre outros biomarcadores e escores hepáticos, a fim de validar, comparar e apontar novas possibilidades de estadiamento do HCV, possibilitando uma melhora nas abordagens de diagnóstico e acurácia do estadiamento, diminuindo tempo, possíveis falhas e limitações dos métodos existentes.

Há interesse em confirmar com pesquisa se o hsa-miR-122-5p possui sensibilidade e especificidade diagnóstico, em comparação com os *scores* hepáticos APRI e FIB-4 em pacientes cronicamente infectados pelo HCV, que seja suficiente para substituir ou em apoiar os métodos já existentes de estadiamento de fibrose hepático, resultando em uma melhor performance do processo, e somado a isso, esclarecer possíveis limitações do método.

4 - OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Comparar o desempenho dos níveis de expressão plasmática de hsa-miR-122-5p circulante com os escores de estadiamento de fibrose hepática não invasivos (APRI e FIB-4) e investigar sua aplicabilidade como biomarcador não invasivo na hepatite C crônica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar e comparar os dados clínicos, epidemiológicos, de comorbidades e dos biomarcadores hepáticos e expressão plasmáticos do hsa-miR-122-5p entre os grupos estudados (GC e GHCV) e investigar a existência de padrão entre os subgrupos (F0/F1, F2 e F3/F4).

Aferir e comparar a acurácia e desempenho diagnóstico dos biomarcadores hepáticos e expressão de hsa-miR-122-5p por meio da análise da curva ROC.

Padronizar a técnica de RT-qPCR para análise dos níveis plasmáticos do hsa-miR-122-5p, e elaborar um Procedimento Operacional Padrão (POP) para sua execução.

5 - METODOLOGIA

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional analítico, de delineamento transversal, com coleta prospectiva de amostras biológicas, realizado no período de março a novembro de 2025 no Ambulatório de Hepatologia do HUGG. A investigação foi estruturada em dois grupos de comparação: um grupo controle, composto por indivíduos saudáveis (GC), e um grupo de pacientes com hepatite C crônica virgens de tratamento antiviral (GHCV).

A validação de um biomarcador molecular, da pesquisa à aplicação clínica, percorre uma caminhada longa e necessária, orientada por protocolos e critérios rigorosos e fundada em premissas essenciais, como a constituição de uma base amostral sólida e a minimização de vieses de seleção, o que confere credibilidade às comparações entre grupos e sustenta a validade interna dos achados.

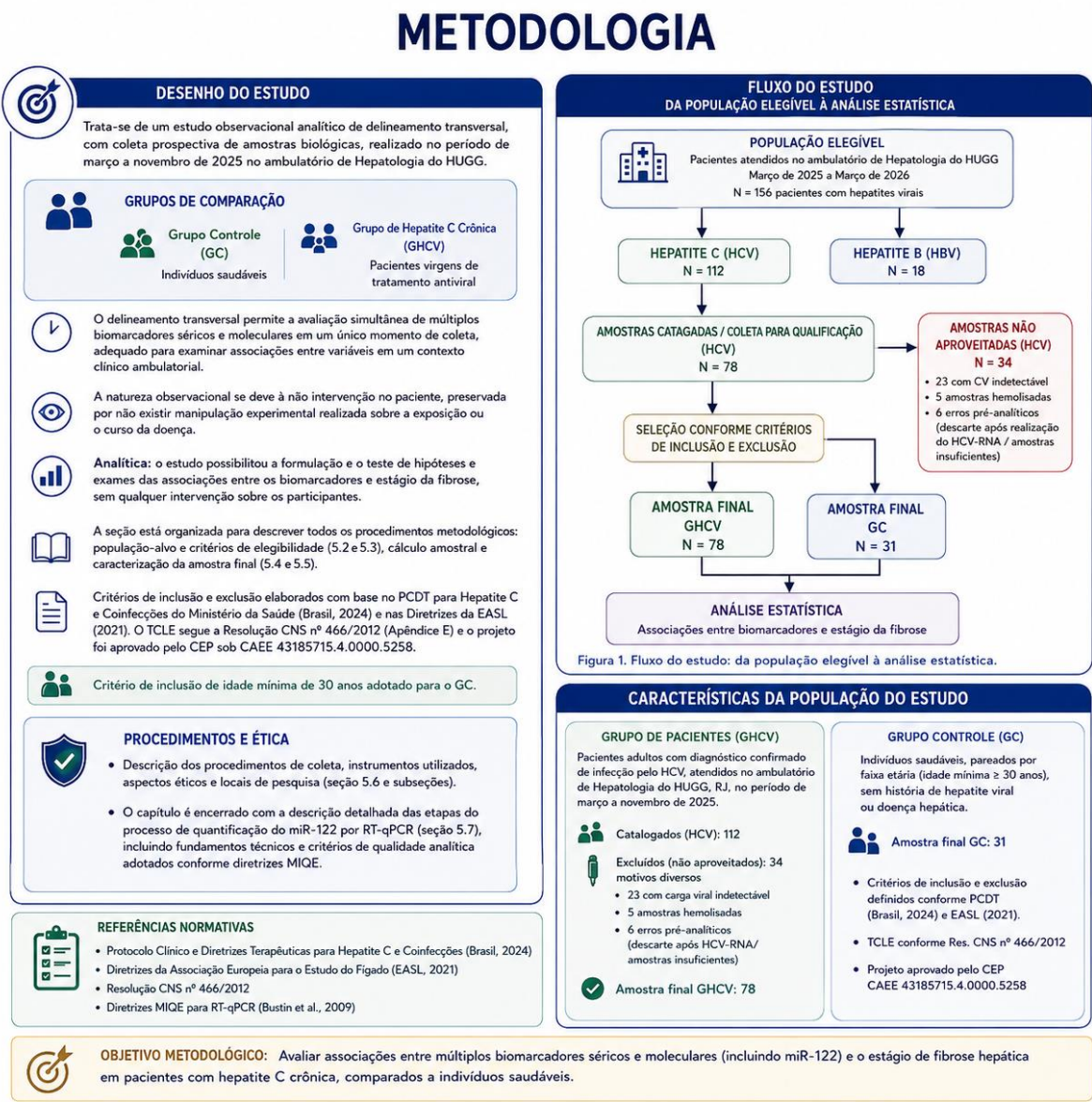
O delineamento transversal foi adotado por permitir a avaliação simultânea de múltiplos biomarcadores séricos e moleculares em um único momento de coleta, mostrando-se adequado para examinar associações entre variáveis em contexto clínico ambulatorial.

A natureza observacional decorre da ausência de intervenção sobre o paciente, não havendo manipulação experimental da exposição ou do curso da doença; o caráter analítico, por sua vez, deve-se ao fato de o estudo possibilitar a formulação e o teste de hipóteses e o exame das associações entre os biomarcadores e o estágio de fibrose, sem qualquer intervenção sobre os participantes.

A seção está organizada de modo a descrever todos os procedimentos metodológicos adotados. Inicialmente, apresentam-se a população-alvo e os critérios de elegibilidade utilizados na seleção dos participantes (seções 5.2 e 5.3), seguidos do cálculo amostral e da caracterização da amostra final (seções 5.4 e 5.5). Em seguida, descrevem-se os procedimentos de coleta, os instrumentos utilizados, os aspectos éticos e os locais de pesquisa (seção 5.6 e subseções).

O capítulo encerra-se com a descrição detalhada das etapas de quantificação do hsa-miR-122-5p por RT-qPCR (seção 5.7), incluindo os fundamentos técnicos e os critérios de qualidade analítica adotados em conformidade com as diretrizes MIQE. O fluxo completo do estudo, da população elegível à análise estatística, está representado na Figura 1.

Figura 10 — Estudo observacional analítico transversal · HUGG · março–novembro 2025



Ambos os grupos compõem o universo potencial de participantes elegíveis para o estudo, conforme os critérios formalizados.

5.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Os critérios de inclusão e exclusão aplicados a cada grupo estão sistematizados, elaborados com base no Protocolo de diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções do Ministério da Saúde (Brasil, 2024) e nas Diretrizes da *Associação Europeia para o Estudo do Fígado* (EASL, 2021). O TCLE foi elaborado em conformidade com a Resolução CNS nº 466/2012, constante no Apêndice E deste trabalho, e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob CAEE 43185715.4.0000.5258, destaca-se que o critério de inclusão de idade mínima de 30 anos foi adotado para o GC.

5.4 CÁLCULO AMOSTRAL

Cálculo pelo teste t de Student independente para tamanho amostral foi realizado com base em dois grupos independentes (GC vs GHCV), com nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), poder estatístico de 80% ($1-\beta = 0,80$) e tamanho de efeito grande ($d = 0,80$) (Cohen, 1988; Jopling *et al.*, 2005).

Desta forma, para amostras independentes [$n = 2 \times ((Z_{\alpha/2} + Z_{\beta}) / d)^2$], obteve-se n mínimo de 25 participantes por grupo. Acrescida uma margem de 20% para perdas previstas por critérios de exclusão, o número corrigido foi de 63 participantes (Silva; Simon, 2005).

Embora as análises comparativas tenham sido conduzidas por métodos não paramétricos, em razão da distribuição assimétrica dos dados verificados, o cálculo amostral a princípio foi realizado com base no teste t de Student para amostras independentes, procedimento aceito na literatura quando dados pilotos sobre a variável de interesse não estão disponíveis (Cohen, 1988; Silva; Simon, 2005)

O tamanho do efeito $d = 0,80$ foi adotado com base em estudos anteriores que investigaram a expressão de hsa-miR-122-5p em contexto de lesão hepática crônica, nos quais diferença de grande magnitude foram consistentes postadas entre indivíduos saudáveis e pacientes com hepatopatia estabelecida (Jopling *et al.*, 2005)

A amostra efetivamente constituída ($n = 108$; $GC = 31$; $GHCv = 77$) superou o mínimo corrigido, assegurando, para a comparação global entre os grupos, o poder inicialmente projetado.

Para as análises estratificadas por estágio de fibrose no GHCv ($F0/F1 = 36$; $F2 = 15$; $F3/F4 = 27$; $n = 77$), o cálculo amostral não foi dimensionado para comparações entre subgrupos, uma vez que estes não constituem o desfecho primário. Tais análises estratificadas têm, portanto, caráter secundário e exploratório, e seus resultados devem ser interpretados com cautela quanto ao poder estatístico, particularmente no subgrupo $F2$, cujo tamanho é limítrofe para a detecção de efeitos de igual magnitude ($d = 0,80$).

O estadiamento da fibrose hepática dos participantes do GHCv foi realizado por métodos não invasivos, com base nos escores APRI e FIB-4, conforme preconizado pelo Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite C e Coinfecções do Ministério da Saúde (BRASIL, 2024).

5.5 AMOSTRA

No período de março de 2025 a março de 2026, foram atendidos 156 pacientes com hepatites virais no Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), dos quais 112 apresentavam infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV). Após a aplicação dos critérios de elegibilidade descritos na subseção anterior, foram incluídos 77 pacientes no grupo HCV (GHCv) e 31 indivíduos sem doença hepática no grupo controle (GC), totalizando 108 participantes.

5.6 COLETA E INSTRUMENTOS DE COLETA

O presente estudo utilizou dois instrumentos de pesquisa complementares e metodologicamente distintos, os quais operaram de forma integrada para a obtenção dos dados necessários ao alcance dos objetivos propostos:

1) Dados qualitativos: A coleta de dados foi realizada por meio de análise documental retrospectiva de prontuários médico digital e físico, com auxílio de formulário eletrônico de coleta, abrangendo variáveis sociodemográficas (sexo, faixa etária, etnia, escolaridade, etc), epidemiológicas, comportamentais, clínicas e de comorbidades. Todos os dados foram tabulados em planilha eletrônica Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2019)

2) Dados quantitativos : Os dados quantitativos foram provenientes da análise dos prontuários e extração dos resultados de exames laboratoriais realizados pelo paciente, em período recente (no máximo, últimos dois meses). Soma-se a isso, as análises moleculares de amostras biológicas, compreendendo a coleta de sangue periférico, o processamento laboratorial e a quantificação da expressão do hsa-miR-122-5'p por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR).

Todas as informações foram registradas em planilha eletrônica Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2019) para posterior análise estatística. Além disso, os procedimentos foram padronizados em Procedimento Operacional Padrão (POP) elaborado antes do início da fase experimental e documentado em Apêndice 4.

3) Processamento: As amostras foram obtidas por coleta de sangue periférico total em tubos BD Vacutainer® contendo EDTA como anticoagulante (cat. n° 367525), em volume padronizado conforme protocolo institucional. A coleta foi realizada exclusivamente por profissional habilitado, no ambulatório de Hepatologia do HUGG, em coleta dedicada à pesquisa, independente das coletas assistenciais de rotina.

Após a coleta, os tubos foram mantidos à temperatura de 2–8 °C e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa e Inovação em Análises Clínicas (LAPIA) em até uma hora, conforme protocolo de transporte estabelecido, a fim de preservar a integridade das amostras e prevenir a degradação do RNA.

No laboratório, as amostras foram centrifugadas para separação do plasma, que foi aliquotado em microtubos RNase-free e armazenado a –80 °C, até o momento de transporte, em lote, para o Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/Laboratórios de Biologia Molecular - IBRAG/UERJ. Os procedimentos de manipulação foram conduzidos em ambiente com controle de contaminação por RNases, com utilização de materiais certificados como livres de nucleases e adoção de técnicas assépticas em todas as etapas de manuseio.

4) Os exames bioquímicos: glicemia (mg/dL), insulina (µU/ml), ALT (UI/L), AST(UI/L); e hematológicos: Hemograma completo, foram em sua maioria, coletados pelo Laboratório central de análises clínicas do HUGG e registrados no sistema central (digitalizados), outros pacientes realizaram exames diretamente nos postos de saúde de sua região, os mesmos foram anexados ao prontuários (exames recentes realizados nos últimos 2 meses).

Para esses exames o Laboratório central utilizou-se do analisador hematológico ABX Petra XL 80 (Horiba Medical, Montpellier, França) para a contagem de plaquetas, com princípio de detecção por impedância elétrica/citometria de fluxo, conforme especificações do fabricante HORIBA MEDICAL. As dosagens bioquímicas foram realizadas em analisador bioquímico automatizado CM 250 (Wiener Lab, Rosário, Argentina).

5.6.1 Aspectos éticos

Todos os participantes receberam esclarecimento sobre os riscos e benefícios implícitos relacionados à participação na pesquisa, e por conseguinte, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em Apêndice E, aprovado pela Comissão Ético-Científica do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), aprovada com CAEE: 43185715.4.0000.5258 (Apêndice D).

A pesquisa foi realizada com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ. Código de Financiamento 001. A bolsa concedida financiou as atividades acadêmicas do pesquisador, não havendo conflito de interesses na condução, análise ou publicação dos resultados.

Em atendimento aos princípios éticos norteadores da pesquisa envolvendo seres humanos, estabelecidos pela Resolução CNS nº 466/2012 e pela Resolução CNS nº 510/2016, todos os participantes foram identificados no instrumento de coleta por meio de código alfanumérico, garantindo-se o anonimato e a confidencialidade das informações.

Ferramentas de inteligência artificial generativa (SciSpace, 2025; Anthropic, 2025; OpenAI, 2025) foram utilizadas como auxílio à busca bibliográfica, na formatação de quadros, tabelas e na verificação de sintaxe dos prompts utilizados no RStudio (R Core Team, 2025; Posit, 2025), sem interferência na análise, interpretação ou conclusão dos dados, sendo a redação final de responsabilidade exclusiva do autor.

5.6.2 Locais de pesquisa

Todas as análises de carga viral do HCV-RNA, bioquímica (AST, ALT, plaquetas), extração RNA e RT-qPCR em tempo Real foram realizadas,

respectivamente: 1)no Laboratório de Pesquisa em Imunologia e AIDS - (LAPIA), 2)Laboratório Central-HUGG, 3)Plataformas de Sequenciamento Sanger, Análises de Fragmentos/Microssatélites e NGS - FIOCRUZ e 4)Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes/Laboratórios de Biologia Molecular - IBRAG/UERJ

5.7 ETAPAS DO PROCESSOS DE QUANTIFICAÇÃO DE hsa-miR-122-5p

O fluxo metodológico da quantificação do hsa-miR-122-5p, começa com a extração do RNA plasmático, em seguida, a síntese de cDNA e depois a amplificação por RT-qPCR, e está apresentado de forma integrada na Figura 11, em conformidade com as diretrizes MIQE.

5.7.1 Extração e avaliação de qualidade

5.7.1.1 Extração de RNA total, incluindo microRNA, a partir de soro/plasma

A extração do RNA total a partir do plasma foi realizada com o kit miRNeasy Plasma Advanced (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo rigorosamente o protocolo do fabricante. A avaliação da qualidade e da quantidade do RNA extraído foi realizada por eletroforese automatizada em sistema TapeStation 4200 (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), com emprego de High Sensitivity RNA ScreenTape®, que possibilitou a análise do perfil de integridade.

A quantificação do RNA também foi avaliada pelo NanoDrop método Spectrophotometer (DeNovix DS-11, DE, USA), Faixa de medição, dsDNA: 0,75 - 37.500 ng/ μ , que estabelece proporções de pureza com alertas de contaminação. Somente as amostras que atenderam aos critérios de aceitação técnica estabelecidos no POP foram encaminhadas à etapa subsequente de síntese de cDNA.

Considerando que o RNA extraído de plasma humano é composto por microRNAs circulantes, os critérios espectrofotômetro de pureza ($A_{260}/A_{230} \geq 1,5$) não se aplicam, uma vez que valores sistematicamente reduzidos são esperados e não refletem contaminação (Fleige; Pfaffl, 2006; Becker *et al.*, 2010). Foram adotados critérios adaptados: razão A_{260}/A_{280} entre 1,6 e 2,2, concentração mínima de 5 ng/ μ L e, como critério funcional primário.

5.7.1.2 Síntese de cDNA por transcrição reversa

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total extraído, com utilização do kit miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN, cat. n.º 339340, Hilden, Alemanha), em equipamento Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Waltham, EUA).

O volume de reação e a diluição do cDNA foram executados conforme as especificações do fabricante, constantes no protocolo miRCURY LNA miRNA PCR Handbook (QIAGEN, 2019).

A etapa de transcrição reversa foi conduzida com controle de temperatura e tempo precisos, assegurando a eficiência da conversão do RNA em cDNA e a reprodutibilidade entre as corridas. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a realização das reações de PCR em tempo real (Qiagen, 2019).

5.7.1.3 Quantificação dos miRs - RT-qPCR em tempo real

A quantificação dos níveis de expressão do hsa-miR-122-5p foi realizada por RT-qPCR, com emprego do kit miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e ensaios LNA™ específicos para os microRNAs-alvo, no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, EUA).

Todas as amostras foram analisadas em duplicata, e o controle de qualidade das reações incluiu a utilização de controles cegos sem molde (NTC - *No Template Control*) em todas as corridas, além da análise da curva de dissociação (*melting curve*) ao término de cada reação, para confirmação da especificidade dos produtos amplificados. Amostras que apresentaram variação significativa entre as duplicatas foram submetidas à repetição da análise.

A obtenção de dados quantitativos confiáveis por RT-qPCR requer a utilização de um gene de referência endógeno que permita a normalização dos valores de expressão entre as amostras. A seguir, descreve-se o normalizador selecionado e os critérios que fundamentaram sua escolha.

5.7.1.4 Normalização

A normalização dos dados de expressão foi realizada pelo método ΔCt e $\Delta\Delta Ct$ (Livak; Schmittgen, 2001), utilizando o hsa-miR-103a-3p como controle endógeno de referência, previamente validado para amostras de plasma humano (Li *et al.*; 2016).

- $\Delta Ct = Ct(\text{hsa-miR-122-5p}) - Ct(\text{hsa-miR-103-3p})$: normalização pelo controle endógeno

- $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$: calibrador = média dos ΔCt do GC

- Fold Change = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$: expressão relativa em relação ao controle

A expressão relativa do hsa-miR-122-5p foi calculada pelo método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, utilizando o GC como calibrador, ou seja, incluído como referência externa para a análise da expressão do hsa-miR-122-5p.

A análise dos dados brutos de amplificação foi conduzida com o software StepOne™ (Applied Biosystems, versão 2.3). Os resultados foram expressos em *fold-change* em relação ao GC, e os valores de Ct foram registrados e armazenados em planilha eletrônica estruturada, com os demais dados do estudo.

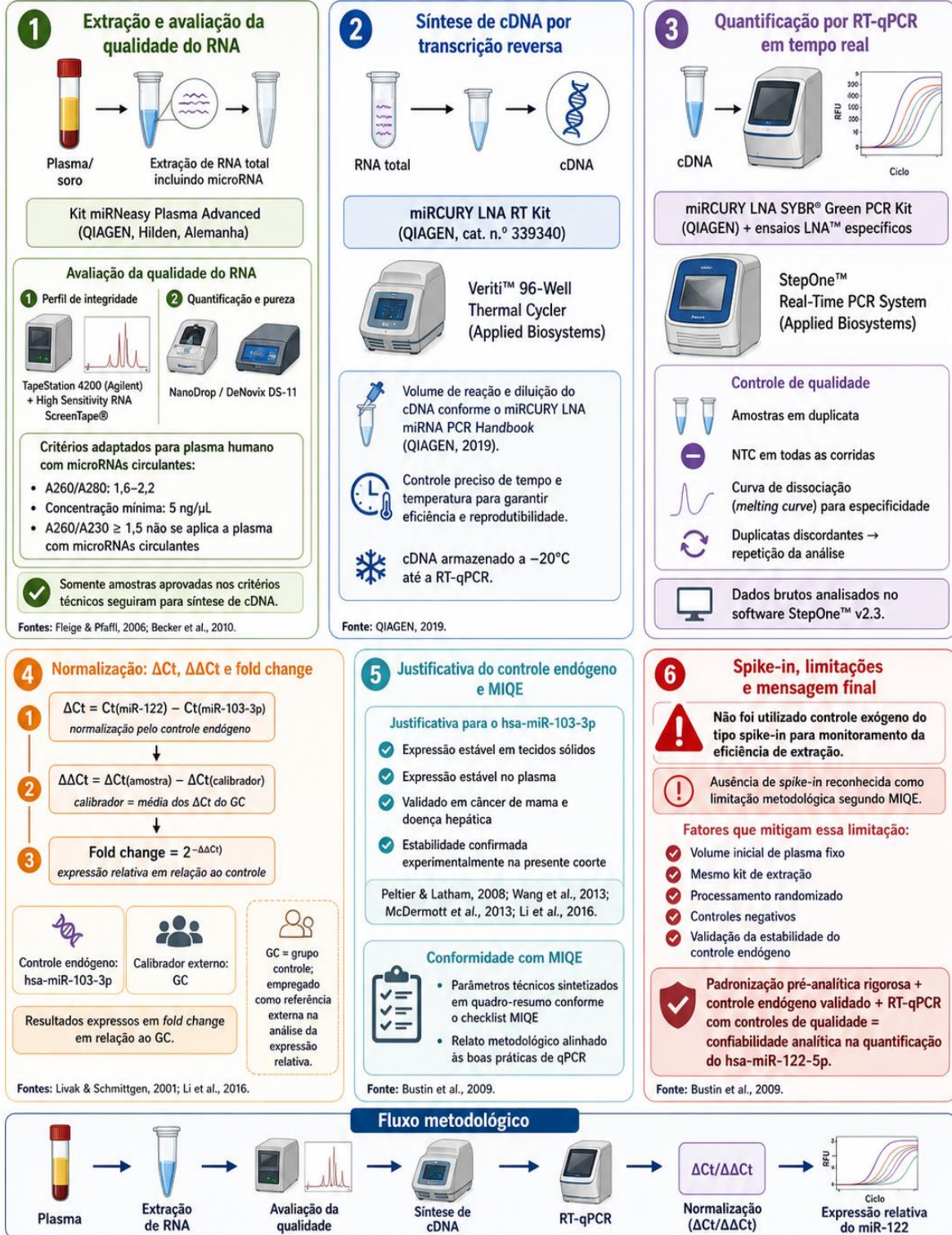
O hsa-miR-103a-3p foi selecionado como controle endógeno por apresentar expressão estável em tecidos sólidos (Peltier; Latham, 2008), no plasma (Wang *et al.*, 2013) e ter sido previamente validado em estudos em câncer de mama (McDermott *et al.*, 2013) e na doença hepática (Li *et al.*, 2016). Além disso, optou-se por adotar o hsa-miR-103a-3p, pois a estabilidade desse controle endógeno foi confirmada experimentalmente nas amostras da presente coorte, conforme descrito na seção 5.3.

A descrição do normalizador adotado integra o conjunto de informações exigidas pelas diretrizes internacionais de boas práticas em experimentos de PCR quantitativo. A seguir, apresenta-se o quadro-resumo elaborado em conformidade com as recomendações do guideline MIQE.

Figura 11 : PROCESSOS DE DE QUANTIFICAÇÃO hsa-miR-122-5p

Quantificação do hsa-miR-122-5p em plasma por RT-qPCR

Extração, avaliação da qualidade, síntese de cDNA, RT-qPCR, normalização e controle de qualidade



Fluxo metodológico

Plasma → Extração de RNA → Avaliação da qualidade → Síntese de cDNA → RT-qPCR → Normalização (ΔCt/ΔΔCt) → Expressão relativa do miR-122

Referências resumidas:

Fleige & Pfaffl, 2006; Becker et al., 2010; QIAGEN, 2019; Livak & Schmittgen, 2001; Li et al., 2016; Peltier & Latham, 2008; Wang et al., 2013; McDermott et al., 2013; Bustin et al., 2009.

Fonte: Adaptação do autor

5.7.1.5 Quadro-Resumo MIQE⁵

Os parâmetros técnicos adotados na execução da RT-qPCR para quantificação do hsa-miR-122-5p estão sintetizados no Quadro A, elaborado em conformidade com o checklist das diretrizes MIQE (Bustin *et al.*, 2009), conforme apresentado em : APÊNDICE A .

5.7.1.6 Spike-in

Não foi utilizado controle exógeno do tipo *spike-in*⁶ para monitoramento da eficiência de extração. Entretanto, a padronização rigorosa das etapas pré-analíticas, a inclusão de controles negativos e a validação do controle endógeno asseguram a confiabilidade das análises, apesar da ausência de *spike-in* ser reconhecida como limitação metodológica, conforme preconizado pelas diretrizes MIQE⁷ (Bustin *et al.*, 2009).

Apesar disso, a padronização rigorosa das etapas pré-analíticas (volume inicial de plasma fixo, uso do mesmo kit de extração, processamento randomizado) e a validação da estabilidade do controle endógeno mitigam potenciais variações técnicas e asseguram a confiabilidade das análises.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis qualitativas foram descritas por frequências absolutas (n) e relativas (%), e as variáveis quantitativas por mediana e intervalo interquartil (IIQ). A normalidade das variáveis quantitativas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ($p < 0,05$), caso confirme a distribuição assimétrica em todos os grupos, justifica os testes não paramétricos.

Para a verificação de homogeneidade entre o GC e o GHCV nas variáveis demográficas, utilizou-se o teste de Mann-Whitney (MW) para a variável contínua idade e o teste qui-quadrado de Pearson para a variável categórica sexo.

⁵ O checklist MIQE apresentado em Apêndice contempla todos os itens essenciais aplicáveis ao desenho experimental adotado. Itens classificados como desejáveis, como o uso de controle exógeno do tipo spike-in, foram reconhecidos como limitações metodológicas, sem prejuízo da validade das análises realizadas

⁶ O spike-in é uma molécula (geralmente, um miRNA sintético ou RNA de uma espécie diferente) adicionada a todas as amostras de uma vez, antes de qualquer etapa de extração, transcrição ou amplificação. Essa molécula é **conhecida**, ou seja, tem uma sequência específica e pode ser quantificada de forma independente.

Para as variáveis escolaridade e etnia, cuja distribuição apresentou células com frequência esperada inferior a cinco, aplicou-se o teste qui-quadrado com simulação de Monte Carlo ($B = 10.000$ permutações; $\text{set.seed} = 42$).

As análises estatísticas foram conduzidas em dois níveis hierárquicos. No primeiro nível, realizou-se a comparação global entre GC e GHCV para cada variável laboratorial e molecular mediante o teste de MW bicaudal, após verificação prévia da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$). O tamanho de efeito foi estimado pelo coeficiente r de Wilcoxon [$r = |Z|/\sqrt{N}$], segundo Cohen (1988).

Para comparação dos marcadores hepáticos (AST, ALT, plaquetas, APRI e FIB-4) entre os quatro subgrupos independentes (GC, F0/F1, F2 e F3/F4), utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis⁸ (KW), com comparações múltiplas *post-hoc* com correção de Bonferroni ($\alpha' = 0,0083$ para seis comparações).

O tamanho do efeito foi estimado pelo $\eta^2 = (H - k + 1)/(n - k)$, onde H é a estatística de KW, k o número de grupos e n o total amostral. Valores extremos foram mantidos, dado que o teste opera sobre postos.

Para comparação da expressão do hsa-miR-122-5p entre os subgrupos de estadiamento de fibrose hepática (F0/F1, F2 e F3/F4) foram realizados os testes de KW, com comparações *post-hoc* ($\alpha' = 0,0167$ para três comparações simultâneas).

O GC foi excluído desta análise por razão de dependência matemática: como calibrador externo do método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, sua inclusão confundiria o papel de calibrador com o de observação independente, tornando a comparação estatisticamente inválida, uma vez que todos os valores de expressão relativa do GHCV são calculados em referência ao GC.

Nessa segunda função, os valores clínicos e laboratoriais do GC (incluindo AST, ALT, Plaquetas, APRI e FIB-4) foram utilizados nas comparações estatísticas para caracterização do perfil de normalidade e avaliação das diferenças entre os grupos.

As correlações entre hsa-miR-122-5p e os marcadores hepáticos foram avaliadas separadamente para GC e GHCV pelo coeficiente de correlação de

⁸ **Kruskal-Wallis + Dunn:** a correção é **estrutural** ao próprio teste *post-hoc*, exigida para controlar o erro Tipo I nas comparações múltiplas planejadas entre grupos

Spearman⁹ (ρ), com intervalos de confiança de 95% estimados por transformação z de Fisher.

A acurácia diagnóstica foi avaliada por curva ROC (Receiver Operating Characteristic), com cálculo da área sob a curva (AUC) e intervalo de confiança de 95% pelo método DeLong. O ponto de corte ótimo foi determinado pelo Índice de Youden (maximização de sensibilidade e especificidade – 1).

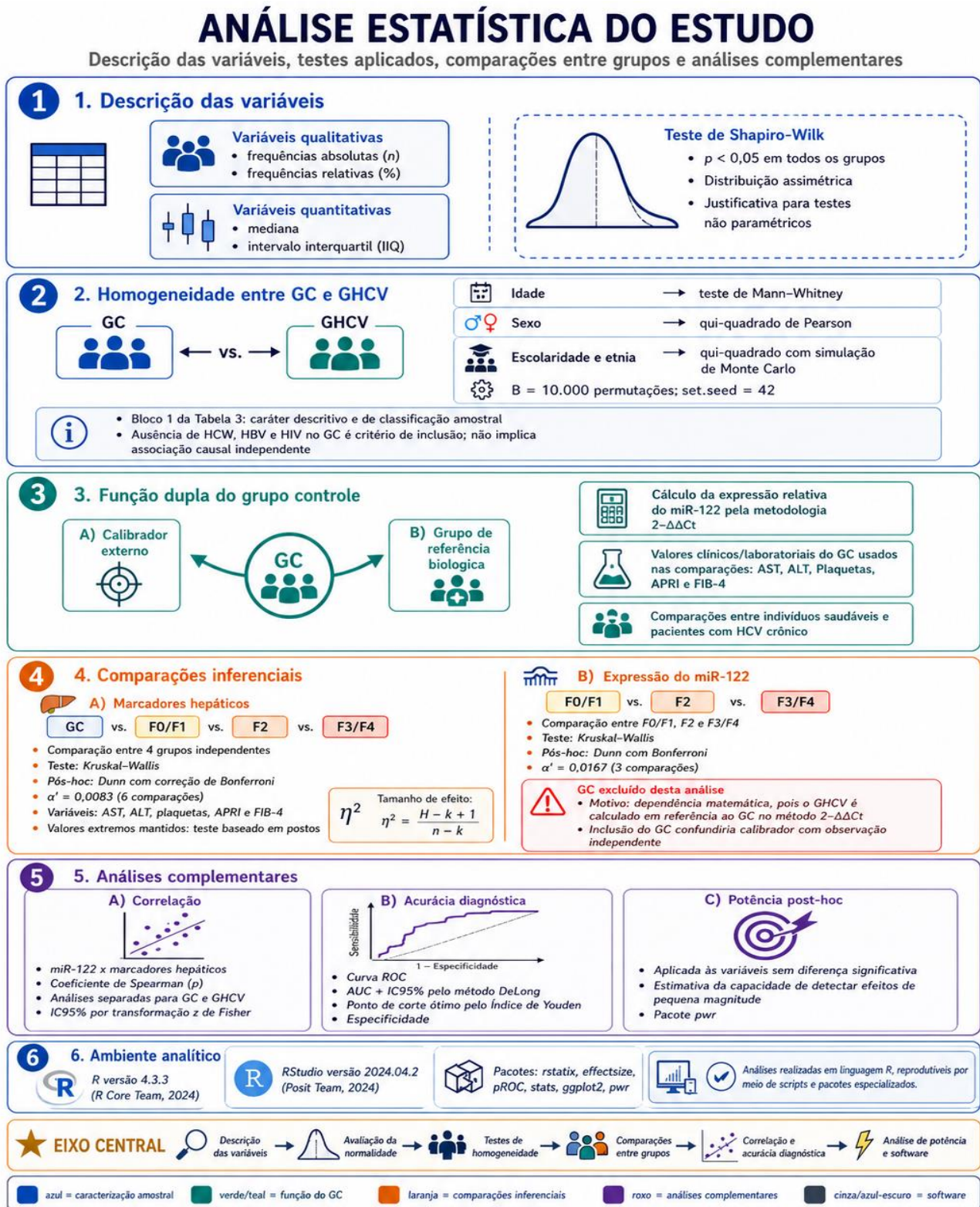
Como os grupos de doença foram definidos utilizando critérios clínicos sem confirmação histológica ou elastografia, as análises de curva ROC refletem o desempenho discriminatório contra diagnósticos clinicamente suspeitos. Biomarcadores com AUC = 1,000 podem refletir sobreajuste, sendo recomendada validação em estudos maiores.

Para as variáveis sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos, foi realizada análise de potência *post-hoc* para estimar a capacidade do teste em detectar efeitos de pequena magnitude, utilizando o pacote pwr (Champely, 2020) no software R.

Todas as análises foram conduzidas no software R (versão 4.3.3; R Core Team, 2024), por meio dele e no ambiente RStudio (versão 2024.04.2; Posit Team, 2024), utilizando os pacotes rstatix (Kassambara, 2023), effectsize (Ben-Shachar *et al.*, 2023), pacote pROC (Robin *et al.*, 2011), stats (R Core Team, 2024) e ggplot2 (Wickham, 2016).

⁹ **Correlações de Spearman:** são análises **exploratórias** sem hipótese prévia específica, contexto exatamente descrito por Perneger (1998) como aquele em que a correção é inadequada

Figura 12: Análise estatística hsa-miR-122-5p e fibrose hepática no HCV



Referências dos pacotes (principais): rstatix (Kassambara, 2023); effectsize (Ben-Shachar et al., 2020); pROC (Robin et al., 2011); stats (R Core Team, 2024); ggplot2 (Wickham, 2016); pwr (Champely, 2020).

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

No período de março a novembro de 2025, foram atendidos no Ambulatório de Hepatologia do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), Rio de Janeiro, 112 pacientes com infecção crônica pelo HCV, independentemente do genótipo viral ou da presença de coinfeções.

Desses, 35 amostras não foram aproveitadas: 23 por carga viral (CV) indetectável, 5 por hemólise, 7 por erros pré-analíticos (descarte após realização do HCV-RNA ou volume insuficiente). Constituiu-se, assim, o grupo HCV (GHCV) com 77 participantes, ao qual se somou um grupo controle (GC) de 31 indivíduos sem doença hepática, totalizando 108 participantes.

A Tabela 1 apresenta as características demográficas por grupo. Os grupos não diferiram significativamente quanto ao sexo ($p = 0,255$) nem quanto à etnia autodeclarada (teste exato de Fisher com simulação de Monte Carlo, $p = 0,132$), observando-se maior frequência de brancos no GC (48,4%; $n = 15$) e de pardos no GHCV (54,5%; $n = 42$). A amostra foi predominantemente feminina (59,3%; $n = 64$), com proporção feminina superior no GC (67,7%; $n = 21$) à do GHCV (55,8%; $n = 43$).

Não houve diferença significativa quanto à idade (Mann-Whitney, $p = 0,059$): a mediana foi de 56,2 anos (IIQ 47–67) no GHCV e de 57,3 anos (IIQ 50–65) no GC [amostra total: 56,5 anos; IIQ 47–67], com concentração dos participantes do GHCV nas faixas de 51 a 80 anos (66,2%; $n = 51$).

Quanto à escolaridade, observou-se diferença estatisticamente significativa (qui-quadrado com simulação de Monte Carlo, $p < 0,001$): o GC apresentou maior proporção de indivíduos com nível superior (54,8%; $n = 17$) que o GHCV (10,4%; $n = 8$), no qual predominaram os níveis fundamental e médio.

Os grupos foram pareados entre idade e sexo conforme a tabela abaixo:

Tabela 1 — Características demográficas e verificação de homogeneidade entre GC e GHCV

Idade	GC(n=31)	GHCV(n=77)	Total (n=108)	p-valor
18-30	1 (3,25%)	3 (3,9%)	4 (3,7%)	
31-40	2 (6,5%)	4 (5,2%)	6 (6,4%)	
41-50	5 (16,1%)	18 (23,4%)	23 (21,1%)	
51-60	11 (35,5%)	23 (29,9%)	34 (31,2%)	
61-70	8 (25,8%)	13 (16,9%)	21 (19,2%)	
71-80	4 (12,9%)	15 (19,5%)	19 (17,4%)	
+80	0 (0,0%)	1 (1,3%)	1 (0,9%)	
Mediana(IQ)	57,3 (50,65)	56,2 (47,67)	56,5 (47,67)	p=0,059
Sexo, n (%)				p = 0,255
Fem., n (%)	21 (67,7%)	44,2 (55,8%)	64 (59,3%)	
Masc., n (%)	10 (32,3%)	34 (44,2%)	44 (40,7%)	
Escolaridade				p=<0,001
Analfabeto	0 (0,0%)	1 (1,3%)	1 (0,9%)	
1° Incompleto	1 (3,2%)	18(24,4%)	19 (17,6%)	
1° Completo	4 (12,9%)	15 (19,5%)	19 (17,6%)	
2° Incompleto	0 (0,0%)	7 (9,1%)	7 (6,5%)	
2° Completo	7 (22,6%)	26 (33,3%)	23 (30,3%)	
Sup. incomp.	2 (6,5%)	2 (2,6%)	4 (3,7%)	
Superior	17 (54,8%)	8 (10,4%)	25 (23,1%)	
Etnia, n (%)				p=0,132 ⁴
Branca	15 (48,4%)	21 (27,3%)	36 (33,3%)	
Preta	4 (12,9%)	10 (13%)	14 (13%)	
Parda	12 (38,7%)	42 (54,5%)	54 (50%)	
Amarela	0 (0,0%)	4 (5,2%)	4 (3,7%)	
Indígena	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

Fonte: Elaborado pelo autor (2025). **Nota:** GC = GC; GHCV = Grupo Hepatite C Crônica; DP = desvio padrão; n = frequência absoluta; % = frequência relativa calculada sobre o total do grupo. ¹ Teste de MW (distribuição não normal confirmada por Shapiro-Wilk, $\alpha = 0,05$). ² Teste qui-quadrado de Pearson. ³ Teste qui-quadrado com simulação de Monte Carlo (B = 10.000) - células com frequência esperada < 5. ⁴ Teste de Fisher Exact com correção de Monte Carlo - células com frequência esperada < 5. Estatisticamente significativo (p < 0,05).

A Tabela 2 apresenta as características epidemiológicas, comportamentais e clínicas dos participantes, organizadas em três blocos: (1) vias de transmissão e

exposição de risco; (2) comportamentos de risco; e (3) comorbidades e coinfeções. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste qui-quadrado de Pearson quando todas as frequências esperadas foram ≥ 5 e pelo teste exato de Fisher na presença de caselas com frequência esperada < 5 .

No primeiro bloco (vias de transmissão e exposição de risco), apenas o antecedente de transfusão sanguínea apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos [GC: 9,7% (n = 3) vs. GHCV: 28,6% (n = 22); p = 0,035]. As demais variáveis, uso de drogas ilícitas injetáveis [0,0% (n = 0) vs. 5,2% (n = 4); p = 0,323] e parceiro(a) sexual com HCV [0,0% (n = 0) vs. 11,7% (n = 9); p = 0,057], não atingiram significância estatística, embora com frequências superiores no GHCV.

No segundo bloco (comportamentos de risco), observou-se diferença estatisticamente significativa para uso de droga por via inalatória [0,0% (n = 0) vs. 15,6% (n = 12); p = 0,018], tabagismo [9,7% (n = 3) vs. 23,4% (n = 18); p = 0,015] e etilismo leve (< 20 g/dia) [32,3% (n = 10) vs. 28,6% (n = 22); p = 0,011]. Enquanto o uso de droga inalatória e o tabagismo foram mais frequentes no GHCV, o etilismo leve mostrou-se mais frequente no GC. O etilismo moderado/grave (≥ 20 g/dia) [0,0% (n = 0) vs. 11,7% (n = 9); p = 0,057] não atingiu significância estatística.

Tabela 2 — Fatores de risco, exposição epidemiológica e características clínicas segundo grupo de estudo, HUGG, Rio de Janeiro, 2025

	GC(n=31)	GHCv(n=77)	Total (n=108)	p- valor
Bloco 1 - Vias de transmissão e exposição de risco				
Transfusão sanguínea	3 (9,7%)	22 (28,6%)	25(23,1%)	0,035 ¹
Uso de drogas ilícitas injetáveis	0 (0,0%)	4 (5,2%)	4(3,7%)	0,323 ²
Parceiro(a) sexual com HCV	0 (0,0%)	9 (11,7%)	9(8,3%)	0,057 ²
Bloco 2 - Comportamentos de risco				
Droga Inalatória, n (%)	0(0,0%)	12(15,6%)	12(11,0%)	0,018 ²
Tabagismo, n (%)	3(9,7%)	18(23,4%)	21(19,4%)	0,104 ¹
Etilismo leve (<20 g/dia)	10(32,3%)	22(28,6%)	32(29,6%)	0,704 ¹
Etilismo mod/grave (≥20 g/dia)	0(0,0%)	9(11,7%)	9(8,3%)	0,057 ²
negar vícios	18(58%)	17(22%)	35(32,4%)	
Bloco 3 - Comorbidades e coinfeções				
Diabetes mellitus, n (%)	3 (9,7%)	18(23,4%)	21(19,4%)	0,104 ¹
História de tuberculose	0 (0,0%)	2 (2,6%)	2 (1,9%)	1,000 ²
Coinfeção HIV, n (%)	0 (0,0%)	2(2,6%)	2 (1,9%)	1,000 ²

Nota: GC = grupo controle; GHCv = grupo hepatite C crônica; n = frequência absoluta; % = frequência relativa sobre o total de cada grupo; HIV = vírus da imunodeficiência humana. ¹ Teste qui-quadrado de Pearson (frequência esperada ≥ 5). ² Teste exato de Fisher (ao menos uma casela com frequência esperada < 5). Categorização do etilismo conforme EASL (2018). Do total, 18 participantes do GC (45,2%) e 17 do GHCv (22,1%) negaram qualquer hábito (tabagismo, etilismo ou uso de drogas). Valores de p recalculados sobre N = 108; confirmar na saída do R.

No terceiro bloco (comorbidades e coinfeções), nenhuma variável atingiu significância estatística ($p > 0,05$). A prevalência de diabetes mellitus foi de 23,0% no GHCv ($n = 18$) e de 9,7% no GC ($n = 3$; $p = 0,212$). História de tuberculose foi identificada em 2,6% do GHCv ($n = 2$) e em nenhum participante do GC ($p = 0,521$).

A coinfeção por HIV foi identificada em 2,6% do GHCv ($n = 2$) e em nenhum participante do GC ($p = 0,077$), conforme a Tabela 2.

A estratégia analítica adotou dois níveis complementares de comparação. No primeiro nível, procedeu-se à comparação global entre o GC ($n = 31$) e o GHCv ($n = 77$), para cada variável laboratorial e molecular, mediante o teste de Mann-Whitney (MW) bicaudal (Tabela 3).

A opção pelos testes não paramétricos fundamentou-se na avaliação prévia da normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$), que ele indica evidências contra a hipótese de distribuição normal. O tamanho de efeito foi estimado pelo coeficiente r para o teste de Mann-Whitney [$r = |Z|/\sqrt{N}$], interpretado segundo Cohen (1988): pequeno ($r \geq 0,10$), médio ($r \geq 0,30$) e grande ($r \geq 0,50$).

Tabela 3— Análise descritiva e comparação entre GC e GHCV por variável laboratorial e molecular pelo teste de Mann-Whitney

Variável	GC Mediana (Q1–Q3)	GHCV Mediana (Q1–Q3)	Z	r	p (Mann-Whitney)
APRI (escore)	0,21 (0,18–0,31)	0,57 (0,31–1,68)	–6,032	0,580	$p < 0,001$
FIB-4 (escore)	0,20 (0,13–0,31)	0,86 (0,37–3,27)	–6,300	0,606	$p < 0,001$
miR-122 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ²	1,09 (0,17–4,31)	4,48 (0,65–12,84)	–3,049	0,293	$p = 0,002$
AST (U/L)	22 (20–28)	52 (31–86)	–6,282	0,604	$p < 0,001$
ALT (U/L)	25 (22–28)	55 (38–99)	–6,009	0,578	$p < 0,001$
Plaquetas .($\times 10^3/\mu L$)	270,000 (240,0–330,0)	212.000 (130,0–263,0)	+3,956	0,381	$p < 0,001$

Fonte: Elaborado pelo autor (2025). **Nota:** ¹ hsa-miR-122-5p expresso como expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), método Livak & Schmittgen (2001). W = estatística do teste de MW; r = tamanho de efeito de Wilcoxon ($r = Z/\sqrt{N}$); referências para r: pequeno $\geq 0,10$; médio $\geq 0,30$; grande $\geq 0,50$ (Cohen, 1988). ²Normalidade avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$); todos os pares apresentaram pelo menos uma variável com distribuição não normal, justificando o uso do MW

A Tabela 3 apresenta a análise descritiva e comparativa entre o GC e o GHCV. Todas as variáveis analisadas, hsa-miR-122-5p, marcadores bioquímicos e escores de fibrose, apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Segundo os critérios de Cohen (1988), o tamanho de efeito foi grande para FIB-4 ($r = 0,603$), AST ($r = 0,602$), APRI ($r = 0,578$) e ALT ($r = 0,576$); médio para plaquetas ($r = 0,379$); e pequeno para o hsa-miR-122-5p ($r = 0,292$).

A Tabela 4 apresenta a correlação de Spearman entre a carga viral do HCV e a expressão de hsa-miR-122-5p no GHCV.

A ausência de correlação também foi observada nos diferentes estágios de fibrose hepática: F0/F1 ($n = 35$; $p = +0,213$; IC95%: $-0,13$ a $+0,51$; $p = 0,219$), F2 ($n = 15$; $p = -0,048$; IC95%: $-0,55$ a $+0,48$; $p = 0,865$) e F3/F4 ($n = 27$; $p = +0,050$; IC95%: $-0,34$ a $+0,42$; $p = 0,804$). Em todos os casos, o intervalo de confiança incluiu o zero, e a magnitude das correlações foi negligenciável, segundo Mukaka (2012).

Tabela 4— Correlação de Spearman entre carga viral e hsa-miR-122-5p no (GHCV)

Análise	ρ de Spearman	IC95%	p-valor	Magnitude
GHCV global	+0,068	-0,16/+0,29	0,557	Negligenciável
F0/F1	+0,213	-0,12/+0,51	0,219	Fraca
F2	-0,048	-0,55/+0,48	0,865	Negligenciável
F3/F4	+0,050	-0,34/+0,42	0,804	Negligenciável

Fonte: Elaborado pelo autor (2025) Nota: Classificação de magnitude conforme Cohen (1988), adaptada para coeficientes de correlação por Mukaka (2012)

6.2 MARCADORES HEPÁTICOS

O segundo nível, foi adotado para à análise por estadiamento de fibrose hepático, comparando os quatro grupos (GC, F0/F1, F2 e F3/F4) mediante o teste de KW, seguido de comparações múltiplas *post-hoc* (Tabelas 5, 6 e 7). (Field, 2009; Hollander, Wolfe & Chicken, 2013).

NORMALIDADE PARA O ESTADIAMENTO DE FIBROSE HEPÁTICO

A normalidade de cada variável foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$) em cada grupo de estadiamento. A AST e a ALT violaram o pressuposto de normalidade em todos os subgrupos de fibrose, mantendo distribuição normal apenas no GC.

O APRI e o FIB-4 apresentaram distribuição não normal em F0/F1 e F3/F4, permanecendo normais no GC e em F2. O hsa-miR-122-5p exibiu distribuição não normal em todos os subgrupos. As plaquetas, por sua vez, violaram a normalidade no GC e em F0/F1, sendo normais em F2 e F3/F4.

Diante da violação do pressuposto em ao menos um grupo para todas as seis variáveis, adotou-se o teste de Kruskal-Wallis para as comparações globais, seguido de teste *post-hoc* para as comparações pareadas (Field, 2009; Hollander; Wolfe; Chicken, 2013).

6.2.1 AST

Diante da violação do pressuposto de normalidade, em dois dos quatro grupos, optou-se pela aplicação do teste de KW para a comparação global, seguido de teste de *post-hoc* de Dunn, conforme a tabela 5 abaixo :

Tabela 5 – Comparações múltiplas *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni para a variável AST (U/L) entre grupos de estadiamento de fibrose hepático.

Comparações	Z	p bruto	p ajustado	r	Magnitude	Sig
GC vs F0/F1	-2,466	0,0136	0,0819	0,441	Médio	Não sig
GC vs F2	-4,884	< 0,001	<0,001	0,786	Grande	Sig ¹
GC vs F3/F4	-8,1569	< 0,001	<0,001	0,856	Grande	Sig ¹
F0/F1 vs F2	-3,0507	0,0022	0,0137	0,622	Médio	Não sig
F0/F1 vs F3/F4	-6,0290	< 0,001	<0,001	0,821	Grande	Sig ¹
F2 vs F3/F4	-1,7987	0,0720	0,432	0,624	Pequeno	Não sig

Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Nota: p ajust. = p-valor corrigido pelo método de Bonferroni para 6 comparações simultâneas ($\alpha' = 0,05/6 = 0,0083$). Critério de significância: p ajust. < 0,05. r = correlação bisserial de postos [$r = |Z|/\sqrt{(n_i + n_j)}$]; critérios: pequeno < 0,10; médio 0,10–0,30; grande > 0,30. ¹ p ajust. < 0,05 (significativo após correção). ² p bruto < 0,05, não sustentado após correção múltipla (tendência). ³ r = 0,671 calculado com $N_{\text{par}} = n_{\text{GC}} + n_{\text{F3/F4}} = 47$. Análise realizada pelo pacote *dunn.test*, R v4.3.3. Referências: Cohen, 1988; Tomczak; Tomczak, 2014.

A AST apresentou distribuição assimétrica em todos os grupos (Shapiro-Wilk: $p < 0,05$), com presença de valores extremos especialmente no grupo F3/F4 (máximo: 666 U/L).

Justificando o uso do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O grupo GC apresentou distribuição normal ($W = 0,9526$; $p = 0,198$). O teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos [$H(3) = 77,957$; $gl = 3$; $p < 0,001$; $\eta^2_H = 0,72$], indicando efeito de grande magnitude, com o estadiamento da fibrose hepática explicando aproximadamente 72% da variância total nos níveis séricos de AST (Tomczak; Tomczak, 2014).

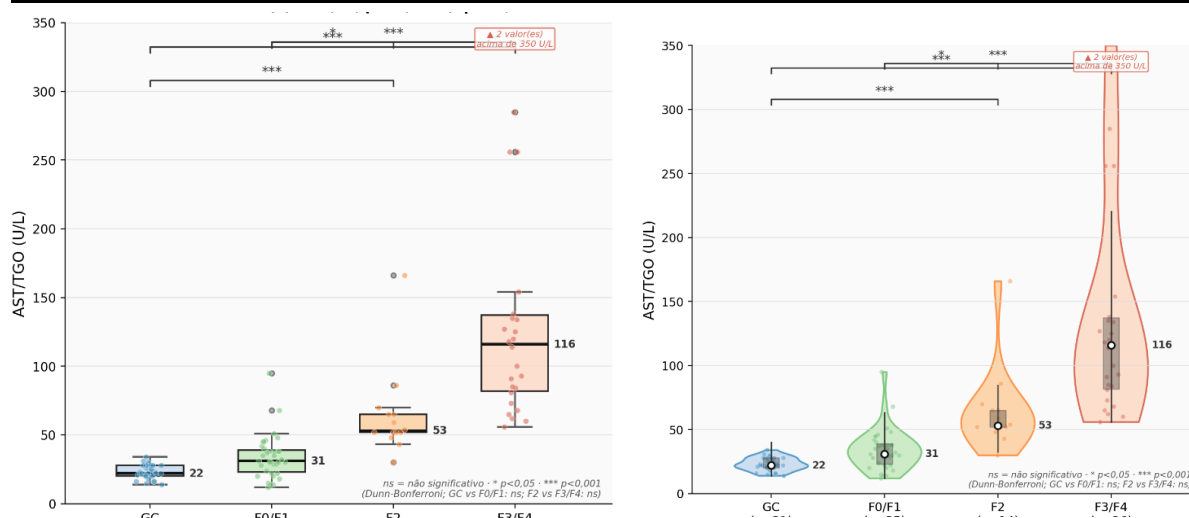
As medianas de AST apresentaram padrão progressivo e crescente conforme o estadiamento fibrótico: GC = 22,0 (IIQ: 20–28,0) U/L; F0/F1 = 30,5 (IIQ: 23–39) U/L; F2 = 53,0 (IIQ: 52,0–65,0) U/L; F3/F4 = 116,0 (IIQ: 81,0–137,0) U/L. Os postos médios foram compatíveis com esse gradiente ascendente: GC = 19,98; F0/F1 = 36,73; F2 = 56,78; F3/F4 = 68,38, sugerindo diferenciação progressiva entre os grupos entre os grupos com o agravamento da fibrose.

As comparações *post-hoc* pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni ($\alpha' = 0,0083$; seis comparações simultâneas) revelaram diferenças estatisticamente significativas em três dos seis pares avaliados.

GC vs. F2, GC vs. F3/F4 e F0/F1 vs. F3/F4 apresentaram diferenças com tamanhos de efeito de grande magnitude.

As comparações GC vs. F0/F1, F0/F1 vs. F2 e F2 vs. F3/F4 não atingiram significância após correção múltipla, conforme apresentado na Tabela 5 e gráfico 1:

Gráfico 1— Distribuição quantitativa de AST no estadiamento de fibrose hepática



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

O boxplot (Gráfico 1) ilustra a dispersão reduzida no GC e o aumento progressivo da mediana e da amplitude interquartil nos grupos F2 e F3/F4. O gráfico de violino evidencia assimetria positiva em todos os grupos, com maior concentração de valores baixos e caudas superiores alongadas nos estágios mais avançados.

Igualmente observado para a AST, procedeu-se à análise dos níveis séricos da ALT, enzima igualmente utilizada como marcador de lesão hepatocelular. Os resultados referentes a esse parâmetro são apresentados a seguir.

6.2.2 ALT

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos [$H(3) = 67,469$; $gl = 3$; $p < 0,001$; $\eta^2_H = 0,62$], indicando efeito de grande magnitude, com o estadiamento da fibrose hepática explicando aproximadamente 62% da variância total nos níveis séricos de ALT (Tomczak; Tomczak, 2014). conforme a tabela 6 e gráfico 2 abaixo:

Tabela 6 – Comparações múltiplas post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni para ALT (U/L) segundo grupo de estadiamento de fibrose hepático.

Comparações	Z	p bruto	p ajustado	r	Magnitude	Sig
GC vs F0/F1	-2,4310	0,0150	0,0903	0,235	Pequeno	não sig ²
GC vs F2	-5,3666	< 0,001	< 0,001	0,519	Grande	Sig¹
GC vs F3/F4	-7,3848	< 0,001	< 0,001	0,714	0,856	Sig¹
F0/F1 vs F2	-3,5953	< 0,001	0,0019	0,348	Média	Sig¹
F0/F1 vs F3/F4	-5,3161	< 0,001	< 0,001	0,514	Grande	Sig¹
F2 vs F3/F4	-0,7112	0,4769	1,000	0,069	Negligenciável	Não sig

*Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Nota: p ajust. = p-valor corrigido pelo método de Bonferroni para 6 comparações simultâneas ($\alpha' = 0,05/6 = 0,0083$). Critério de significância: p ajust. < 0,05. r = correlação bisserial de postos [$r = |Z|/\sqrt{(n_i + n_j)}$]; critérios de magnitude: pequeno < 0,10; médio 0,10–0,30; grande > 0,30 (Cohen, 1988). ¹ p ajust. < 0,05 (significativo após correção de Bonferroni). ² p bruto < 0,05, não sustentado após correção múltipla (tendência). ALT máx. = 726 U/L no grupo F3/F4. Análise realizada pelo pacote *dunn.test*, R v4.3.3. Referências: Cohen, 1988; Tomczak; Tomczak, 2014 .

As medianas de ALT apresentaram padrão progressivo crescente: GC = 25,0 (IIQ: 22,0–28,8) U/L; F0/F1 = 36,0 (IIQ: 24,2–50,2) U/L; F2 = 69,0 (IIQ: 52,0–125,0) U/L; F3/F4 = 111,0 (IIQ: 73,0–159,0) U/L. Os postos médios confirmaram o gradiente ascendente: GC = 21,77; F0/F1 = 35,09; F2 = 62,17; F3/F4 = 64,50.

Notavelmente, os postos de F2 e F3/F4 apresentaram-se próximos entre si (62,17 vs. 64,50), indicando sobreposição das distribuições de ALT nesses dois estágios avançados de fibrose.

Os contrastes entre GC e F2, GC e F3/F4 e F0/F1 e F3/F4 apresentaram tamanhos de efeito grandes, com valores de r iguais a 0,519, 0,714 e 0,514, respectivamente. A comparação entre F0/F1 e F2 apresentou efeito de magnitude média (r = 0,348).

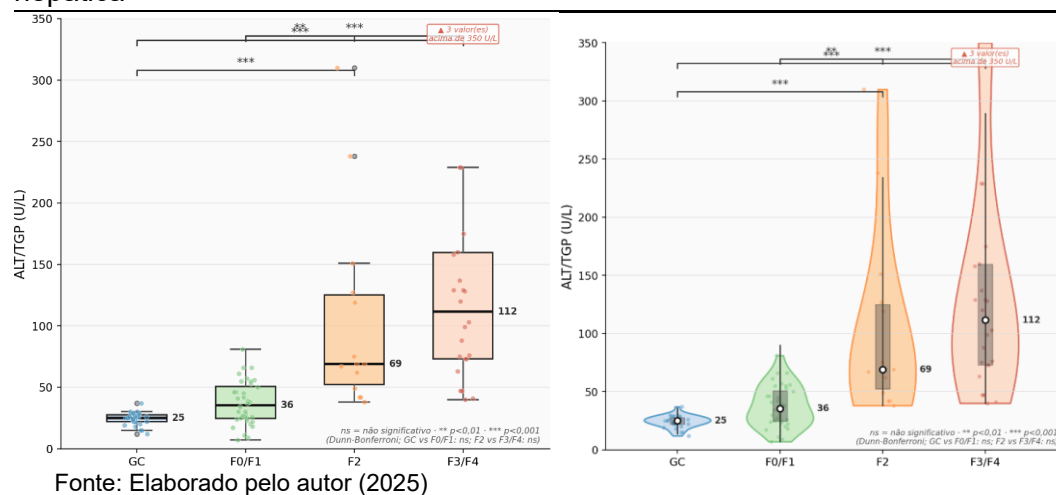
Os testes de *post-hoc* ($\alpha' = 0,0083$, 6 comparações: 0,05/6) evidenciaram diferenças estatisticamente significativas em quatro dos seis pares avaliados: GC vs. F2 , GC vs. F3/F4 , F0/F1 vs. F2 e F0/F1 vs. F3/F4 apresentaram diferenças com tamanhos de efeito de grande magnitude.

Não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre GC e F0/F1 (p ajustado = 0,0903; r = 0,235) ou entre F2 e F3/F4 (p ajustado = 1,000; r = 0,069). Esses resultados indicam ausência de evidência estatística de separação entre os estágios GC e F0/F1 e entre F2 e F3/F4 para a ALT após o controle das

comparações múltiplas, sendo compatíveis com sobreposição das distribuições nesses pares. (tabela 6; Gráfico: 2).

O padrão progressivo de elevação das medianas é ilustrado no Gráfico 2, de modo semelhante ao observado para a AST, na fase inicial (GC e F0/F1), observa-se aumento discreto da mediana com nítida sobreposição entre as duas distribuições.

GRÁFICO 2— Distribuição quantitativa de ALT no estadiamento de fibrose hepática



Na transição de F0/F1 para F2, observa-se aumento das medianas com maior amplitude interquartil e extensão dos valores adjacentes superiores.

Um valor extremo superior foi identificado no grupo F2 e mantido na análise, dado o uso de teste não paramétrico.

O gráfico de violino evidencia assimetria positiva em todos os grupos, com maior concentração de valores baixos nos grupos GC e F0/F1 e caudas superiores progressivamente mais extensas em F2 e F3/F4.

Analizados os marcadores enzimáticos, avalia-se a seguir o comportamento das plaquetas, parâmetro hematológico reconhecidamente associado ao grau de fibrose hepática e à presença de hipertensão portal

6.2.3 Plaquetas

O teste de KW evidenciou diferença estatisticamente significativa na contagem de plaquetas entre os quatro grupos ($H = 48,762$; $gl = 3$; $p < 0,001$).

Os postos médios¹⁰ apresentaram padrão decrescente conforme o estadiamento fibrótico: GC = 73,29 ; F0/F1 = 66,86 ; F2 = 45,71 ; F3/F4 = 21,00 As medianas foram, respectivamente, 270,0; 254,0; 200,0 e 113,0 × 10³/mm³.

O tamanho do efeito foi de grande magnitude ($\eta^2_H = 0,440$), indicando que aproximadamente 44% da variância total na contagem plaquetária é explicada pelo estadiamento da fibrose hepática (Tabela 7).

Tabela 7 – Comparações múltiplas *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni para plaquetas (10³/mm³) segundo grupo de estadiamento de fibrose hepática.

Comparações	z	p valor	p ajust.	r		Interp.
GC vs F0/F1	+0,126	0,900	1,000	0,017	Pequeno	Não sig.
GC vs F2	+2,7345	0,006	0,03749	0,263	Médio	sig. ²
GC vs F3/F4	+6,342	<0,001	<0,001	0,610	Grande	Sig. ¹
F0/F1 vs F2	+2,143	0,032	0,1923	0,206	Médio	Não sig.
F0/F1 vs F3/F4	+5,751	<0,001	<0,001	0,553	Grande	Sig. ¹
F2 vs F3/F4	+2,3961	0,016	0,099	0,231	Pequena	Não sig. ²

Fonte: Elaborado pelo autor. Nota: r = tamanho de efeito (correlação bisserial de postos): pequeno < 0,10; médio 0,10–0,30; grande > 0,30 (Cohen, 1988). p ajust. = p-valor corrigido pelo método de Bonferroni para seis comparações.¹ Sig. = p ajust. < 0,05 (significância mantida após correção). ² Tendência = p bruto < 0,05, mas p ajust. ≥ 0,05 (significância não sustentada após correção múltipla). – Não sig. = p bruto ≥ 0,05. Resultado global (): H = 33,118; gl = 3; p < 0,001; $\eta^2_H = 0,386$ (grande magnitude). Medianas: GC = 271,0; F0/F1 = 263,0; F2 = 210,0; F3/F4 = 113,0 × 10³/mm³. Análise realizada pelo pacote *dunn.test*, R v4.3.3 / RStudio. Referências: COHEN, 1988.

A comparação GC vs F2 apresentou significância estatística após ajuste de Bonferroni, com tamanho de efeito médio-grande, indicando que a trombocitopenia já se manifesta de forma detectável no estágio de fibrose moderada em relação ao grupo controle.

Em contraste, as comparações GC vs F3/F4 e F0/F1 vs F3/F4 foram altamente significativas (p ajustado < 0,0001), com tamanhos de efeito grandes, respectivamente), evidenciando clara separação entre os grupos extremos e confirmando a associação entre fibrose avançada e redução expressiva da contagem plaquetária, consistente com o desenvolvimento de hipertensão portal e hiperesplenismo.

Entre os estágios iniciais, GC vs F0/F1 não apresentou diferença significativa após ajuste, sugerindo que a contagem plaquetária não discrimina adequadamente

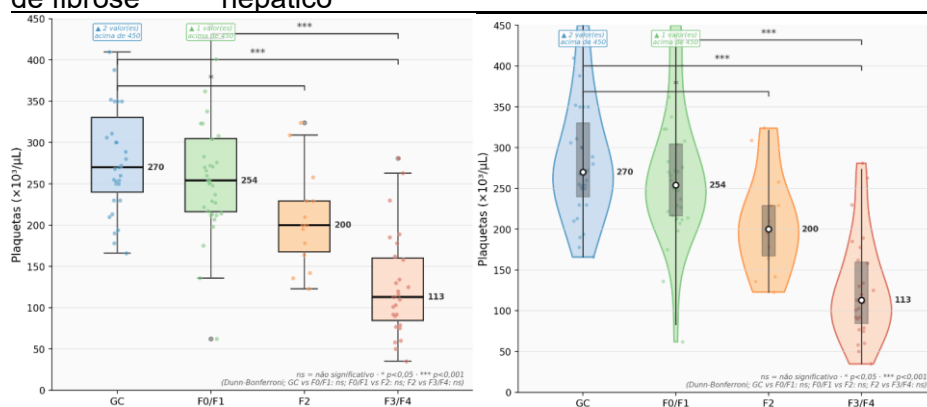
¹⁰ Ele converte todos os valores em postos (ranks) dentro da amostra total e depois calcula a média dos postos de cada grupo

indivíduos sem fibrose de pacientes com fibrose leve, possivelmente em razão da ausência de hipertensão portal clinicamente relevante nesse estágio.

De modo semelhante, F0/F1 vs F2 não atingiu significância após correção, refletindo sobreposição entre estágios adjacentes e progressão gradual sem ponto de inflexão abrupto.

Por fim, F2 vs F3/F4 apresentou significância apenas no p bruto, sem se manter após ajuste (p ajustado = 0,099), com tamanho de efeito médio-grande, sugerindo tendência biológica à diferenciação entre fibrose moderada e avançada, embora sem robustez estatística suficiente para resistir à correção para múltiplas comparações.

Gráfico 3— Distribuição quantitativa de Plaquetas no estadiamento de fibrose hepático



fonte: Elaborado pelo autor (2025)

O Gráfico 3 ilustra o padrão decrescente das medianas plaquetárias ao longo dos estágios de fibrose, em contraste com o padrão crescente observado para AST e ALT. Na fase inicial, a mediana do grupo F0/F1 é próxima à do GC, com ampla sobreposição entre as distribuições. Identificou-se um valor extremo inferior no grupo F0/F1, representando participante com contagem plaquetária abaixo da distribuição do grupo

A intermediária (F2), observa-se queda da mediana com deslocamento do intervalo interquartil para valores menores e amplitude interquartil elevada. Enquanto que a avançada (F3/F4), observa-se queda acentuada da mediana com reduzida sobreposição em relação aos grupos anteriores.

A contagem plaquetária, isoladamente, constitui indicador indireto de comprometimento fibrótico hepático, sendo sua integração com outros parâmetros clínicos. Nessa situação, apresentam-se a seguir os resultados referentes ao índice FIB-4.

6.3 ESCORES DE FIBROSE HEPÁTICO

6.3.1 FIB-4

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou diferença estatisticamente significativa nos valores do índice FIB-4 entre os quatro grupos classificados segundo o estadiamento de fibrose hepática [$H(3) = 78,525$; $gl = 3$; $p < 0,001$; $\eta^2_H = 0,763$], indicando efeito de grande magnitude, com o estadiamento da fibrose hepática explicando aproximadamente 76,3% da variância total nos valores do índice (Tomczak; Tomczak, 2014), conforme a Tabela 8 e o Gráfico 4.

As medianas do FIB-4 apresentaram padrão progressivo crescente conforme o estadiamento fibrótico: GC = 0,20; F0/F1 = 0,36; F2 = 1,39; F3/F4 = 4,33. Os postos médios confirmaram o gradiente ascendente entre os grupos, evidenciando separação crescente com o agravamento da fibrose.

Tabela 8 – Comparações *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni para o índice FIB-4 segundo estadiamento de fibrose hepática

Comparações	z	p valor	p ajust.	r		Interp.
GC vs F0/F1	-2,5750	0,0100	0,0601	0,254	Pequena	Não sig. ²
GC vs F2	-4,6080	< 0,001	< 0,001	0,454	Médio	Sig. ¹
GC vs F3/F4	-8,4025	< 0,001	< 0,001	0,828	Grande	Sig. ¹
F0/F1 vs F2	-2,6728	0,0075	0,0451	0,263	Pequena	Não sig. ²
F0/F1 vs F3/F4	-6,2124	< 0,001	< 0,001	0,612	Grande	Sig. ¹
F2 vs F3/F4	-2,3220	0,0202	0,1214	0,229	Pequena	Não sig.

Fonte: Elaborado pelo autor Teste de Dunn com correção de Bonferroni para 6 comparações ($\alpha' = 0,0083$). r = tamanho de efeito (correlação bisserial de postos): pequeno < 0,10; médio 0,10–0,30; grande > 0,30 ¹ p ajust. < 0,05 (significativo após correção). ² p bruto < 0,05, não sustentado após correção múltipla (tendência). ns não significativo.

³ r = 1,060: valor acima de 1,0 pode ocorrer na correlação bisserial de postos quando as distribuições são extremamente assimétricas; interpretado como efeito de magnitude muito grande. FIB-4 calculado por: [idade (anos) × AST (U/L)] / [plaquetas (10⁹/L) × √ALT (U/L)]. Análise realizada pelo pacote *dunn.test*, R v4.3.3 / RStudio.

Referências: Cohen, 1988.

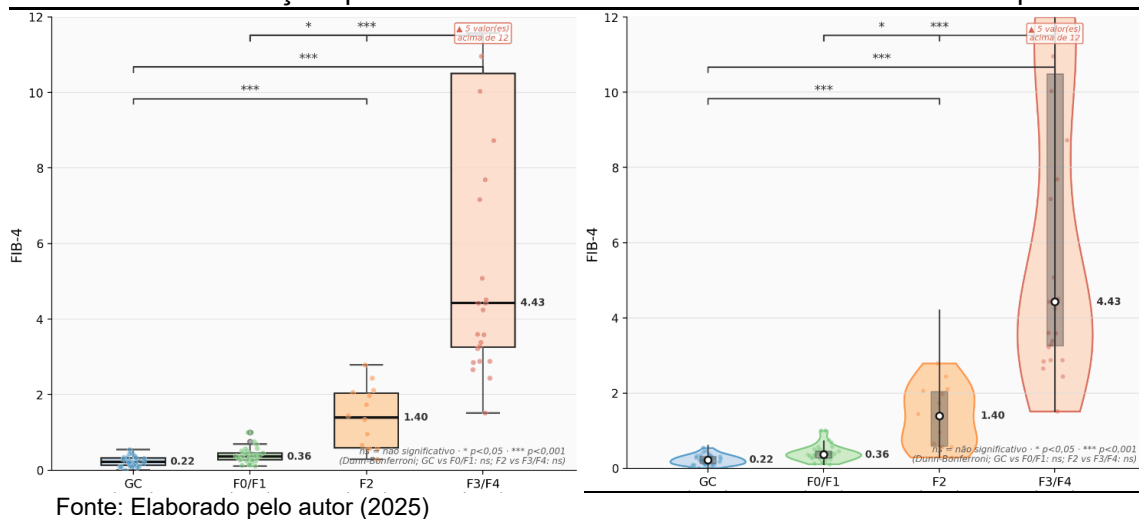
As comparações *post-hoc* pelo teste de Dunn com correção de Bonferroni ($\alpha' = 0,0083$; seis comparações simultâneas) revelaram diferenças estatisticamente significativas em três dos seis pares avaliados.

GC vs. F2 e GC vs. F3/F4 e F0/F1 vs. F3/F4 apresentaram diferenças com tamanhos de efeito de grande magnitude, evidenciando separação robusta entre o grupo controle e os estágios de fibrose significativa e avançada.

A comparação GC vs. F0/F1 não atingiu significância após correção múltipla, com tamanho de efeito médio, indicando sobreposição entre indivíduos sem doença hepática e pacientes com fibrose leve.

As comparações F0/F1 vs. F2 e F2 vs. F3/F4 também não atingiram o critério de significância após correção de Bonferroni, com tamanhos de efeito médio, sugerindo sobreposição entre estágios fibróticos adjacentes para este índice.

Gráfico 4— Distribuição quantitativa de FIB-4 no estadiamento de fibrose hepático



A partir do grupo F3/F4, observa-se ascensão da mediana com dispersão interquartil ampliada e presença de valores extremos superiores.

Dois valores extremos do grupo F3/F4 (FIB-4 = 97,84 e 48,33) foram omitidos da escala gráfica para melhor visualização da distribuição central dos demais dados, sendo representados como *outliers*.

O gráfico de violino evidencia distribuição concentrada próxima a zero nos grupos GC e F0/F1, com cauda superior progressivamente mais longa em F3/F4.

6.3.2 APRI

Complementarmente ao FIB-4, outro escore não invasivo amplamente utilizado no estadiamento da fibrose hepática é o APRI, cujos resultados são apresentados a seguir na tabela 9.

Tabela 9 – Comparações *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni para o índice APRI segundo estadiamento de fibrose hepática

Comparações	z	p valor	p ajust.	r		Interp.
GC vs F0/F1	-2,2518	0,0243	0,1460	0,217	Pequena	Não sig. ²
GC vs F2	-4,8352	< 0,001	< 0,001	0,465	Grande	Sig. ¹
GC vs F3/F4	-8,2040	< 0,001	<0,001	0,789	Grande	Sig. ¹
F0/F1 vs F2	-3,1880	0,0014*	0,0085	0,307	Média	Sig. ¹
F0/F1 vs F3/F4	-6,3910	< 0,001	<0,001	0,615	Grande	Sig. ¹
F2 vs F3/F4	-1,9934	0,0462	0,277	0,192	Pequeno	Não sig.

Fonte: autoria própria. **Nota:** Teste de Dunn com correção de Bonferroni para 6 comparações ($\alpha' = 0,0083$). r = correlação bisserial de postos (Rosenthal, 1991): pequeno < 0,30; médio 0,30–0,50; grande > 0,50. APRI calculado por: $[\text{AST (U/L)} / \text{LSN AST}] / \text{plaquetas (10}^9/\text{L)} \times 100$. **Nota metodológica:** o APRI apresenta poder discriminatório superior ao FIB-4 para fibrose F0/F1 vs F2 (p ajust. = 0,0324 vs 0,0974), aspecto clinicamente relevante na identificação de fibrose moderada.¹ p ajust. < 0,05. ² tendência (p bruto < 0,05; p ajust. $\geq$ 0,05). ³ $r > 1,0$: artefato de distribuição assimétrica extrema; interpretado como efeito de magnitude muito grande. Análise realizada pelo pacote *dunn.test*, R v4.3.3 / RStudio. **Referências:** Cohen, 1988.

O teste de KW demonstrou diferença estatisticamente significativa nos valores de APRI entre os quatro grupos ($H = 78,330$; $gl = 3$; $p < 0,001$). As medianas foram: GC = 0,210; F0/F1 = 0,3000; F2 = 0,815; F3/F4 = 2,080 .

O tamanho do efeito foi de grande magnitude ($\eta^2 = 0,724$), indicando que aproximadamente 76% da variância nos valores de APRI é explicada pelo estadiamento de fibrose.

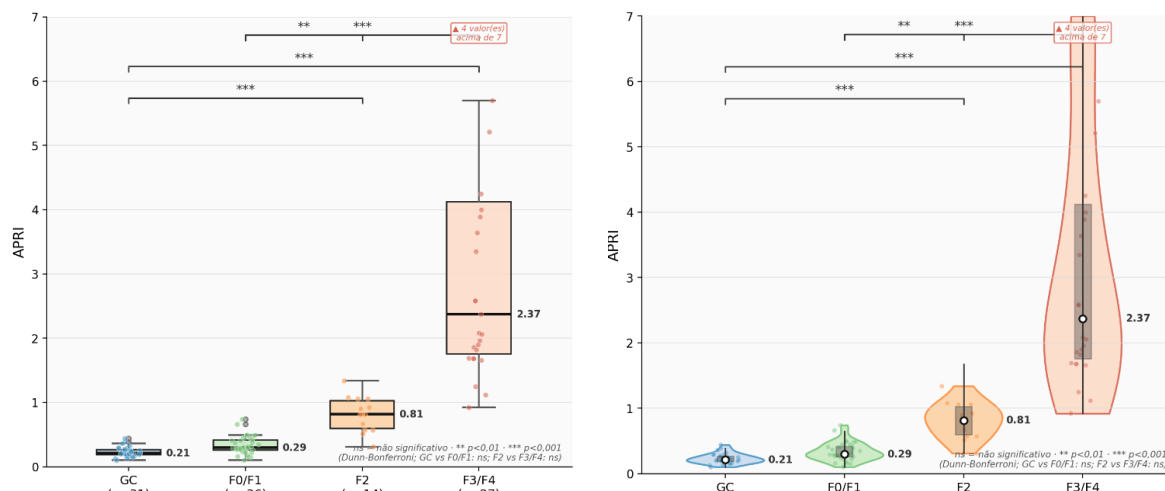
GC vs F2, GC vs F3/F4 e F0/F1 vs F3/F4 apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p ajustado < 0,001), com tamanhos de efeito grandes, indicando clara distinção entre indivíduos sem fibrose e aqueles com fibrose significativa e avançada.

A comparação F0/F1 vs F2 foi estatisticamente significativa após ajuste de Bonferroni, com tamanho de efeito grande e não médio como observado para AST e ALT nessa mesma comparação, sugerindo que o APRI apresenta maior capacidade de discriminar a transição para fibrose significativa ($\geq F2$), provavelmente por integrar simultaneamente AST e contagem plaquetária em um único escore, amplificando o sinal biológico da progressão fibrótica.

As comparações GC vs F0/F1 e F2 vs F3/F4 não atingiram significância após correção, refletindo sobreposição entre estágios adjacentes, padrão biologicamente esperado, uma vez que a progressão da fibrose hepática é um processo contínuo, sem limiares abruptos entre estágios consecutivos.

O Gráfico 5 ilustra a elevação progressiva das medianas do APRI ao longo dos estadiamentos, padrão semelhante ao observado para o FIB-4.

GRÁFICO 5— Distribuição quantitativa de APRI no estadiamento de fibrose hepática



Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Os grupos GC e F0/F1 apresentam amplitude interquartil reduzida, enquanto F2 e F3/F4 apresentam bigodes mais amplos e distribuição assimétrica positiva.

O gráfico de violino evidencia corpo alargado com assimetria positiva e cauda superior extensa no grupo F3/F4, em contraste com a distribuição mais concentrada observada nos grupos GC e F0/F1.

Foram identificados valores extremos superiores nos grupos F2 e F3/F4, mantidos na análise dado o uso de teste não paramétrico.

Avaliados os escores não invasivos de estadiamento da fibrose hepática, apresentam-se a seguir os resultados referentes à expressão do hsa-miR-122-5p, biomarcador molecular central no presente estudo.

6.4 miR-122

Tabela 10 — Estatística descritiva dos níveis séricos de hsa-miR-122-5p por subgrupo de fibrose hepática no GHCV

Grupo	n	Mediana	Q1	Q3
F0/F1	35	1,4	0,45	6,97
F2	15	4,48	1,75	14,45
F3/F4	27	12,84	3,88	28,72

Fonte: Elaborado pelo autor (2025) Nota: Nota Valores expressos em expressão relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Controle endógeno: hsa-miR-103a-5p. Calibrador externo: GC saudável (GC). IIQ = intervalo interquartilico [Q1–Q3]. Interpretação: a mediana de hsa-miR-122-5p apresenta padrão ascendente com o estadiamento fibrótico.

As medianas de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) seguiram padrão de escalonamento progressivo conforme o estadiamento fibrótico: F0/F1 = 1,420; F2 = 4,480; F3/F4 = 12,840, com gradiente monotônico crescente nos ranks médios (F0/F1: 29,49 < F2: 40,97 < F3/F4: 52,04).

A comparação dos níveis de expressão do hsa-miR-122-5p entre os subgrupos de estadiamento fibrótico do GHCV pelo teste de Kruskal-Wallis apresentou resultado estatisticamente significativo [$H(2) = 15,358$; $p = 0,000462$; $\eta^2_H = 0,181$], com tamanho de efeito de grande magnitude ($\eta^2_H > 0,14$; Tomczak & Tomczak, 2014).

O GC foi excluído desta análise por constituir o calibrador externo do método $\Delta\Delta Ct$, cuja inclusão introduziria circularidade matemática na quantificação relativa da expressão gênica (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 11 — Comparação dos níveis de hsa-miR-122-5p entre subgrupos de fibrose hepática pelo teste *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni

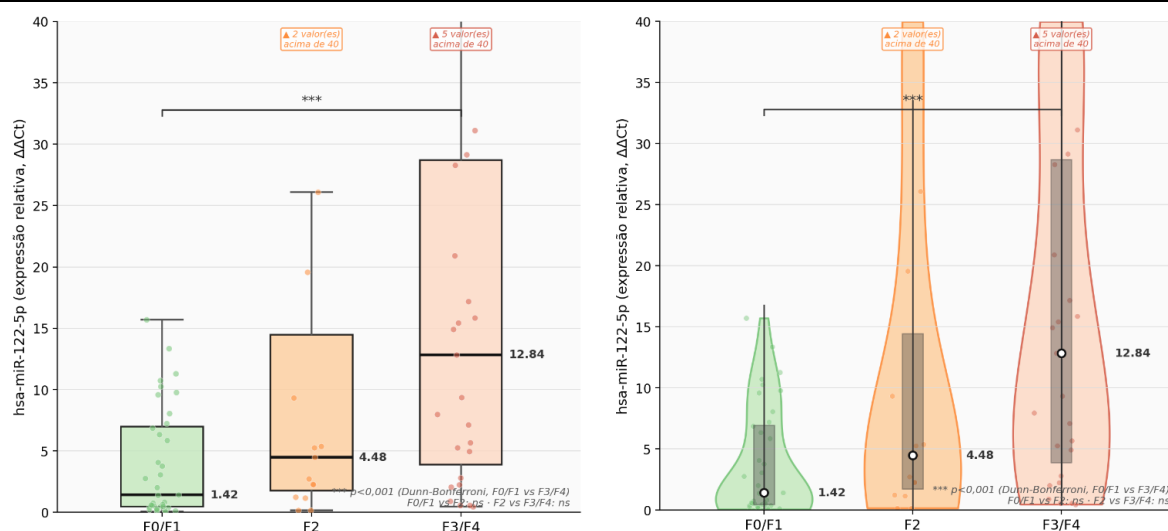
Pares	Z	p ajust.	$r = Z /\sqrt{N}$	Interp.
F0/F1 vs F2	-1,6486	0,297	0,188	não signif. ²
F0/F1 vs F3/F4	-3,9090	0,0002	0,445	$p < 0,01^1$
F2 vs F3/F4	-1,5171	0,387	0,173	não signif.

Fonte: Elaborado pelo autor (2025). Nota: Teste *post-hoc* de Dunn com correção de Bonferroni para 3 comparações ($\alpha' = 0,0167$). $r = |Z| / \sqrt{N}$ (Rosenthal, 1991): grande $\geq 0,50$; médio $\geq 0,30$; pequeno $< 0,30$. Medianas expressas em expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). $\bar{R}$ = posto médio. N = tamanho total de cada par comparado.¹ p ajust. < 0,05 (significativo após correção). ² tendência (p bruto < 0,05; p ajust. $\geq \alpha'$ de Bonferroni). ns não significativo.

O teste post-hoc de Dunn com correção de Bonferroni identificou diferença estatisticamente significativa exclusivamente entre F0/F1 e F3/F4, com tamanho de efeito grande. As comparações F0/F1 vs F2 e F2 vs F3/F4 não atingiram significância estatística após correção. O IC 95% da mediana de F2 ([2,270; 19,580]) sobrepõe amplamente o de F3/F4 ([5,260; 20,910]). O n=15 do F2 é o principal limitante do poder estatístico desta análise.

Contudo, a estimativa de Hodges-Lehmann de F0/F1 vs F2 (HL=1,885; IC 95%: 0,800–2,440) não incluiu zero, sugerindo tendência biológica à diferenciação entre fibrose leve e moderada não confirmada pelo poder estatístico disponível, particularmente limitado pelo tamanho amostral do subgrupo F2 (n=15).

GRÁFICO 6— Distribuição quantitativa de hsa-miR-122-5p de acordo com estadiamento de fibrose hepático



fonte: Elaborado pelo autor (2025)

As medianas de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) foram: F0/F1=1,420 (IIQ: 0,450–6,975); F2=4,480 (IIQ: 1,750–14,455); F3/F4=12,840 (IIQ: 3,880–28,720), com gradiente monotônico crescente nos ranks médios (F0/F1: 29,49 < F2: 40,97 < F3/F4: 52,04).

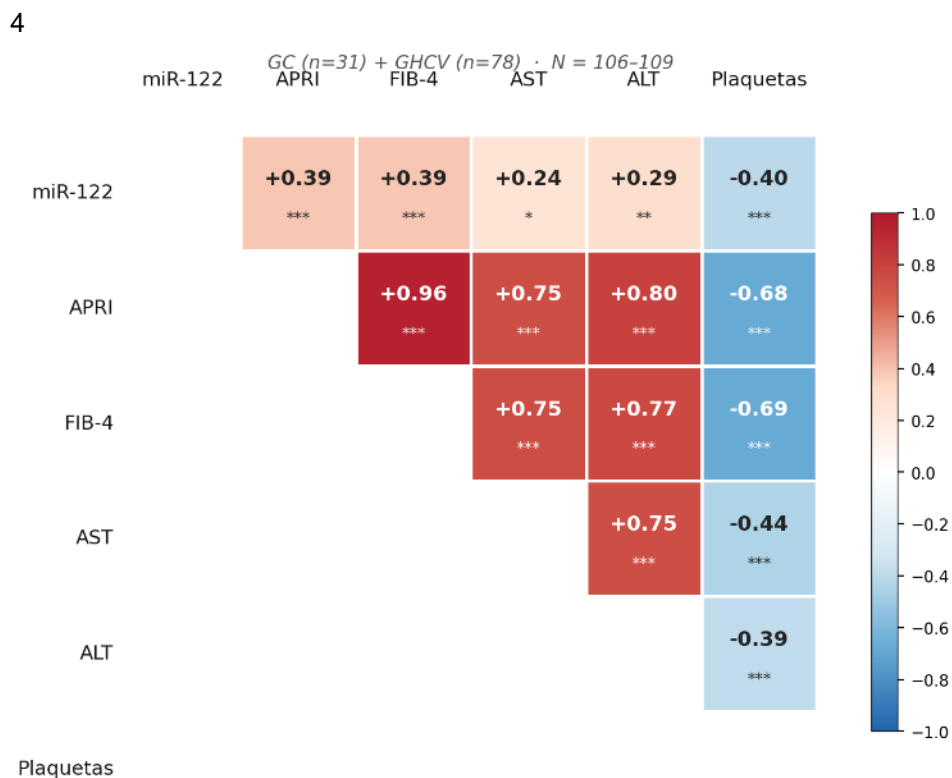
O gráfico de violino evidencia que o grupo F2 apresenta o corpo mais amplo entre todos os grupos, enquanto F3/F4 apresenta corpo mais comprimido com cauda superior longa e valores extremos superiores.

6.5 MATRIZ DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN.

A análise de correlação de *Spearman* entre o hsa-miR-122-5p e os biomarcadores hepáticos foi conduzida na amostra total (N = 108) e no subgrupo GHCV (n = 77), com cálculo dos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) pela transformação de Fisher.

O Gráfico 7 apresenta a matriz de correlação de *Spearman* entre hsa-miR-122-5p e os marcadores hepáticos no GHCV (n = 77).

Gráfico 7— Correlação de *Spearman*



O Gráfico 7 apresenta a matriz de correlação de *Spearman* na amostra total. A expressão relativa de hsa-miR-122-5p apresentou correlações positivas, estatisticamente significativas e de magnitude fraca com o APRI e o FIB-4.

Observou-se correlação inversa, estatisticamente significativa e de magnitude fraca entre a expressão relativa de hsa-miR-122-5p e a contagem de plaquetas. Esse

resultado indica que maiores valores de expressão relativa plasmática do hsa-miR-122-5p tenderam a ocorrer, ao mesmo tempo, a menores contagens plaquetárias.

Também foram observadas correlações positivas e estatisticamente significativas com a AST e a ALT. Entretanto, de acordo com os critérios de Mukaka, ambas apresentaram magnitude negligenciável.

6.6 ANÁLISE DE CURVA ROC

A capacidade discriminatória dos biomarcadores, escores hepáticos e hsa-miR-122-5p avaliados foi estimada por meio da análise de curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para três comparações clínicas pré-definidas, conforme apresentado na Tabela 13: a) GC vs GHCV (todos os pacientes HCV · n = 108), b) ($\leq F1$ vs $\geq F2$) Fibrose significativa · n = 77, c) ($\leq F2$ vs F3/F4) Fibrose avançada · n = 77, conforme tabela 12.

Tabela 12 — Diagnóstico dos biomarcadores por comparação clínica

Comparação / Biomarcador	AUC	IC 95%	Corte Ótimo	Sens.	Espec.	VPP	VPN
1 - GC vs GHCV (todos os pacientes HCV · n = 108)							
ALT (TGP)	0,869	[0,798; 0,931]	38,0 U/L	0,750	1,000	1,000	0,620
AST (TGO)	0,885	[0,818; 0,945]	35,0 U/L	0,733	1,000	1,000	0,608
APRI	0,884	[0,816; 0,943]	0,410	0,662	0,968	0,981	0,536
FIB-4	0,892	[0,829; 0,944]	0,350	0,779	0,871	0,937	0,614
Plaquetas($\times 10^3$)	0,744	[0,647; 0,835]	229×10^3	0,623	0,806	0,889	0,463
hsa-miR-122-5p	0,689	[0,580; 0,789]	6,360	0,420	0,870	0,690	0,667
2 - $\leq F1$ vs $\geq F2$ — Fibrose significativa · n = 77							
ALT (TGP)	0,912	[0,846; 0,963]	67,0 U/L	0,725	0,972	0,967	0,761
AST (TGO)	0,954	[0,898; 0,996]	52,0 U/L	0,925	0,943	0,949	0,917
Plaquetas($\times 10^3$)	0,855	[0,762; 0,935]	200×10^3	0,780	0,889	0,889	0,780
hsa-miR-122-5p	0,738	[0,623; 0,844]	14,930	0,405	0,972	0,944	0,583
3 - $\leq F2$ vs F3/F4 — Fibrose avançada · n = 77							
ALT (TGP)	0,848	[0,757; 0,932]	73,0 U/L	0,769	0,860	0,741	0,878
AST (TGO)	0,954	[0,901; 0,991]	56,0 U/L	1,000	0,837	0,765	1,000
Plaquetas($\times 10^3$)	0,893	[0,802; 0,964]	189×10^3	0,889	0,840	0,750	0,933
hsa-miR-122-5p	0,746	[0,628; 0,848]	12,840	0,519	0,882	0,700	0,776

Fonte: Elaborado pelo autor (2025) Nota: AUC: área sob a curva ROC; IC 95%: intervalo de confiança pelo método DeLong; Corte Ótimo: índice de Youden; Sensib.: sensibilidade; Especif.: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo. Pacotes: pROC v1.18 (R v4.3.3). Valores AUC = 1,000 indicam separação perfeita entre grupos — o IC 95% (1,000–1,000) deve ser interpretado com cautela dado o tamanho amostral reduzido

O primeiro, de natureza estrutural e independente do tamanho amostral, é o viés de incorporação (*incorporation bias*): como o estadiamento fibrótico deste estudo

foi realizado com base nos próprios índices APRI e FIB-4, conforme protocolo do PCDT brasileiro para Hepatite C (Brasil, 2024).

O segundo mecanismo, de natureza amostral, decorre do tamanho reduzido do estudo ($n = 77$ no GHCV): para amostras com $N \leq 100$, as estimativas de AUC são instáveis e tendem a superestimar o desempenho real, conforme demonstrado por Hanczar *et al.* (2010).

Esses dois mecanismos atuam de forma aditiva no presente estudo e impõem cautela na interpretação das curvas ROC do APRI e do FIB-4. Em contraste, a análise ROC do hsa-miR-122-5p é imune ao incorporation bias, pois não participou dos critérios de classificação dos grupos, estando sujeita apenas ao efeito do n pequeno, limitação que pode ser endereçada em estudos futuros com grupos maiores e com padrão-ouro histológico independente.

6.6.1 - Comparações dos grupos em Curva ROC

A comparação GC vs. GHCV ($n = 108$): As transaminases e os escores não invasivos destacaram-se como os melhores discriminadores: FIB-4 obteve a maior AUC (0,892), seguido por AST (0,885), APRI (0,884) e ALT (0,869), com especificidade de 100% para AST e ALT em seus respectivos pontos de corte. Em contraste, hsa-miR-122-5p (AUC = 0,689) e plaquetas (AUC = 0,744) apresentaram desempenho moderado, com sensibilidade limitada (42,3% e 62,3%, respectivamente).

Na comparação GC vs GHCV ($N = 108$), o hsa-miR-122-5p apresentou AUC de 0,689, com especificidade de 87,1%, VPP de 89,2% e sensibilidade de 42,3%. O alto VPP e elevada especificidade indica que valores acima do corte conferem alta probabilidade de pertencer ao grupo HCV, contudo com uma capacidade discriminatória global moderada.

Na comparação $\leq F1$ vs $\geq F2$ (fibrose significativa; $N = 77$), o hsa-miR-122-5p atingiu AUC de 0,738, com especificidade de 97,2% e VPP de 94,4%. Os valores indicam que o biomarcador classifica corretamente casos com fibrose significativa com alta precisão positiva, a sensibilidade reduzida (40,5%) limite sua utilidade como teste de rastreio isolado.

Na comparação $\leq F2$ vs $F3/F4$ (fibrose avançada; $N = 77$), o hsa-miR-122-5p apresentou a maior AUC entre as três comparações 0,746, com especificidade de 88,2%, VPN de 77,6% e sensibilidade de 51,9%.

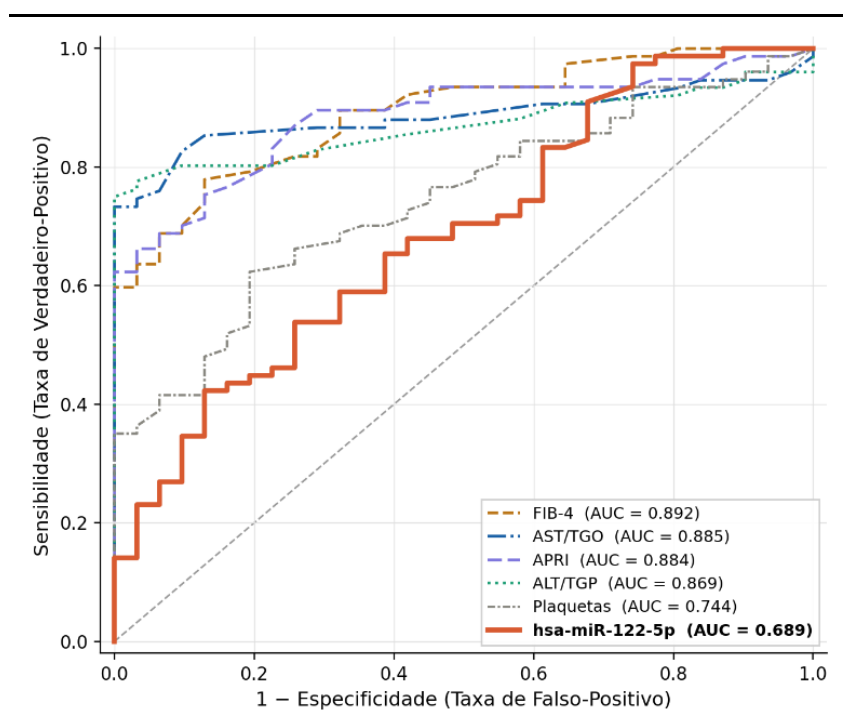
O melhor desempenho nessa comparação é biologicamente consistente com a maior liberação plasmática de hsa-miR-122-5p associada à necroinflamação e fibrose avançada, e reforça sua aplicabilidade como biomarcador de estadiamento tardio.

É relevante destacar que, ao contrário de APRI e FIB-4, cujas AUCs nas comparações 2 e 3 são artificialmente elevadas pelo viés de incorporação, os valores obtidos pelo hsa-miR-122-5p representam desempenho diagnóstico genuíno e livre de circularidade metodológica.

Os intervalos de confiança foram estimados pelo método de DeLong. Para todas as variáveis, os pontos de corte ótimos foram selecionados pelo índice de Youden.

6.6.2 Acurácia avaliada pela curva ROC.

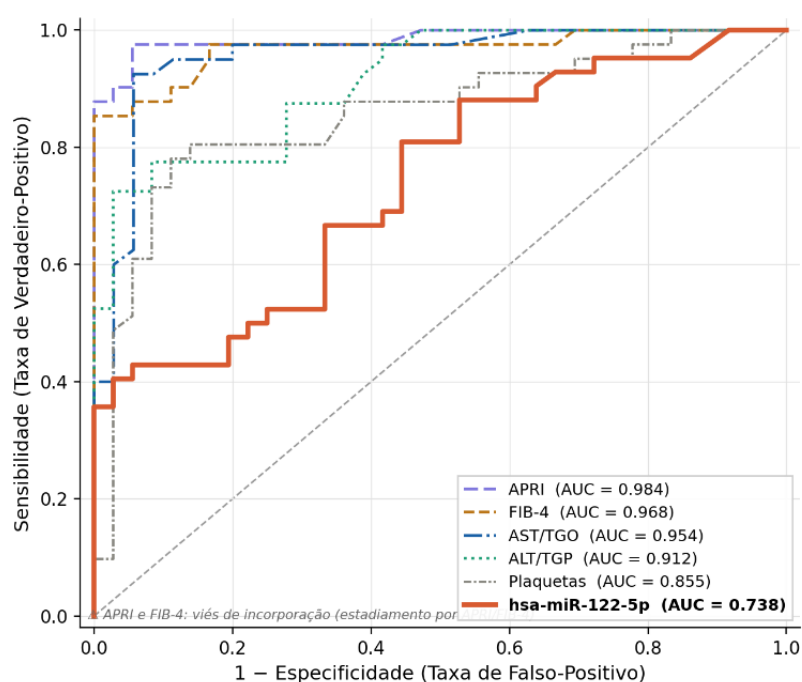
Na comparação (Gráfico 8) entre o GC e o GHCV, o FIB-4 apresentou a maior AUC = 0,892, seguido de AST AUC = 0,885, APRI AUC = 0,884 e ALT AUC = 0,869. O hsa-miR-122-5p apresentou AUC de 0,689, com ponto de corte ótimo de 6,360, sensibilidade de 42,3% e especificidade de 87,1%.



Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

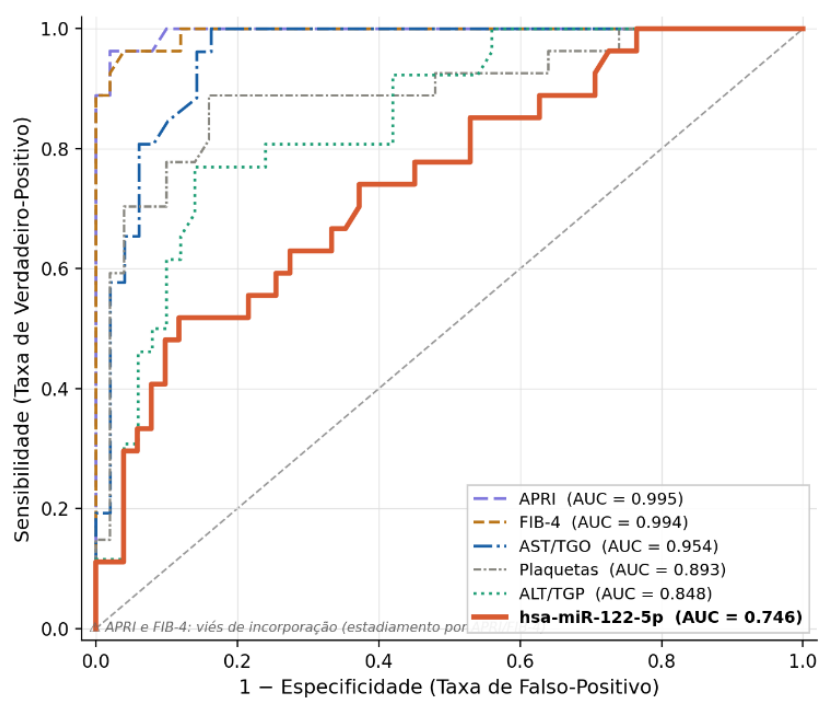
Para a discriminação de fibrose significativa ($\leq F1$ vs $\geq F2$), observada no Gráfico 9, o APRI apresentou a maior AUC = 0,984, seguido pelo FIB-4 AUC = 0,968, AST AUC = 0,954 e ALT AUC = 0,912.

O hsa-miR-122-5p apresentou AUC = 0,738, com ponto de corte ótimo de 14,930, sensibilidade de 40,5% e especificidade de 97,2%.

Gráfico 9 — Fibrose significativa ($\leq F1$ vs $\geq F2$)

Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

Na discriminação de fibrose avançada ($\leq F2$ vs $F3/F4$), observada no Gráfico 10, o APRI apresentou a maior AUC = 0,995, seguido pelo FIB-4 AUC = 0,994, AST AUC = 0,954, Plaquetas AUC = 0,893 e ALT AUC = 0,848. O hsa-miR-122-5p apresentou AUC = 0,746, com ponto de corte ótimo de 12,840, sensibilidade de 51,9% e especificidade de 88,2%.

Gráfico 10 : Fibrose avançada ($\leq F2$ vs $F3/F4$)

Fonte: Elaborado pelo autor (2026)

7- DISCUSSÃO

A validação de um biomarcador molecular, da bancada à aplicação clínica, percorre um percurso longo e criterioso, orientado por protocolos e critérios rigorosos, tais como, sólida base amostral e a minimização de vieses de seleção, isso possibilita maior credibilidade na comparação dos grupos.

Sobre esse alicerce, o presente estudo teve por objetivo avaliar o desempenho do hsa-miR-122-5p plasmático como biomarcador não invasivo do estadiamento da fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica.

Os resultados obtidos apontam para um achado central: embora o hsa-miR-122-5p apresente capacidade discriminativa apenas modesta no contraste entre infectados e controles, sua expressão eleva-se de forma progressiva e significativa ao longo do gradiente de fibrose, comportamento que o distingue conceitualmente dos marcadores bioquímicos convencionais.

A discussão que se segue, observando a homogeneidade demográfica entre os grupos, como garantia de validade interna, para então interpretar o achado central à luz da literatura, confrontá-lo com o desempenho dos escores APRI e FIB-4 e reconhecer as limitações inerentes ao delineamento adotado.

A análise das características demográficas da casuística, obtidas por anamnese e revisão de prontuários, demonstrou homogeneidade entre o grupo controle (GC) e o grupo com hepatite C crônica (GHCV) quanto ao sexo ($p = 0,255$), à etnia autodeclarada ($p = 0,132$) e à idade ($p = 0,059$).

A ausência de diferença estatisticamente significativa nesses parâmetros reduz o risco de distorções nas análises subsequentes e confere validade interna às comparações entre os grupos.

Registrou-se, contudo, uma assimetria relevante na escolaridade, significativamente superior no GC ($p < 0,001$), coerente com o perfil de recrutamento de controles saudáveis em ambiente universitário.

Embora não se possa presumir, a priori, que essa diferença atue como fator de confusão sobre os desfechos moleculares e bioquímicos, dado que a escolaridade não guarda relação mecanística direta com a expressão do hsa-miR-122-5p ou com o grau de fibrose, sua presença é reconhecida como limitação e recomenda cautela na generalização dos resultados.

A composição étnico-racial da amostra, por sua vez, merece exame mais detido, tanto por sua homogeneidade estatística quanto por suas implicações para a validade externa do estudo.

Quanto à composição étnico-racial (Tabela 1), o GHCV apresentou maior frequência de indivíduos autodeclarados pardos (54,5%; $n = 42$), proporção discordante da descrita em âmbito nacional pelo Ministério da Saúde, na qual predominam os autodeclarados brancos (45%), seguidos dos pardos (35,2%) (BRASIL, 2025).

Essa divergência é esperada e reflete uma característica demográfica regional, e não uma particularidade da infecção pelo HCV: a proporção de pardos na população da região metropolitana do Rio de Janeiro é historicamente superior à média nacional (IBGE, 2022).

Corroborar essa interpretação o estudo de Costa *et al.* (2018), que, ao analisar casos confirmados de HCV em hospital de referência em Goiânia, identificou predomínio ainda mais acentuado de pardos (75,09%).

O contraste entre as duas casuísticas, ambas com predomínio de pardos, porém em proporções distintas, sugere que a composição étnico-racial de estudos de HCV conduzidos em serviços de referência tende a espelhar o perfil da população local, e não um padrão intrínseco à doença.

Estabelecida a coerência regional da distribuição étnico-racial, examina-se, a seguir, o perfil etário da amostra.

A distribuição etária dos grupos mostrou-se equivalente, sem diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney, $p = 0,059$): a mediana de idade foi de 56,2 anos (IIQ 47–67) no GHCV e de 57,3 anos (IIQ 50–65) no GC.

Destaca-se que o critério de inclusão de idade mínima de 30 anos foi adotado para o GC, em lugar de 18 anos aplicados ao GHCV, em função de garantir a comparação etária entre os grupos, dado a média de idade do GHCV, visando diminuir qualquer viés de confundimento, isso reflete, diretamente, o perfil epidemiológico do Brasil (Brasil, 2024).

A média de idade superior no GHCV ($56,2 \pm 15,87$ anos), com maior concentração nas faixas de 51 a 80 anos, é convergente com o padrão epidemiológico nacional: o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais de 2025 registra que o maior

percentual dos casos detectados de hepatite C no Brasil entre 2000 e 2024 ocorreu na faixa etária acima de 60 anos (Brasil, 2025).

Esse padrão é interpretado ao chamado efeito de coorte, correlacionado com indivíduos expostos ao vírus HCV nas décadas de 1970 a 1990, período anterior à triagem sorológica sistemática em bancos de sangue a partir de 1993, e o Teste de Ácido Nucleico (NAT) (Brasil, 2001), apresentam diagnóstico tardio, frequentemente na sexta ou sétima décadas de vida.

Divergências regionais, como a faixa etária de 40 a 50 anos predominante na Amazônia entre 2008 e 2018 (Santos, 2020) e de 50 a 59 anos na Bahia (Bahia, 2022), podem refletir condições distintas de vulnerabilidade social e acesso a serviços de saúde, que ampliam a exposição precoce ao vírus em determinadas regiões.

Além da idade, a escolaridade constituiu a variável em que os grupos mais se distinguiram, aspecto examinado a seguir.

A escolaridade foi a variável em que os grupos mais se distinguiram ($p < 0,001$), com nítida sub-representação do ensino superior no GHCV (10,4%; $n = 8$) em relação ao GC (54,8%; $n = 17$).

No GHCV, concentraram-se as faixas de menor escolaridade formal, com predomínio do ensino médio completo (33,8%; $n = 26$) e proporção expressiva de ensino fundamental incompleto (23,4%; $n = 18$).

Esse perfil é coerente, em linhas gerais, com o descrito em âmbito nacional, no qual os casos de hepatite C concentram-se em estratos de menor escolaridade (BRASIL, 2024).

A divergência em relação a Cruz *et al.* (2009), que identificaram predomínio de escolaridade superior a doze anos de estudo em serviço público de São Paulo, provavelmente reflete diferenças socioeconômicas entre as populações atendidas: serviços universitários de referência e ambulatórios públicos de gastroenterologia tendem a assistir populações de maior vulnerabilidade social.

Ressalte-se, ainda, que a elevada proporção de registros ignorados quanto à escolaridade nos dados nacionais, de 32,0% em 2012 a 33,6% em 2023 (BRASIL, 2025), limita a comparação direta.

Estabelecido o perfil sociodemográfico da amostra, passa-se à análise das fontes prováveis de infecção, com destaque para a exposição transfusional.

A averiguação do perfil epidemiológico do GHCV, por revisão de prontuários, constatou que 28,6% dos pacientes ($n = 22$) relataram antecedente de hemotransusão, concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas ou plasma fresco congelado, em procedimentos eletivos ou de emergência realizados entre as décadas de 1970 e 2000.

Essa foi a única exposição do bloco de vias de transmissão a diferir significativamente entre os grupos ($p = 0,035$; Tabela 2), o que sugere a aquisição do vírus por via transfusional nessa casuística.

Esse resultado contrasta com o percentual nacional de 8,4% por transfusão de sangue (população em geral) (Brasil, 2024a), essa diferença sugere uma subnotificação.

Longe de indicar superestimação do dado próprio, essa disparidade é coerente com o perfil de um serviço de referência que concentra pacientes expostos no período anterior à triagem sorológica, e deve ser lida em conjunto com a elevada proporção de casos sem informação nos registros nacionais, pois o Boletim Epidemiológico de Hepatites Virais, a provável fonte de infecção é ignorada em 60,3% dos casos diagnosticados entre 2000 e 2024, alcançando 70,3% em 2024 (BRASIL, 2024b). Tal lacuna informacional tende a subestimar a real contribuição da via transfusional nas estatísticas nacionais.

Esses dados foram reforçados pelos estudos da UFMG em 2003 (Souza, 2004), com 48,3% das formas de aquisição do HCV por hemotransusão, com perfil etário semelhante, reforçam que essa via de transmissão tem peso historicamente superior em serviços de referência que atendem populações expostas no período pré-triagem.

Além da exposição transfusional, investigou-se o papel do uso de substâncias psicoativas como via de transmissão, discutido a seguir.

O uso de drogas ilícitas por via inalatória foi significativamente mais frequente no GHCV (15,6%; $n = 12$) do que no GC (0,0%; $p = 0,018$; Tabela 2). A literatura descreve associação dessa exposição com a infecção pelo HCV mesmo na ausência de uso injetável, atribuída ao compartilhamento de equipamentos e a efeitos sobre a permeabilidade das mucosas e a competência imunológica (SCHUCH et al., 2017), o uso de drogas ilícitas injetáveis foi relatado por 5,2% dos pacientes ($n = 4$; $p = 0,323$), sem diferença significativa entre os grupos.

Esse achado converge com o de Pacheco (2011), que identificou 14% de uso de cocaína inalatória entre indivíduos HCV-RNA positivos em estudo no Pará, proporção próxima à do presente GHCV. O tabagismo, embora mais frequente no GHCV (23,4%; $n = 18$) do que no GC (9,7%; $n = 3$), não atingiu significância estatística ($p = 0,104$).

Quanto ao consumo de álcool, o etilismo leve (< 20 g/dia) apresentou frequências semelhantes entre os grupos (GC: 32,3%; GHCV: 28,6%; $p = 0,704$), ao passo que o etilismo moderado/grave (≥ 20 g/dia) restringiu-se ao GHCV (11,7%; $n = 9$; $p = 0,057$), sem alcançar significância.

Ainda que não significativo neste estudo, possivelmente por limitação amostral, o consumo moderado/grave é reconhecidamente associado à aceleração da fibrose e ao risco de carcinoma hepatocelular por mecanismos de estresse oxidativo (SANTOS et al., 2024; SOUZA et al., 2025).

Ao lado das exposições comportamentais, investigaram-se as comorbidades metabólicas e a coinfeção por HIV, discutidas a seguir.

A prevalência de diabetes mellitus no GHCV foi de 23,4% ($n = 18$), sem diferença significativa em relação ao GC ($p = 0,104$; Tabela 2). A comparação direta com dados nacionais é limitada, uma vez que o Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde não estratifica a prevalência de comorbidades metabólicas por condição de infecção (BRASIL, 2025).

Estudo que avaliou 261 prontuários de pacientes com hepatites virais em ambulatório universitário brasileiro: a prevalência de diabetes mellitus foi de 20% entre os portadores do HCV, significativamente maior do que entre os portadores de hepatite B crônica (6,4%; p significativo). A análise apontou diferença estatística entre os grupos, reforçando a associação específica entre HCV e DM tipo 2 (Freitas, 2012).

Este estudo brasileiro, conduzido em ambulatórios de hepatites virais do Rio de Janeiro, recrutou 214 pacientes não diabéticos com hepatite crônica C. A resistência à insulina (HOMA-IR > 2) foi identificada em 62,1% dos pacientes e esteve associada a valores mais elevados de triglicerídeos, glicose, insulina, circunferência abdominal e IMC (Villar, 2017).

A hepatite C crônica está associada a risco quadruplicado de resistência à insulina e DM tipo 2; estima-se que 40 a 74% dos pacientes com hepatite C crônica possam desenvolver ao menos uma manifestação extra-hepática ao longo da doença.

As síndromes extra-hepáticas podem representar o primeiro sinal clínico da infecção em alguns pacientes (Cacoub *et al.* 2016)

A coinfeção por HIV foi identificada em 2,6% do GHCV ($n = 2$) diferença que não atingiu significância estatística, possivelmente em virtude do tamanho amostral.

Ressalta-se que todos os participantes coinfectados estavam sob terapia antirretroviral, o que atenua parcialmente esse efeito, mas não o elimina completamente, representando uma limitação metodológica que deve ser considerada na interpretação dos resultados, especialmente em relação a níveis circulante de hsa-miR-122-5p, cujo comportamento na coinfeção HIV/HCV permanece insuficientemente caracterizado na literatura.

Caracterizado o perfil clínico-epidemiológico da amostra, procede-se à análise da distribuição por sexo.

Neste estudo, o sexo feminino esteve presente em 56,4% do GHCV, discordando do estudo realizado no estado do Pará que identificou perfil com predomínio do gênero feminino (Cerroni *et al.*, 2019).

O perfil epidemiológico nacional registrou 57,2% dos casos confirmados de hepatite C no Brasil entre 2000 e 2024 (Brasil, 2025) do sexo masculino, alinhados aos estudos da UFMG, com 295 pacientes HCV, em que 55% eram homens (Souza *et al.*, 2004).

Em conjunto, o perfil demográfico e epidemiológico do GHCV, população com predomínio de pardos, de meia a terceira idade, com baixa escolaridade, exposta ao HCV predominantemente por via transfusional no período pré-triagem, é representativo do perfil clássico de pacientes com infecção pelo HCV atendidos em serviços de referência no Brasil (Souza *et al.*, 2004; Brasil, 2025).

A homogeneidade entre GC e GHCV quanto às variáveis de maior potencial confundidor, sexo e etnia, assegura a validade interna das comparações e sustenta a robustez das análises biológicas subsequentes.

Até aqui, procurou-se estabelecer uma robustez estrutural com um aprofundamento da análise do perfil demográfico do grupo estudado, isso justifica a identidade demográfica da nossa casuística, permitindo que o terreno do estudo torne-se estatisticamente seguro para a investigação das variáveis biológicas.

É fundamentada nesta blindagem metodológica que a presente análise avança para o mapeamento das correlações clínicas, onde o comportamento do hsa-miR-122-

5p e dos biomarcadores de lise e função hepáticos serão rigorosamente contrastados entre o endotélio saudável (GC) e o colapso imposto pelo HCV no GHCV.

Estabelecida a comparabilidade estrutural entre os grupos, a análise avança para o contraste dos biomarcadores. A seguir, examina-se o comportamento do hsa-miR-122-5p e dos marcadores de lise e função hepáticas na comparação global entre indivíduos hígidos (GC) e portadores de hepatite C crônica (GHCV).

Análise global GC vs. GHCV: ativação biológica dos biomarcadores

A análise global entre GC e GHCV, com o teste de Mann-Whitney (MW) bicaudal (Tabela 3), demonstrou que os biomarcadores avaliados possuem diferenças estatisticamente significativas em todos os biomarcadores avaliados e, confirma que a infecção crônica pelo HCV produz alterações do metabolismo hepático.

Essa análise inicial responde à pergunta diagnóstica primária: o biomarcador está biologicamente ativado na infecção crônica pelo HCV? Isso constitui o fundamento necessário para qualquer gradação subsequente por estágio de fibrose, sem essa evidência de ativação basal, as comparações intragrupo perderiam a sustentação metodológica.

Por seguinte, Entre os marcadores com efeito de grande magnitude, o AST ($r = 0,602$) e o ALT ($r = 0,576$) refletem a sensibilidade consolidada dessas enzimas para identificar lesão hepatocelular ativa na comparação entre indivíduos infectados e controles saudáveis (Bihrer *et al.*, 2011).

Nunes (2022) e Kim *et al.* (2008), ratificam o presente estudo em ALT e AST como os biomarcadores primários na diferenciação basal entre a hígidez hepática e o dano celular induzido pelo HCV, justificando a magnitude observada para ambos os marcadores.

De modo análogo, o APRI ($r = 0,578$) e o FIB-4 ($r = 0,603$) exibiram efeitos de grande magnitude, em conformidade com Wai *et al.* (2003), que demonstraram a acurácia discriminatória do APRI para fibrose significativa, e com Sterling *et al.* (2006), que propuseram o FIB-4 como índice de elevado desempenho diagnóstico na hepatite C crônica.

As contagem de plaquetas apresentaram efeito médio($r = 0,379$), a sua queda resulta predominantemente de hiperesplenismo secundário à hipertensão portal

(Nunes, 2022), complicação que se consolida nos estágios avançados de fibrose, e não na infecção precoce.

O hsa-miR-122-5p, por sua vez, apresentou efeito de pequena magnitude na comparação global ($r = 0,292$). Esse resultado não configura limitação do marcador, mas reflete a heterogeneidade da sua distribuição quando todos os estágios de fibrose são reunidos em um único grupo comparador.

Essa interpretação é compatível com Butt et al. (2016), que descrevem associação do hsa-miR-122-5p sérico predominantemente com marcadores de injúria hepática e necroinflamação, como ALT e AST, do que ao estadiamento fibrótico propriamente dito.

Estabelecido o padrão de ativação basal dos biomarcadores, examina-se, a seguir, a independência entre o hsa-miR-122-5p e a carga viral.

A ausência de correlação significativa entre a expressão do hsa-miR-122-5p e a carga viral (HCV-RNA), observada tanto na análise global quanto nos subgrupos de fibrose (Tabela 4), evidencia que os dois parâmetros refletem fenômenos biologicamente distintos: o hsa-miR-122-5p expressa a injúria hepatocelular e a atividade necroinflamatória, ao passo que a carga viral reflete a replicação do vírus (BIHRER et al., 2011).

Não sendo grandezas necessariamente correlacionadas, a informação fornecida pelo hsa-miR-122-5p é complementar, e não redundante, em relação à viremia.

Esse achado está em consonância com Nunes (2022), Hao et al. (2020) e Wang et al. (2015), que igualmente não identificaram associação entre o HCV-RNA e marcadores hepáticos baseados em miRNA.

Alinha-se, ainda, a Cermelli et al. (2011), que observaram correlação positiva do hsa-miR-122-5p sérico com o estágio de fibrose e a atividade inflamatória, sem associação relevante com a carga viral, padrão que reforça a leitura do hsa-miR-122-5p como marcador de dano hepatocelular, e não de replicação viral.

Em sentido oposto, Hassuna et al. (2022) relataram correlação positiva forte entre o hsa-miR-122-5p e o HCV-RNA ($r = 0,856$; $p < 0,001$). Cabe ponderar, contudo, que aquele estudo foi conduzido exclusivamente em população egípcia infectada pelo genótipo 4, ao passo que no Brasil predominam os genótipos 1 e 3.

Dado que a interação do hsa-miR-122-5p com a região 5'UTR do HCV é genótipo-dependente, essa divergência de contexto genotípico pode ter influenciado diretamente a relação observada entre o microRNA e a viremia.

Caracterizada a independência entre o hsa-miR-122-5p e a carga viral, passa-se ao exame das aminotransferases, marcadores consolidados de lesão hepatocelular.

A avaliação não invasiva do estadiamento fibrótico na infecção pelo HCV representa uma alternativa de crescente relevância clínica em contextos em que a biópsia hepática, ainda considerada padrão-ouro, apresenta limitações de acesso, custo e risco ao paciente. Nesse cenário, as aminotransferases séricas constituem um dos pilares da avaliação bioquímica inicial da infecção pelo HCV.

O presente estudo evidenciou uma elevação progressiva das medianas nos níveis séricos das aminotransferases (AST e ALT) ao longo dos estágios de fibrose hepática, que reforça a relevância desses marcadores como indicadores bioquímicos de lesão hepatocelular em pacientes com infecção crônica pelo HCV.

Encontra respaldo direto do estudo retrospectivo de Dantas *et al.*, (2025) que observou padrão compatível com os achados do presente estudo, no qual AST e ALT apresentaram elevação progressiva e maior capacidade discriminatória em contrastes mais amplos do estadiamento fibrótico.

Ragazzo, (2016) observa que as aminotransferases apresentam comportamento ascendente com elevação progressiva de AST e ALT, em particular o AST no estágio F4, sugerindo injúria hepatocelular.

Ullah (2022), que confirmam o gradiente positivo similar para os marcadores ao longo do estadiamento fibrótico.

O teste de Kruskal-Wallis (KW) demonstrou o tamanho de efeito de grande magnitude ($\eta^2 H = 0,72$) para AST e ALT ($\eta^2 H = 0,62$) e as análises de comparação múltipla de post-hoc da AST (GC vs. F2, GC vs. F3/F4 e F0/F1 vs. F3/F4) demonstraram forte capacidade discriminatória entre os extremos do estadiamento, apresentaram diferenças estritamente significativas, com tamanhos de efeito de grande magnitude.

Em contrapartida, as comparações entre estágios adjacentes da AST (GC vs. F0/F1, F0/F1 vs. F2 e F2 vs. F3/F4) não atingiram significância estatística após correção múltipla, sugerindo forte sobreposição de valores nas fases de transição.

Em ALT, a separação significativa entre quase todos os pares de grupos, contrasta com a ausência de discriminação entre (GC vs. F0/F1), esse padrão que deixa evidente a limitação particular das transaminases como marcadores isolados nos estágios iniciais de fibrose, sustentado pelos estudos de Bihrer et al. (2011)

Couto (2010) detalha na fase inicial, o predomínio de liberação é ALT, localizado no citoplasma, ao passo que a evolução da fibrose avançada e cirrose (F3/F4) atinge mitocôndria. Isso desencadeia liberação proporcional de AST, mitocondrial, concomitante a depuração hepática que cai drasticamente.

As análises de ALT evidenciaram forte capacidade discriminatória ao separar o grupo controle (GC) e o grupo de fibrose leve (F0/F1) dos estágios de fibrose significativa (F2) e avançada (F3/F4), apresentando diferenças estritamente significativas (p ajust. < 0,05) e tamanhos de efeito de grande magnitude (r variando de 0,542 a 0,906), em consonância com o gradiente progressivo registrado por Ragazzo (2016).

Couto (2010), do ponto de vista fisiopatológico, explica que esse salto nas concentrações séricas traduz os intensos eventos necro inflamatórios e de lise citoplasmática.

Giannini *et al.* (2005) relata a utilidade clínica de AST, ALT e da razão AST/ALT na avaliação de doença hepática, essa interpretação compatível é com outros estudos e descreve as aminotransferases como marcadores de lesão hepatocelular, mais do que de fibrose estrutural.

Bihrer et al. (2011) posiciona o hsa-miR-122-5p sérico como marcador de injúria hepatocitária ativa, e não como marcador estrutural isolado da progressão fibrótica, ao demonstrar que o hsa-miR-122-5p sérico se associa à ALT, à AST e ao índice histológico de atividade necroinflamatória em hepatite C crônica, mas não necessariamente ao estágio de fibrose

O estudo baseado no Índice CUFI (Abdel-Haleem et al., 2022) no processo de construção do índice, a ALT demonstrou ausência completa de poder discriminatório para separar estágios de fibrose: $p = 0,704$ para F0/F1 vs. F2–F4, e $p = 0,399$ para F0–F2 vs. F3/F4 (valores que indicam desempenho equivalente ao do acaso puro).

O foco analítico principal do estudo recaiu sobre microRNAs e escores combinados, contudo vale ressaltar que o grupo de pacientes se baseia majoritariamente no Genótipo 4 naquela estudo transversal, outra diferença está

relacionado pela estratégia analítica restrita a um único marcador isolado (Abdel-Haleem *et al.*, 2022)

Esse achado contrasta com a presente casuística, na qual a ALT apresentou capacidade discriminatória significativa entre o grupo controle/F0-F1 e os estágios F2 e F3/F4. A divergência pode refletir diferenças no desenho amostral, no tamanho e distribuição dos grupos, na baixa representação de F4 no estudo CUFI e no fato de que a ALT foi apresentada como variável basal por estágios, enquanto o foco analítico do CUFI recaiu sobre miRNAs e escores combinados.

Em conjunto, os achados no presente estudo revelam padrão coerente: AST e ALT apresentaram associação com o agravamento do estadiamento fibrótico em determinados contrastes, com tamanhos de efeito expressivos.

Contudo, toda cautela, pois as aminotransferases refletem injúria hepatocelular e atividade necroinflamatória, e não o acúmulo fibrótico de matriz extracelular de forma direta. Se as aminotransferases sinalizam a lise do hepatócito, a contagem de plaquetas reflete um eixo distinto da progressão da doença, a hipertensão portal, examinado a seguir.

A trombocitopenia progressiva ao longo do estadiamento fibrótico possui relevância fisiopatológica do presente estudo, refletindo na fisiopatologia do paciente e na homeostase plaquetária na infecção do HCV.

A avaliação da contagem de plaquetas evidenciou diferença global estatisticamente significativa entre os grupos, com postos médios e medianas apresentando padrão decrescente conforme a progressão do estadiamento fibrótico, demonstrando uma queda acentuada em F3/F4.

A comparações múltiplas para a contagem de plaquetas evidenciaram um comportamento dicotômico entre os extremos estruturais (GC vs. F3/F4 e F0/F1 vs. F3/F4) foram significativas (p ajustado $< 0,001$), com queda acentuada entre F2 e F3/F4.

Isso sugere que a redução plaquetária se torna mais discriminatória nos estágios de fibrose avançada e cirrose, em vez de separar de forma uniforme todos os estágios adjacentes.

Esse comportamento é compatível com a fisiopatologia da fibrose avançada e da cirrose, nas quais a hipertensão favorece hiperesplenismo e sequestro esplênico, Nunes (2022) descrevem que a trombocitopenia acentuada nestes subgrupos, como

hiperesplenismo secundário, redução da produção e aumento do consumo plaquetário, supressão medular pelo HCV.

Na mesma linha, (Afdhal *et al.*, 2008), enquanto a perda funcional hepática reduz a produção de trombopoetina no HCV, mecanismos adicionais, como supressão medular e fenômenos imunomediados, também podem contribuir para a trombocitopenia (Mitchell *et al.*, 2016).

Em perspectiva comparativa, Zhong et al. (2020), em hepatite B crônica demonstraram valor da contagem de plaquetas na avaliação da fibrose hepática, reforçando a relevância do componente plaquetário na avaliação não invasiva da progressão fibrótica. Contudo, por se tratar de outra etiologia viral, esse estudo deve ser utilizado como apoio indireto.

Por fim, Couto (2010), por sua vez, corrobora a relevância clínica da contagem plaquetária ao revisar e validar índices laboratoriais baseados em plaquetas, como o APRI, para predição não invasiva de fibrose significativa e cirrose em hepatite C crônica.

De modo semelhante, Ragazzo(2016), demonstrou desempenho no diagnóstico de métodos não invasivos, incluindo APRI e FIB-4, que para cirrose ($\geq F4$), ambos atingiram AUROC de 1,0. Esses achados indicam maior desempenho dos índices séricos nos estágios mais avançados da fibrose, sendo muito influenciado pela contagem de plaquetas.

Nunes (2022) corrobora e embasa a biologia desse achado ao descrever que a redução da contagem de plaquetas é proporcional à extensão da doença hepática, tornando-se clinicamente relevante predominantemente nos estágios de fibrose avançada e cirrose.

Como a contagem de plaquetas integra a fórmula do FIB-4, seu comportamento antecipa o desempenho desse índice combinado, analisado a seguir.

A avaliação não invasiva do estadiamento fibrótico representa, custo e risco ao paciente. Nesse cenário, o APRI e o FIB-4 consolidaram-se como os instrumentos de referência.

As análises de comparações múltiplas do índice FIB-4 evidenciaram um padrão consistente com os demais marcadores. As comparações do grupo controle (GC) e de fibrose leve (F0/F1) contra os grupos de fibrose significativa (F2) e avançada

(F3/F4) apresentaram diferenças estritamente significativas após ajuste múltiplo (p ajust. $< 0,001$), com efeitos de magnitude média a grande (r de 0,265 a 0,821).

Esse padrão indica que o FIB-4 apresentou maior poder discriminatório nos contrastes entre extremos estruturais do que nas transições adjacentes, comportamento coerente com sua composição matemática, que integra idade, AST, ALT e contagem de plaquetas.

Este achado é amparado pelo estudo de Duarte-Rojo et al. (2012) destacam a utilidade clínica dos escores séricos não invasivos na avaliação da fibrose hepática, enquanto Rungta *et al.* (2021) reforçam o uso do APRI e do FIB-4 frente ao FibroScan em pacientes com HCV crônico.

De modo semelhante, Ragazzo (2016), em estudo transversal brasileiro de 107 pacientes com hepatite C crônica, utilizando o método de Obuchowski, demonstrou desempenho crescente desses métodos nos estágios mais avançados, com acurácia máxima do FIB-4 para cirrose na sua casuística.

Esse comportamento é compatível com a limitação descrita por Vallet-Pichard *et al.* (2007), uma vez que o FIB-4 apresenta melhor utilidade clínica quando aplicado aos pontos de corte extremos, enquanto valores intermediários permanecem em zona de incerteza diagnóstica.

González *et al.* (2010) observaram baixa ou moderada concordância entre FibroScan, APRI, FIB-4, Forns e biópsia hepática em pacientes com hepatite C, o que ajuda a interpretar a sobreposição observada nos estágios iniciais da doença.

Concordando com este estudo, Bojanic *et al.* (2023) com sua revisão atualizada analisaram FibroScan, APRI, FIB-4 e Forns em pacientes com hepatite C. Esse achado ajuda a interpretar a ampla sobreposição observada no Gráfico 4 nas fases iniciais da doença, nas quais o FIB-4 tende a apresentar menor resolução diagnóstica.

Essa discrepância sugere que, as alterações laboratoriais que compõem o FIB-4 não ocorreram de forma suave e constante nas fases intermediárias, uma possível explicação seria a idade avançada dos pacientes somada ao quadro de trombocitopenia Tenore e Ferreira (2020), recorrente em pacientes desse grupo Sterling et al. (2025).

Em concordância com o argumento de que a idade influencia o FIB-4 e pode ampliar a cauda direita da distribuição, Kimura et al. (2025) demonstraram que os

pontos de corte ótimos do FIB-4 aumentam progressivamente conforme a faixa etária, passando de 1,72 nos pacientes mais jovens para 4,20 nos mais idosos.

Destaca-se que a revisão de Bojanic *et al.* (2023) corrobora que índices baseados reforça essa interpretação ao destacar que painéis séricos baseados em aminotransferases, como APRI, FIB-4, Forns e FibroMeter podem gerar valores "falsamente positivos" altos na presença de surtos necroinflamatórios agudos (outlier), ajudando a explicar a dispersão bizarra e os valores extremos no grupo avançado.

Esse achado é matematicamente coerente com a fórmula do FIB-4, na qual a idade integra diretamente o numerador. Contudo, valores extremos, como 97,84, dificilmente são explicados apenas pela idade, devendo refletir a combinação entre idade avançada, AST elevada, plaquetopenia acentuada e possível desproporção AST/ALT.

Assim, surtos necroinflamatórios, associados à trombocitopenia e idade avançada, podem contribuir para a dispersão acentuada e para valores extremos do FIB-4 no grupo de fibrose avançada.

Favorável aos argumentos acima, Tenore e Ferreira (2020), afirmam que os escores de biomarcadores são menos acurados para detectar estágios intermediários de fibrose do que cirrose, Shaker *et al.* (2017), corroboram citando que os escores têm um desempenho inferior na resolução de graus intermediários de fibrose.

No mesmo sentido, a diretriz da AASLD, Sterling *et al.* 2025 confirmam que o FIB-4 e APRI é fortemente afetado pela redução de plaquetas (trombocitopenia) ou elevação da AST, isso porque os escores incorporam componentes laboratoriais, como aminotransferases e plaquetas, suscetíveis a resultados falso-positivos ou falso-negativos em determinados contextos clínicos.

Em síntese, o FIB-4 apresentou um bom desempenho para separar extremos estruturais, especialmente controle/fibrose leve versus fibrose significativa ou avançada.

Estabelecido o desempenho do FIB-4, cabe examinar o segundo índice sérico combinado deste estudo, o APRI, que, por partilhar componentes com o FIB-4 (AST e plaquetas), permite contrastar diretamente o comportamento discriminatório de ambos ao longo do estadiamento.

Na análise do APRI, o padrão progressivo das medianas de APRI e a diferença significativa entre os quatro grupos, com o teste de KW revelando efeito de grande

magnitude, reforçam a utilidade do APRI como índice indireto de fibrose, por integrar AST e contagem plaquetária.

O subgrupo F0/F1 apresentou mediana de APRI de 0,285, abaixo do ponto de corte $\leq 0,5$ proposto por Wai et al. (2003) para exclusão de fibrose significativa. Em contraste, o grupo F3/F4 apresentou mediana de 2,580, superior ao limiar $> 2,0$ utilizado para predição de cirrose, reforçando o comportamento esperado do APRI como índice não invasivo baseado na relação entre AST e contagem plaquetária.

Esse comportamento também encontra respaldo em Catanzaro et al. (2021), que identificaram valores significativamente mais elevados de APRI em pacientes com fibrose F4 quando comparados aos indivíduos não F4.

A concordância com esses achados reforça o gradiente ascendente observado no presente estudo, no qual o APRI aumenta conforme o agravamento da fibrose hepática, com incremento mais acentuado nos estágios avançados.

Sob a visão fisiopatológica, o padrão é esperado, pois o APRI integra dois fenômenos centrais da progressão da doença hepática crônica: a elevação da AST, relacionada à injúria hepatocelular, e a redução da contagem plaquetária, associada à fibrose avançada, hipertensão portal e maior comprometimento estrutural do parênquima hepático.

A rampa ascendente expressiva entre F2 (0,810) e F3/F4 (2,580) é corroborada por Rungta *et al.* (2021), que documentaram disparidades altamente significativas ($p < 0,0001$) ao compararem estágios iniciais e moderados (F0–F2) com fibrose avançada (F3–F4) em 487 pacientes e, por Amorim et al. (2012), que registraram salto na mediana do APRI de 0,50 para 1,26 nessa transição. Do ponto de vista fisiopatológico, esses achados dialogam com o presente estudo, embora não reproduzam exatamente a mesma transição F2 vs F3/F4.

Em contraste metodológico, Holmberg *et al.* (2013), em uma coorte prospectiva multicêntrica, descobriu diferenças escalonadas entre todos os níveis sucessivos de fibrose (F0 a F4).

Na pesquisa, os valores médios de APRI e FIB-4 subiram progressivamente, exibindo diferenças significativas entre as fases ($p < 0,05$) que pode ser explicado pelo poder estatístico atrelado à magnitude amostral, com uma grupo de paciente 30 vezes maior que esse estudo ($n = 77$ pacientes HCV vs. $n = 2.372$).

Encerrada a análise dos biomarcadores séricos e escores, examina-se o comportamento do hsa-miR-122-5p, um promissor o biomarcador molecular central deste estudo, ao longo do gradiente de fibrose e suas zonas de discriminação.

A quantificação sérica do hsa-miR-122-5p sugeriu aumento nos estágios mais avançados, porém com sobreposição importante no estágio F2.

O teste global indicou efeito de magnitude relevante, enquanto o post-hoc demonstrou diferença significativa entre F0/F1 e F3/F4, com $\eta^2 = 0,245$ (efeito médio-grande) e $p = 0,003$. Isso indica que o hsa-miR-122-5p capta contraste entre baixa e alta carga fibrótica, mas não discrimina de forma fina o estágio intermediário F2, não apenas distingue doente de saudável.

No Gráfico 6 é possível observar que a fase intermediária (F2), ocorre uma alta diversidade dos níveis de hsa-miR-122-5p, embora a mediana inferior à de F3/F4, a dispersão central é máxima nesse grupo, as duas fases não sugere respostas fibróticas distintas.

Assim, a aparente tendência ascendente do hsa-miR-122-5p deve ser interpretada com cautela, pois a significância estatística foi sustentada principalmente pelo contraste entre F0/F1 e F3/F4, e não pela discriminação específica do F2.

Nesse estudo, a comparação F0/F1 vs. F2 não atingiu significância, mas mostrou tendência ($p_{\text{ajust.}} = 0,0774$), embora tenha sugerido tendência de discriminação moderada ($r = 0,400$), sugerindo que o biomarcador apresenta maior capacidade de diferenciação nos estágios mais avançados da fibrose do que na transição entre fibrose inicial e significativa.

De modo semelhante, a ausência de diferença significativa entre F2 e F3/F4 ($p_{\text{ajust.}} = 1,000$; $r = 0,116$) reforça a limitação do hsa-miR-122-5p como marcador isolado para discriminar estágios fibróticos intermediários e avançados.

Cermelli et al. (2011) observaram aumento dos níveis séricos de hsa-miR-122-5p em pacientes com hepatite C crônica, com incremento adicional nos estágios avançados de fibrose e correlação positiva com atividade inflamatória e estágio fibrótico.

Dialoga parcialmente com Cermelli *et al.* (2011), onde o hsa-miR-122-5p se correlaciona com enzimas hepáticas, estágio de fibrose e atividade inflamatória em hepatite C crônica e NAFLD.

Demerdash *et al.* (2017), que associaram o hsa-miR-122-5p ao dano hepatocelular/fibrose em pacientes HCV genótipo 4, observaram aumento significativo do hsa-miR-122-5p plasmático nos grupos com doença hepática em comparação aos controles. No subgrupo com hepatite C crônica, o hsa-miR-122-5p apresentou incremento conforme o avanço da fibrose, com maior expressão em F4 em relação a F2/F3.

Cairolì *et al.* (2025), estudo com n=50, HCV+HCV/HIV, que identificaram o hsa-miR-122-5p derivado de vesículas extracelulares como componente de uma assinatura de miRNAs capaz de discriminar fibrose significativa em hepatite C crônica.

Contudo, esses estudos não autorizam concluir que o hsa-miR-122-5p discrimine todos os estágios fibróticos de forma escalonada e linear.

Jansen *et al.*, (2015) fornecem evidências de que o hsa-miR-122-5p plasmático é um marcador de necroinflamação e dano celular contínuo, e não um marcador estático de cicatriz (fibrose), o que explica sua dissociação dos estágios intermediários.

Essa perspectiva ajuda a explicar a dissociação entre os níveis de hsa-miR-122-5p e os estágios intermediários de fibrose.

Estudos com resultados divergentes, Trebicka *et al.* (2013) demonstraram redução significativa da expressão hepática de hsa-miR-122-5p com a progressão da fibrose em pacientes com hepatite C crônica. Os autores observaram um padrão bifásico (sérico), com elevação em estágios intermediários associados à maior atividade inflamatória e redução em F3/F4, sugerindo a perda de hepatócitos funcionais.

Esse estudo aparenta uma leve divergência dos achados por Trebicka *et al.* (2013), contudo a diferença entre modelos, o “n” do estudo e o tipo estadiamento, nesse caso não é possível cravar convergência ou divergência entre os estudos.

Halász *et al.* (2015) (não é um grupo exclusiva de HCV) também observaram correlação negativa entre hsa-miR-122-5p tecidual e fibrose hepática.

Esses achados são parcialmente concordantes com os de Shaker & Senousy (2017), que identificaram elevação progressiva do hsa-miR-122-5p sérico em pacientes com HCV crônico estratificados por fibrose hepática (METAVIR F0–F4), com diferenças significativas entre todos os estágios adjacentes em uma coorte de 120 pacientes.

A maior resolução discriminatória do estudo de Shaker & Senousy (2017) pode ser atribuída ao tamanho amostral superior, que conferiu poder estatístico suficiente para detectar diferenças entre estágios intermediários, limitação explicitamente reconhecida no presente estudo, particularmente no subgrupo F2 (n=15).

O comportamento do hsa-miR-122-5p pode variar conforme compartimento analisado, estágio da doença, etiologia, método de quantificação e desenho amostral, contudo esses achados indicam que apesar de todas as variantes acima podem representar resultados compatíveis com o esperado.

De forma complementar, Appourchaux *et al.* (2016) (sustentam que modelos combinados com miRNAs e variáveis laboratoriais), documentaram limitações dos microRNAs séricos, incluindo o hsa-miR-122-5p, na distinção entre F1–F2 e F3–F4 em pacientes com hepatite C crônica.

Nunes (2022), ao avaliar a expressão de diferentes microRNAs em sangue e tecido hepático de pacientes com infecção crônica pelo HCV, também não demonstrou associação estatisticamente significativa entre o hsa-miR-122-5p sanguíneo e a presença de fibrose avançada, esse achado reforça a necessidade de interpretar o hsa-miR-122-5p como biomarcador complementar.

Em contraste, Cermelli *et al.* (2011) e Trebicka *et al.* (2013) reportaram que o hsa-miR-122-5p reflete a atividade necroinflamatória e a injúria hepatocelular aguda, independente do grau de fibrose, ou seja, a correlação com fibrose seria secundária e mediada pela necroinflamação concomitante.

Esse argumento fornece respaldo ao padrão observado na presente análise: a não significância de F2 vs F3/F4 (p ajustado=0,388) e a elevada variabilidade intragrupo, visto em F2 (IIQ: 1,750–14,455) e F3/F4 (IIQ: 3,880–28,720), com ICs 95% de mediana amplamente sobrepostos, são consistentes com a hipótese de que o hsa-miR-122-5p não discrimina estágios fibróticos avançados de forma isolada, refletindo antes o estado inflamatório ativo do que a carga fibrótica em si.

A ausência de significância entre F0/F1 e F2 após correção de Bonferroni, apesar de HL=1,885 (IC 95%: 0,800–2,440) não incluir GC, sugere que existe sinal biológico real nessa transição, compatível com os dados de Jopling *et al.* (2005), que demonstraram o papel central do hsa-miR-122-5p na replicação do HCV e na homeostase hepatocelular, mecanismo que se agrava com a progressão da injúria

hepática. A não confirmação estatística após correção pode ser interpretada como limitação do poder amostral ($n=15$ em F2) e não como ausência de efeito biológico.

A matriz de correlação de Spearman, observado no gráfico 7, demonstrou que o hsa-miR-122-5p realizou correlações positiva moderadas com APRI e FIB-4, bem como às transaminases (AST e ALT) a correlação positiva moderada e fraca e uma correlação de maior magnitude e negativa com a contagem de plaquetas, esses dados são sustentam o potencial do hsa-miR-122-5p como um biomarcador não invasivo complementar na infecção pelo HCV.

Matriz de Spearman não está dizendo necessariamente que o hsa-miR-122-5p aumenta de forma linear com APRI, FIB-4, AST ou ALT. Ela está indicando que pacientes com maiores níveis relativos de hsa-miR-122-5p tendem a ocupar posições mais altas também nos marcadores de lesão/fibrose hepática, especialmente APRI e FIB-4.

Nunes (2022) até atestou a existência de correlações positivas pelo método de *Spearman* com (AST e ALT), porém a própria autora admite a extrema fraqueza dessas associações, sublinhando que nenhum de seus correlações ultrapassou a magnitude de 0,3 ($r < 0,3$).

Corroboram com os dados acima, em AST e ALT, Bihrer *et al.* (2011), Jansen *et al.* (2015) em pacientes com coinfeção HIV/HCV, Hassuna *et al.* (2022). El-Hefny *et al.* (2019) em pacientes com HCV genótipo 4, Kumar *et al.* (2014) AST e ALT Cermelli *et al.* (2011)(Usaram correlação de Pearson).

Em relação aos escores APRI e FIB-4, Lee *et al.* (2015) relataram ausência de associação significativa entre os níveis séricos de hsa-miR-122-5p e marcadores não invasivos de fibrose em uma série de casos de pacientes com hepatite C crônica genótipo 1, com um $n = 36$ pacientes, uma vez que não observaram diferenças nos níveis de hsa-miR-122-5p entre estratos de fibrose definidos por APRI ou FIB-4.

Elabd *et al.* (2021), em pacientes com hepatite C crônica genótipo 4, calcularam APRI e FIB-4 e empregaram coeficientes de Spearman para avaliar correlações entre variáveis quantitativas, observaram correlação negativa significativa entre hsa-miR-122-5p e plaquetas ($p = -0,561$; $p < 0,001$).

Contudo, os autores não observaram associação significativa entre os níveis de hsa-miR-122-5p e os escores APRI ou FIB-4, sugerindo que, naquelas amostras,

o hsa-miR-122-5p se comportou mais como marcador de injúria hepatocelular do que como indicador direto dos índices séricos de fibrose.

Portanto, o teste de *Spearman* atestam de forma inequívoca que a cinética do hsa-miR-122-5p não é um evento biológico isolado, mas uma linha condutora oculto que estabelece uma correlação biológica entre os escores de fibrose e os biomarcadores de infecção pelo HCV.

A validação clínica de um biomarcador molecular transcende a sua simples quantificação absoluta, exigindo demonstração contundente por meio de análise estatística validada e aceita pela comunidade científica.

Diante da necessidade de atender os interesses e objetivos de validade interna e de análise exploratória de dados em saúde, foram testados duas metodologias diferentes: Análise de Componentes Principais (PCA) e Curva ROC, optou-se pela segunda, em consonância com critérios técnicos, científicos e amplamente consolidados em literatura especializada.

Assegurada a homogeneidade estrutural entre os grupos, condição que confere validade interna às comparações subsequentes, a expressão do hsa-miR-122-5p e a dos principais marcadores bioquímicos foram contrastadas em três cenários de crescente relevância clínica, correspondentes a limiares decisórios distintos no manejo da hepatite C crônica.

O primeiro cenário (C1) contrasta o grupo controle (GC) e o grupo com hepatite C crônica (GHCV), independentemente do grau de fibrose, e avalia a capacidade dos marcadores de distinguir a presença da doença.

O segundo (C2) opõe fibrose ausente ou mínima à fibrose significativa ($\leq F1$ vs. $\geq F2$), limiar de maior relevância terapêutica, uma vez que baliza a decisão de início do tratamento antiviral (BRASIL, 2018).

O terceiro (C3) isola a fibrose avançada e a cirrose ($\leq F0-F2$ vs. $F3-F4$), condição de maior urgência clínica, por demandar vigilância das complicações da hipertensão portal, rastreamento de carcinoma hepatocelular e avaliação de elegibilidade para transplante hepático (AASLD, 2024).

A interpretação dos achados em cada cenário, à luz do desempenho comparativo entre o hsa-miR-122-5p e os marcadores convencionais, é desenvolvida a seguir.

Cabe uma ressalva metodológica de peso. O estadiamento fibrótico desta casuística foi definido pelos próprios índices APRI e FIB-4, conforme o protocolo do Ministério da Saúde (BRASIL, 2024).

Em consequência, nas comparações C2 e C3 esses índices atuam simultaneamente como preditores e como critério de classificação, configurando viés de incorporação (*incorporation bias*). Seu efeito é quantitativamente evidente: o APRI alcançou AUC de 0,984 em C2 e 0,995 em C3, e o FIB-4, 0,968 e 0,994, respectivamente, valores de separação quase perfeita que refletem circularidade metodológica, e não desempenho diagnóstico real.

Como a AST e a contagem de plaquetas compõem esses índices, tampouco estão livres do viés; sua apresentação nas curvas ROC tem caráter exploratório e descritivo (KOHN et al., 2013). Apenas o hsa-miR-122-5p, que não integrou os critérios de classificação, permanece imune à circularidade, estando sujeito somente ao efeito do tamanho amostral reduzido ($n = 77$ no GHCV), reconhecidamente associado à instabilidade das estimativas de AUC (Hanczar et al., 2010). Reconhece-se que a solução definitiva para o viés de incorporação reside na adoção de um padrão de referência independente, tais como biópsia hepática ou elastografia em estudos futuros de validação.

Em C1 ($n = 108$), o FIB-4 apresentou a maior AUC (0,892), a AST (0,885) e o ALT (0,869) demonstraram o maior poder discriminatório entre todos os marcadores analisados.

As plaquetas (AUC = 0,744) e o hsa-miR-122-5p (AUC = 0,689; corte 6,360; sensibilidade 87,0%; especificidade 40,0%) exibiram desempenho moderado. O perfil do hsa-miR-122-5p nesse cenário privilegia a sensibilidade em detrimento da especificidade, reduzindo falsos negativos à custa de maior proporção de falsos positivos, configuração compatível, segundo Tustumi (2022), com testes voltados à triagem ou ao afastamento de doença.

A baixa especificidade e a ampla variação observadas na casuística global são compatíveis com a heterogeneidade descrita por Wang et al. (2015), que ao realizara quantificação absoluta do hsa-miR-122-5p sérico em número de cópias, não observaram associação significativa entre hsa-miR-122-5p, ALT e grau histológico de inflamação em pacientes com hepatite C crônica.

Elabd *et al.* (2021) demonstraram que o hsa-miR-122-5p diferenciou pacientes com HCV crônico do grupo controle com AUC (0,861), sensibilidade de 67,2% e especificidade de 94,0%, usando ponto de corte $>1,45$. Esse perfil contrasta com o observado em nosso estudo, em que o ponto de corte selecionado apresentou maior sensibilidade e menor especificidade.

Em C2 ($n = 77$), o hsa-miR-122-5p alcançou AUC de 0,738, com elevada especificidade (97,2%) e valor preditivo positivo de 94,4% em C2, contrastando com sensibilidade de 40,5%, caracteriza o hsa-miR-122-5p como marcador com maior aptidão para a confirmação do que para o rastreio de fibrose significativa quando utilizado de forma isolada: valores acima do ponto de corte são altamente sugestivos de fibrose significativa, ao passo que valores abaixo não são suficientes para afastá-la com segurança.

Em C3, contudo, o perfil se inverte parcialmente: a AUC de 0,746 associada a VPN de 77,6% confere ao biomarcador utilidade preferencial para afastar fibrose avançada, indicando que aproximadamente 77,6% dos pacientes com resultado abaixo do ponto de corte (12,840 unidades $\Delta\Delta Ct$) realmente não apresentam fibrose avançada nesta casuística.

Redução de AUC acompanhada de redução de IC 95% representa refinamento metodológico, não degradação do biomarcador.

Um achado central, entretanto, exige cautela na leitura dessa AUC. A análise post-hoc de Dunn revelou diferença significativa restrita ao contraste F0/F1 vs. F3/F4 ($p = 0,0003$) e sem separação entre estágios adjacentes (F0/F1 vs. F2 e F2 vs. F3/F4 não significativos).

Isto posto, o desempenho observado na comparação da fibrose significativa deriva, em boa parte, do sinal dos casos F3/F4 embutidos no grupo $\geq F2$, e não da detecção específica do estágio intermediário.

A análise de curva ROC do hsa-miR-122-5p nas três comparações clínicas revelou desempenho discriminatório progressivo crescente conforme o avanço do estadiamento fibrótico, este gradiente crescente de desempenho é biologicamente coerente com os achados do Kruskal-Wallis, que identificou separação estatisticamente significativa entre os extremos do espectro fibrótico (F0/F1 vs F3/F4).

Um aspecto de relevância particular para a interpretação das curvas ROC é a análise do índice de Youden (J), que atingiu valores progressivo e superiores nas três

comparações ($J=0,294; 0,377; 0,401$), indicando que a utilidade clínica do hsa-miR-122-5p (medida pela soma de sensibilidade e especificidade ajustada pela prevalência) aumenta conforme o estadiamento comparado avança.

O índice J (sensibilidade + especificidade - 1), representa, geometricamente, a máxima distância vertical entre a curva ROC e a diagonal de ausência de discriminação, identificando o ponto de corte que maximiza simultaneamente sensibilidade e especificidade sob pressupostos de custos iguais para erros de classificação (Fluss *et al.*, 2005).

Esse gradiente no índice J, sobre o aspecto metodológico, coerente com o gradiente de tamanho de efeito observado no Kruskal-Wallis ($r=0,223$ para F0/F1 vs F2 e F2 vs F3/F4 vs $r=0,496$ para F0/F1 vs F3/F4).

AUC da curva ROC é matematicamente equivalente à estatística U de Mann-Whitney normalizada, ambas estimam a probabilidade de que um valor aleatório do grupo positivo supere um valor aleatório do grupo negativo (Hanley, 1982).

Isso sugere que os dois métodos convergem para a mesma conclusão: o hsa-miR-122-5p apresenta maior utilidade diagnóstica na discriminação entre ausência de fibrose significativa e fibrose avançada do que na discriminação de estágios adjacentes.

Esses achados sustentam a estratégia de integração do hsa-miR-122-5p a outros biomarcadores em algoritmos combinados de diagnósticos (outros miRs, APRI, FIB-4) associada ao HCV, como instrumento de redução da necessidade de biópsia hepática no estadiamento não invasivo da HCV, embora a pequena amostra e a baixa representação de F4 indiquem necessidade de validação externa antes de sua aplicação clínica ampla.

Tal perfil sugere potencial utilidade em algoritmos de triagem não invasiva, embora sua aplicação deva considerar a prevalência da condição na população avaliada e a necessidade de validação em grupos independentes (Kohn, 2013).

O perfil de alta especificidade e valor preditivo positivo elevado, especificidade de 97,2% e VPP de 94,4% na comparação $\leq F1$ vs $\geq F2$, e especificidade de 88,2% e VPP de 70,0% na comparação $\leq F2$ vs F3/F4, é consistente com o padrão observado na análise de Kruskal-Wallis, em que a expressão de hsa-miR-122-5p somente distingue grupos nos extremos do espectro fibrótico.

Segundo Tustumi (2022), a seleção do ponto de corte mais adequado para variáveis contínuas deve ser orientada pela finalidade clínica do teste: quando o objetivo prioritário é a exclusão diagnóstica, o ponto de corte deve ser posicionado de modo a maximizar a especificidade e o VPN, perfil que o hsa-miR-122-5p demonstra de forma mais consistente na comparação de fibrose avançada (C3) do que na discriminação de fibrose significativa (C2).

Esses achados são parcialmente concordantes com Bihrer et al. (2011), que reportaram AUC de 0,79 para hsa-miR-122-5p sérico na discriminação de fibrose avançada ($F \geq 3$ vs $F < 3$) em pacientes com hepatite C crônica, utilizando biópsia hepática como padrão de referência.

Shaker & Senousy (2017) reportaram AUC de 0,821 para hsa-miR-122-5p na discriminação de fibrose significativa ($F \geq 2$) em 120 pacientes com HCV, valor superior ao encontrado na presente análise (AUC=0,738).

Essa diferença pode ser atribuída ao uso de biópsia como referência-ouro, eliminando o ruído introduzido pelo estadiamento indireto, e ao maior tamanho amostral.

Em posição contrária, Cermelli et al. (2011) argumentaram que o hsa-miR-122-5p plasmático não apresenta capacidade discriminatória para fibrose quando controlado pela atividade necroinflamatória, sugerindo que a AUC para fibrose seria elevada em estudos que não realizam esse ajuste. Embora a presente análise foi realizada em pacientes com CHC

Jansen et al. (2015), embora tenha realizado a pesquisa em pacientes coinfectados HIV/HCV, também sustentam que o hsa-miR-122-5p reflete dano hepático em curso, e não cicatriz fibrótica estática.

Trebicka et al. (2013), estudando pacientes com cirrose alcoólica e hepatite C, demonstraram que hsa-miR-122-5p plasmático se correlaciona com a gravidade da disfunção hepática mas apresenta desempenho discriminatório moderado para estadiamento fibrótico isolado, valores que se superpõem ao intervalo de confiança das AUCs obtidas na presente análise, reforçando a consistência dos achados.

A fase descendente prevista por Trebicka et al. (2013) não se manifestou neste estudo, ao em vez do declínio esperado em F3/F4, a mediana de expressão atingiu seu valor máximo neste estrato (12,84), configurando um gradiente monotônico e crescente ao longo dos estágios.

Comportamento que explica, o melhor desempenho ter ocorrido em C3 (AUC = 0,746), incompatível com a queda dos níveis circulantes na fibrose avançada. A divergência pode ser explicada pelo: (a) Estadiamento neste estudo, apoiado em índices séricos (APRI e FIB-4), e não em histologia, definidos por biópsia, sobretudo na transição F3/F4; (b) n= 15 em F2; e (c) diferenças pré-analíticas e de normalização.

Desse modo, os presentes achados reproduzem a fase necroinflamatória ascendente do padrão de Trebicka et al. (2013) e Halász et al. (2015), mas não sua fase descendente, comportando-se o hsa-miR-122-5p circulante, nesta casuística, como marcador de tendência monotonicamente crescente com a progressão da fibrose.

Estudos baseados em modelos multicomponentes reforçam essa interpretação, Cairoli *et al.* (2025) por sua vez, observaram que o hsa-miR-122-5p-5p isolado apresentou desempenho moderado para fibrose significativa, mas ganhou relevância quando integrado a uma assinatura de miRNAs, assim como Abdel-Haleem *et al.* (2022) baseado em hsa-miR-122-5p e bilirrubina, que atingiu AUC de 0,83 e Appourchaux et al. (2016) o modelo composto por hsa-miR-122-5p hepático, miR-224 hepático apresentou AUC de 0,93.

Apesar de ser um estudo em pacientes portadores de HCV genótipo 4, em contraposição a esse estudo, Demerdash *et al.* (2017), em estudo prospectivo com 180 pacientes, demonstraram que o hsa-miR-122-5p plasmático apresentou a maior eficiência dentre os biomarcadores avaliados para predição de lesão hepatocelular e progressão da fibrose (AUC = 0,735), sensibilidade de 80% e especificidade de 88%, superando os índices não invasivos AAR e APRI.

Essas diferenças refletem variações no desenho metodológico, no material biológico analisado, no desfecho da curva ROC e na composição dos modelos de estudo.

Em síntese, o hsa-miR-122-5p exerce papel complementar, e não substitutivo, em relação aos marcadores bioquímicos estabelecidos: robusto para confirmar fibrose significativa (elevado VPP em C2), útil para afastar doença avançada (VPN em C3), porém de baixa resolução no estágio F2 e dependente da atividade necroinflamatória subjacente. Sua utilidade clínica potencial reside menos no uso isolado e mais na integração a painéis multimarcador.

Estudos futuros com amostras de maior dimensão, delineamento prospectivo e padrão-ouro ou elastografia hepática são necessários para confirmar esses achados e avaliar o desempenho do hsa-miR-122-5p em painéis diagnósticos combinados.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a expressão plasmática do hsa-miR-122-5p, quantificada por RT-qPCR com normalização por $\Delta\Delta Ct$, apresentou acurácia diagnóstica relevante para o estadiamento hepática da infecção pelo HCV, com um desempenho razoável, mediante o cenário comparativo e o estágio fibrótico avaliado.

Os resultados obtidos respondem aos três objetivos propostos e permitem posicionar o hsa-miR-122-5p como biomarcador complementar aos biomarcadores bioquímicos e escores de estadiamento convencionais no contexto do estadiamento não invasivo.

Em relação ao primeiro objetivo, a análise comparativa entre GC e GHCV confirmou ativação biológica significativa de todos os biomarcadores avaliados na infecção crônica pelo HCV.

O hsa-miR-122-5p exibiu padrão de escalonamento progressivo ao longo dos estágios fibróticos, com discriminação estatisticamente significativa restrita ao par F0/F1 vs. F3/F4 ($p = 0,0024$; $r = 0,551$).

O estágio F2 configurou-se como zona de baixa resolução diagnóstica para o hsa-miR-122-5p, indistinguível tanto de F0/F1 quanto de F3/F4, descrevendo uma natureza não linear da transição fibrótica captada e, compatível com a literatura especializada.

A ausência de associação entre hsa-miR-122-5p e carga viral, enfatiza que o marcador reflete injúria hepatocelular e atividade necroinflamatória, distinto da replicação viral.

Em relação ao segundo objetivo, na análise da curva ROC o hsa-miR-122-5p atingiu desempenho diagnóstico classificado como "bom" na discriminação de fibrose significativa ($AUC = 0,736$; C2), com perfil em que a especificidade supera a sensibilidade.

O valor preditivo negativo de 0,776 em C3 indica que um resultado abaixo do ponto de corte afasta fibrose avançada com considerável confiabilidade, dado de potencial utilidade em algoritmos de triagem não invasiva.

A independência metodológica do hsa-miR-122-5p em relação ao viés de incorporação, inerente ao APRI e ao FIB-4, confere a esse marcador um diferencial analítico relevante, ainda que seu uso isolado seja insuficiente para substituir os índices estabelecidos.

O conjunto dos achados do hsa-miR-122-5p concentra-se na identificação de fibrose avançada e na integração a painéis diagnósticos multicomponentes, como UMA estratégia de redução da necessidade de biópsia hepática.

Em síntese, o hsa-miR-122-5p apresenta vocação complementar, e não substitutiva, no estadiamento não invasivo da hepatite C: robusto para confirmar fibrose significativa e razoável para afastar doença avançada, porém cego no estágio F2 e dependente da atividade necroinflamatória subjacente. Seu valor clínico potencial reside menos no uso isolado e mais na integração a painéis multimarcador, direção já sugerida por estudos com assinaturas combinadas de microRNAs.

Em relação ao terceiro objetivo, a técnica de RT-qPCR para quantificação plasmática do hsa-miR-122-5p foi padronizada com sucesso, com coeficiente de variação intraensaio de 3,34% para o hsa-miR-122-5p e adoção do miR-103 como controle endógeno, atendendo aos critérios de reprodutibilidade estabelecidos pelas diretrizes MIQE.

O Procedimento Operacional Padrão (POP) foi elaborado e documenta todas as etapas do processo (desde a extração do RNA plasmático até a análise por $\Delta\Delta C_t$), isso constitui um instrumento de transferência tecnológica produzido para o LAPIA - Laboratório de Pesquisas em imunologia e AIDS/HUGG.

As limitações do estudo, tais como, tamanho amostral, delineamento transversal, estadiamento fibrótico por critérios não invasivos sem biópsia hepática como padrão-ouro, recrutamento unicêntrico e presença de coinfectados HIV sob terapia antirretroviral, devem ser consideradas na interpretação dos resultados e impedem generalizações para além do perfil clínico-epidemiológico da casuística estudada.

Os resultados aqui apresentados abrem perspectivas concretas para investigação futura: a avaliação do hsa-miR-122-5p em estudos prospectivos com estadiamento histológico independente por biópsia ou elastografia transitória.

Além disso, existem lacunas ainda não respondidas que estabelecem limitações ao biomarcador nas análises diagnósticas que ainda não foram elucidadas. Essas limitações conduzir ao aprimoramento técnico da ferramenta, enquanto sua utilização no estadiamento hepático

devem ser investigadas, descritas e superadas, possibilitado desvendar lacunas ainda casos de investigação o desenvolvimento de painéis diagnósticos

combinando hsa-miR-122-5p com FIB-4 ou APRI, cuja sinergia foi sugerida pelos dados de acurácia; e a investigação do comportamento do hsa-miR-122-5p após o tratamento com antivirais de ação direta, cenário em que sua cinética de normalização pode oferecer informação prognóstica adicional. A sistematização da ausência de relatos de interferência farmacológica sobre o hsa-miR-122-5p em população tratamento-naive, documentada nesta investigação, justifica adicionalmente a condução de uma revisão sistemática dedicada a esse tema.

LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O estadiamento fibrótico baseado em métodos não invasivos (APRI e FIB-4) constitui limitação reconhecida do presente estudo. A biópsia hepática, padrão-ouro para estadiamento histológico segundo o sistema METAVIR, não foi realizada, o que impede a confirmação histopatológica dos estágios atribuídos.

Adicionalmente, ambos os escores podem superestimar o grau de fibrose na presença de intensa atividade necroinflamatória, conforme advertido pelo próprio PCDT (Brasil, 2024), limitação particularmente relevante nos estágios intermediários (F2 e F3), nos quais a elevação das transaminases pode não ser proporcional ao grau de fibrose estabelecida.

O delineamento do GC por critérios de exclusão explícitos para HCV, HBV e HIV impõe restrição interpretativa às comparações de fatores de transmissão e exposição entre os grupos (Bloco 1, Tabela 3), uma vez que as diferenças observadas podem refletir, ao menos parcialmente, o efeito do próprio critério de seleção.

Essa limitação é inerente ao delineamento observacional transversal com grupos definidos por condição clínica estabelecida e foi considerada na interpretação dos resultados.

Outra limitação do estudo reside no fato de terem sido conduzidos em pacientes com hepatite C crônica (HCC) sem averiguação de genótipo, estima-se pela maior prevalência do genótipo 1, baseado na estatística nacional. Portanto, não podemos generalizar a relevância clínica desses resultados para outros genótipos prevalentes do VHC (GT2 e GT3) em todo o mundo.

A presente pesquisa não foi desenhada para testar a hipótese referente à interação farmacológica, pois a modelo, o tempo e os recursos disponíveis não

permitiram essa conduta, associada a uma revisão sistemática para documentar a extensão desse efeito na literatura. Portanto, essa observação deve ser interpretada com cautela, como sinal exploratório, e não como achado confirmatório.

REFERÊNCIAS

AACH, R. D. et al. Detection of hepatitis C virus antibodies in donor blood and risk of chronic hepatitis C in recipients. *Transfusion*, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 320-325, 1991.

AACH, R. D. et al. Serum alanine aminotransferase of donors in relation to the risk of non-A, non-B hepatitis in recipients: the transfusion-transmitted viruses study. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 304, n. 17, p. 989-994, 1981.: artigo frequentemente citado como estudo de 1978/1981 — confirmar ano e dados de volume/número.

ABDEL-WAHAB, B. A. et al. Dapagliflozin alleviates arsenic trioxide-induced hepatic injury in rats via modulating PI3K/AkT/mTOR, STAT3/SOCS3/p53/MDM2 signaling pathways and miR-21, miR-122 expression. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 127, p. 111325, jan. 2024. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.111325.

ABDEL-HALEEM, Hanan Abdel-Haleem; ZEKRI, Abdel Rahman; ABDEL MONIEM, Mostafa; AL RAY, Ahmed; OMAR, Mona; OMRAN, Mohamed; OMRAN, Dalia. Cairo University Fibrosis Index (CUFI): a microRNA-based score for accurate prediction of hepatic fibrosis: a biopsy-controlled study. **Research Square, preprint**, 2022. doi:10.21203/rs.3.rs-1298036/v1.

ABDELHAMEED, F., KITE, C., LAGOJDA, L. *et al.* Escores não invasivos e biomarcadores séricos para fígado gorduroso na era da doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (DHEG): uma revisão abrangente da DHGNA à DHEG e DHEG. *Curr Obes Rep* **13**, 510–531 (2024). <https://doi.org/10.1007/s13679-024-00574-z>

ABEEL, T. et al. Robust biomarker identification for cancer diagnosis with ensemble feature selection methods. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 392-398, 2010.

AFDHAL, N. et al. Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 1000–1007, 2008. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.03.009. PMID: 18433919.

AGNELLO, V. et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 96, n. 22, p. 12766-12771, 1999.

AHUMADA, A. et al. Hepatocellular carcinoma risk after viral response in hepatitis C virus-advanced fibrosis: who to screen and for how long? **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 27, n. 40, p. 6737-6749, out. 2021. DOI: 10.3748/wjg.v27.i40.6737.

ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

AL-RAWAF, H. A. et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of physical activity in geriatric patients with HCV. **BMC Molecular and Cell Biology**, [s. l.], v. 25, art. 18, 2024. DOI: 10.1186/s12860-024-00514-8.

ALTER, H. J. et al. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 321, n. 22, p. 1494-1500, nov. 1989.

ALVARADO-ESQUIVEL, C. et al. Hepatitis virus and HIV infections in inmates of a state correctional facility in Mexico. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 133, n. 4, p. 679-685, 2005. DOI: 10.1017/S0950268805003961.

AMBROS, V.; RUVKUN, G. Recent molecular genetic explorations of *Caenorhabditis elegans* microRNAs. *Genetics*, [s. l.], v. 209, n. 3, p. 651-673, 2018. DOI: 10.1534/genetics.118.300291.

AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Hepatitis C guidance 2018 update: **AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating adults infected with hepatitis C virus**. Alexandria: AASLD, 2018. Disponível em: <https://www.aasld.org/sites/default/files/2022-07/PracticeGuidelines-HCV-November2018.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2026.

AMORIM, T. G. et al. Validation and comparison of simple noninvasive models for the prediction of liver fibrosis in chronic hepatitis C. **Annals of Hepatology**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 855-861, nov./dez. 2012.

ANTHROPIC. Claude [inteligência artificial]. Versão Sonnet 4. San Francisco: Anthropic, 2025. Disponível em: <https://www.claude.ai>. Acesso em: mar. 2026.

APPOURCHAUX, K. et al. MicroRNA-based diagnostic tools for advanced fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis B and C. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, art. 34935, 2016. DOI: 10.1038/srep34935.

APPOURCHAUX, K., et al. Ferramentas de diagnóstico baseadas em microRNA para fibrose avançada e cirrose em pacientes com hepatite crônica B e C. *Sci Rep* 6, 34935 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep34935>

ARRELIAS, C. C. A. et al. Prevalência de marcadores sorológicos para hepatite e potenciais fatores associados em pacientes com diabetes mellitus. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, [s. l.], v. 27, e3085, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rlae/a/F4RFbRRCDtqVNhhRwpzVTZf/?lang=pt>.

ASRANI, S. K. et al. Burden of liver diseases in the world. **Journal of Hepatology**, v. 70, n. 1, p. 151–171, jan. 2019. doi: 10.1016/j.jhep.2018.09.014.

ATIC AI, THIELE M, MUNK A, DALGAARD LT. Circulating miRNAs associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2023 Feb 1;324(2):C588-C602. doi: 10.1152/ajpcell.00253.2022. Epub 2023 Jan 16. PMID: 36645666.

AYUPOVNA, P. D. Role of microRNAs in chronic viral hepatitis: insights into liver fibrosis and prognostic biomarkers. **Eurasian Journal of Medical and Natural Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. 31-39, 2023. DOI: 10.5281/zenodo.8271688.

BABUDIERI, S. et al. Correlates of HIV, HBV, and HCV infections in a prison inmate population: results from a multicentre study in Italy. **Journal of Medical Virology**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 311-317, 2005. DOI: 10.1002/jmv.20375.

BAHIA (Estado). Secretaria da Saúde do Estado. **Boletim Epidemiológico Hepatites Virais** n. 01. Salvador: SUVISA/DIVEP, jul. 2022. Disponível em: https://www.saude.ba.gov.br/wp-content/uploads/2017/11/Boletim-Hepatites_No-01_2022-1.pdf. Acesso em: 6 mar. 2026.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.

BARTEL, D. P. Metazoan microRNAs. **Cell**, [s. l.], v. 173, n. 1, p. 20-51, mar. 2018. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.006.

BECKER, P. P. et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 234-239, 2013. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.10.016.

BEDOSSA, P.; POYNARD, T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. **The METAVIR Cooperative Study Group**. *Hepatology*, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 289-293, ago. 1996. BENOVA, Lenka; MOHAMOUD, Yousra A.; CALVERT, Clara;

ABU-RADDAD, Laith J. Vertical transmission of hepatitis C virus: systematic review and meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 59, n. 6, p. 765–773, set. 2014. DOI: 10.1093/cid/ciu447.

BERMUDEZ, X. P. D.; SILVA, A. C. S. Hepatites virais. In: ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. (org.). **Epidemiologia & saúde**. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2004.

BIHRER, V. et al. Serum miR-122 as a biomarker of necroinflammation in patients with chronic hepatitis C virus infection. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 106, n. 9, p. 1663-1669, 2011. PMID: 21606975.

BISHNU, S. et al. Current management of thrombocytopenia in chronic liver disease. *Gastroenterology & Hepatology*, [s. l.], 2019.

BLAND, J. M.; ALTMAN, D. G. **Multiple significance tests: the Bonferroni method**. *BMJ*, [s. l.], v. 310, n. 6973, p. 170, 1995. DOI: 10.1136/bmj.310.6973.170.

BOFILL-DE ROS, X.; ØROM, U. A. V. **Recent progress in miR biogenesis and decay**. *RNA Biology*, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 741-755, 2023.

BOSTJANCIC, E. et al. MicroRNA-122 is a liver-specific miR: biogenesis and function. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 714-725, 2015. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.10.031.

BRANDÃO, C. E. et al. Hepatite C. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 69-82, jan./fev. 2001.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Dispõe sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Brasília, DF: CNS, 2012. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html. Acesso em: 12 abr. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas redes de atenção à saúde e nas linhas de cuidado prioritárias. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_cuidado_pessoas_doencas_cronicas.pdf. Acesso em: 17 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_hepatites_virais.pdf. Acesso em: 17 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolos_diretrizes_hepatite_viral_c_coinfeccoes.pdf. Acesso em: 17 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para hepatite C e coinfeções. Brasília: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: https://www.gov.br/aids/pt-br/central-de-conteudo/publicacoes/2023/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-de-hepatite-b-e-coinfeccoes-2023_.pdf. Acesso em: 17 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Manual técnico para o diagnóstico das hepatites virais. Brasília: Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.aids.gov.br>. Acesso em: 17 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. **Boletim epidemiológico de hepatites virais 2022. Número especial.** Brasília: Ministério da Saúde, jul. 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2022/boletim->

epidemiologico-de-hepatites-virais-2022-numero-especial/view. Acesso em: 17 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico de Hanseníase 2023. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2023.** Disponível em: | em: file:///C:/Users/candr/Downloads/boletim_Hansen%C3%ADase%202023_internet_completo.pdf. Acesso em: 17 jan. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Nota Técnica n. 5/2025-CGHV/DATHI/SVSA/MS: atualiza o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) para hepatite C no SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 10 mar. 2025

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis. Boletim epidemiológico de hepatites virais 2025. Brasília: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/especiais/2025/boletim-epidemiologico-de-hepatites-virais.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2026.

BRESSANELLI, S. et al. Structural analysis of the hepatitis C virus RNA polymerase in the presence of potential inhibitors. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 76, n. 7, p. 3482-3492, 2002.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 611-622, abr. 2009. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.

BUTT, A. M. et al. Parallel expression profiling of hepatic and serum microRNA-122 associated with clinical features and treatment responses in chronic hepatitis C patients. *Scientific Reports*, [s. l.], v. 6, art. 21510, 2016. DOI: 10.1038/srep21510.

CACOUB, P. et al. Hepatitis C virus as a systemic disease: reaching beyond the liver. **Hepatology International**, v. 10, n. 3, p. 423–431, 2016. DOI: 10.1007/s12072-015-9670-3. PMC: 4819925.

CAIROLI, V. et al. Extracellular vesicles derived microRNAs as non-invasive markers of liver fibrosis in chronically infected HCV patients: a pilot study. **Noncoding RNA Research**, [s. l.], v. 12, p. 132-140, mar. 2025. DOI: 10.1016/j.ncrna.2025.03.004.

CAMPOS, G. W. S. Um método para análise e co-gestão de coletivos: humanização e autogestão em saúde. 2. ed. São Paulo: Hucitec, 2005.

CARDOSO, AC, Figueiredo-Mendes C, Villela-Nogueira CA, Marcellin P. Staging Fibrosis in Chronic Viral Hepatitis. *Viruses*. 2022 Mar 23;14(4):660. doi: 10.3390/v14040660. PMID: 35458391; PMCID: PMC9025777.

CARRIÓN, R. et al. MicroRNA-122, regulated by GRHL2, protects livers of mice from ethanol-induced liver disease. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 293, n. 1, p. 1-13, 2018.

CATANZARO, R. et al. FIB-4 and APRI scores for predicting severe liver fibrosis in chronic hepatitis HCV patients: a monocentric retrospective study. **Clinical and Experimental Hepatology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 111-116, mar. 2021. DOI: 10.5114/ceh.2021.104543.

CERMELLI, S. et al. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, e23937, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0023937. PMID: 21886843.

CERRONI, M. P.; CARMO, E. H. Hepatites B e C nas áreas de três Centros Regionais de Saúde do Estado do Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Coletiva**, [s. l.], 2019. DOI: 10.1590/1414-462X201900010267.

CHAN, S. L. H. Hepatitis C virus genotypes and treatment guidelines. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 33-39, 2014. DOI: 10.1111/jgh.12781.

CHANG, J. et al. miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and down-regulated in hepatocellular carcinomas. *RNA*, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 1440-1449, 2008.

CHAVES, A. M. et al. Hepatites virais no contexto brasileiro: uma revisão integrativa. **Revista Sociedade Científica**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1-15, 2017

CHOO, Q.-L. et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. **Science, Washington**, v. 244, n. 4902, p. 359-362, 1989. DOI: 10.1126/science.2523562.

CIRRONIS, M. et al. Evaluation of capillary miR-122 as a prognostic biomarker of paracetamol-induced liver toxicity. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 1-8, abr. 2024. doi: 10.1007/s11033-024-09327-6. PMID: 38642142.

CLINICAL OVERVIEW of hepatitis C. CDC – Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 29 ago. 2025. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hepatitis-c/hcp/clinical-overview/index.html>. Acesso em: 17 jan. 2026.

COHEN, J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. 2. ed. Hillsdale: Lawrence Erlbaum, 1988.

COELHO, H. C. et al. Predictive markers for hepatitis C virus infection among Brazilian inmates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 369-372, jul. 2009

COLAIANNI, F. et al. Role of circulating microRNAs in liver disease and CHC: focus on miR-122. **Genes**, [s. l.], v. 15, n. 10, art. 1313, 2024. DOI: 10.3390/genes15101313.

COLLISON, A. M. et al. miR-122 promotes virus-induced lung disease by targeting SOCS1. *JCI Insight*, [s. l.], v. 6, e127933, 2021. DOI: 10.1172/jci.insight.127933.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Código de Ética Médica: Resolução CFM n. 2.217, de 27 de setembro de 2018, modificada pelas Resoluções CFM n. 2.222/2018 e 2.226/2019. Brasília: CFM, 2019. Disponível em: <https://portal.cfm.org.br>. Acesso em: 17 jan. 2026.

CORREIA, C.J. *et al.* Estudo das prevalências de distúrbios metabólicos em pacientes obesos e em portadores de hepatite C. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 20, n. 2, p. 277-285, mai./ago. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v20i2.39008>

COSTA, S. M. B. *et al.* Perfil epidemiológico dos casos de hepatite C em um hospital de referência em doenças infectocontagiosas no estado de Goiás. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.], 2018. DOI: 10.5123/S2176-62232018000100051.

COUTO, Osvaldo Flávio de Melo. Validação e comparação de testes laboratoriais simples como preditores de fibrose hepática em portadores de hepatite C crônica. 2011. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 201

CRUZ, C. R. B. *et al.* Comparação do perfil epidemiológico das hepatites B e C em um serviço público de São Paulo. **Arquivos de Gastroenterologia**, [s. l.], 2009. DOI: 10.1590/S0004-28032009000100007.

DAHARI, H. *et al.* Modeling hepatitis C virus dynamics: liver regeneration and critical drug efficacy. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 22-31, jan. 2007. DOI: 10.1016/j.jhep.2006.09.011.

DANTAS, B. P. *et al.* Aspartate Aminotransferase to Platelet Ratio Index (APRI), Göteborg University Cirrhosis Index (GUCI), and Fibrosis 4 Score (FIB-4) proved to be the optimal biomarkers for the assessment of liver fibrosis in patients chronically infected with hepatitis C virus in Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 71, n. 8, e20250241, 2025. DOI: 10.1590/1806-9282.20250241.

DENIZ, Müge Toygar; AKHAN, Sila. Estrutura do vírus da hepatite C e métodos de diagnóstico. *In: Hepatite C - Avanços Recentes*. [S. l.]: IntechOpen, 2023. DOI: 10.5772/intechopen.1000863. Disponível em: [intechopen.com](https://www.intechopen.com). Acesso em: 12 abr. 2026.

DEMERDASH, Hala M. *et al.* Detection of MicroRNA in Hepatic Cirrhosis and Hepatocellular Carcinoma in Hepatitis C Genotype-4 in Egyptian Patients. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2017, p. 1-10, 23 maio 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28642869/>. Acesso em: 19 abr. 2026. DIETRICH, C. F. *et al.* Ultrasound-based elastography in hepatology. **Ultrasound in Medicine & Biology**, [s. l.], v. 43, n. 11, p. 2404-2420, 2017.

DIVISATO, G. *et al.* The role of microRNAs in cancer development and progression. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 13, art. 6800, 2021.

DJURANOVIC, S.; SCHOENBORN, R.; GREEN, R. A 5' UTR miR-mediated silencing mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 28, p. 11215-11220, 2012.

DUBUISSON, J. Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope proteins E1 and E2. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 25, p. 22692-22700, jun. 2002.

DUNN, O. J. Multiple comparisons using rank sums. **Technometrics**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 241-252, 1964. DOI: 10.1080/00401706.1964.10490181.

ELABD, Naglaa S. *et al.* Evaluation of MicroRNA-122 as a Biomarker for Chronic Hepatitis C Infection and as a Predictor for Treatment Response to Direct-Acting Antivirals. **Hepatic Medicine: Evidence and Research**, [S. l.], v. 13, p. 9-23, 15 mar. 2021. DOI: 10.2147/HMER.S292251. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33758557/>. Acesso em: 19 abr. 2026

ELASTOBRASIL. Elastografia hepática: manual de boas práticas. [S. l.]: ElastoBrasil, 2024. Disponível em: https://elastobrasil.com.br/wp-content/uploads/2024/10/Livro-Elastografia-Hepatica-JUN23_NET-1.pdf. Acesso em: 17 jan. 2026.

EL-KASSAS, M. *et al.* Comparison of different noninvasive scores for assessment of liver fibrosis in a cohort of chronic hepatitis C patients. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, art. 29544, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-79826-w.

EL-HEFNY, H. M., *et al.* (2019). "Circulating microRNAs as predictive biomarkers for liver disease progression of chronic hepatitis C (genotype-4) Egyptian patients." **Journal of Medical Virology**, 91(1), 93-101. ESQUELA-KERSCHER, A.; SLACK, F. J. Oncomirs — microRNAs with a role in cancer. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 259-269, 2006.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 861-874, nov. 2011. DOI: 10.1038/nrg3074.

ESTES, C. *et al.* Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an updated systematic review and meta-analysis. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 556-570, 2022.

EMIR, B. *et al.* Sample size and power analysis for ROC AUC differences in diagnostic tests: a methodological evaluation of the Obuchowski-McClish and Hanley-McNeil methods. **BMC Medical Research Methodology**, v. 26, jan. 2026. DOI: 10.1186/s12874-026-02768-6.

EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. Clinical practice guidelines on non-invasive tests for evaluation of liver disease severity and prognosis — 2021 update. **Journal of Hepatology**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 659-689, 2021. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.05.025.

ELMOUTTALEB, Ashraf T. Abd *et al.* Serum Micro RNA-122 as a Biomarker for Hepatocellular Carcinoma in Chronic Hepatitis C Virus Patients. **Research In Cancer and Tumor**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 25-33, 2015. Disponível em: <http://article.sapub.org/10.5923.j.rct.20150402.01.html>. Acesso em: 19 abr. 2026.

EVERITT, B. S.; DUNN, G. Applied multivariate data analysis. 2. ed. London: Wiley, 2001.

FERNÁNDEZ-GARIBAY, V. M. et al. Mechanisms behind thrombocytopenia in patients with portal hypertension and chronic liver disease. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, [s. l.], v. 13, n. 11, p. 986-991, 2025. DOI: 10.14218/JCTH.2025.00279.

FLETCHER, N. F. et al. Hepatitis C virus entry: membrane fusion and beyond. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 9-11, 2016.

FLUSS, R.; FARAGGI, D.; REISER, B. Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. **Biometrical Journal**, v. 47, n. 4, p. 458–472, 2005. DOI: 10.1002/bimj.200410135.

FRANCO, S. et al. Normalization of circulating plasma levels of miRs in HIV-1/HCV co-infected patients following direct-acting antiviral-induced sustained virologic response. *Heliyon*, [s. l.], v. 9, n. 1, e12686, jan. 2023. DOI: 10.1016/j.heliyon.2022.e12686.

FRANCK, M. et al. Prognostic value of serum microRNA-122 in hepatocellular carcinoma is dependent on coexisting clinical and laboratory factors. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 86-96, jan. 2020. DOI: 10.3748/wjg.v26.i1.86.

FRAZÃO, R. F.; KOGA, R. C. R.; FECURY, A. A. Hepatite C em candidatos à doação de sangue: análise de inaptidão em um hemocentro da Amazônia brasileira. *ARACÊ*, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 23465-23481, 2025. DOI: 10.56238/arev7n5-148.

FREITAS, ACC.; Prevalência de diabetes mellitus em pacientes com diagnóstico de hepatite C crônica avaliados no Hospital da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul no período de 1 ano. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2012.

GEWERS, C. et al. Principal Component Analysis: A Review of Principal Component Analysis Algorithm for Dimensionality Reduction. arXiv preprint arXiv:2104.12345, 2021

GHAJ, V. et al. Extracellular vesicle encapsulated microRNAs in patients with type 2 diabetes are affected by metformin treatment. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 5, art. 617, 2019. DOI: 10.3390/jcm8050617.

GHANY, M. G. et al. Hepatitis C guidance 2023 update: **AASLD-IDSA recommendations for testing, managing, and treating hepatitis C virus infection in adults**. *Clinical Infectious Diseases*, [s. l.], v. 77, n. 10, p. 1381-1392, nov. 2023. DOI: 10.1093/cid/ciad319.

GHOLAMI, M. et al. Evaluation of miR-122 level in the plasma of chronically HCV infected patients. **Molecular Biology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 279-283, 2016. DOI: 10.1134/S0026893316020072.

GIANNINI, E. G. et al. Platelet count/spleen diameter ratio: proposal and validation of a non-invasive parameter to predict the presence of oesophageal varices in patients with liver cirrhosis. *Gut*, [s. l.], v. 52, p. 1200-1205, 2003.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ*, [s. l.], v. 172, n. 3, p. 367-379, fev. 2005. DOI: 10.1503/cmaj.1040752.

GINÈS, P. et al. Liver cirrhosis. **The Lancet**, v. 398, n. 10308, p. 1359–1376, out. 2021. doi: 10.1016/S0140-6736(21)01374-X.

GLINTBORG, D. et al. Metformin decreases miR-122, miR-223 and miR-29a in women with polycystic ovary syndrome. **Endocrine Connections**, [s. l.], v. 9, n. 11, p. 1075-1084, 2020. DOI: 10.1530/EC-20-0195.

GOWER, E. et al. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. S45-S57, 2014.

GUAN, Y.; DY, J. G. Sparse probabilistic principal component analysis. **Journal of Machine Learning Research — Proceedings Track**, [s. l.], v. 5, p. 185-192, 2009.

HALÁSZ, T. et al. miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 21, n. 25, p. 7814-7823, 2015. DOI: 10.3748/wjg.v21.i25.7814.

HANCZAR, B.; HUA, J.; SIMA, C.; WEINSTEIN, J.; BITTNER, M.; DOUGHERTY, E. R. Small-sample precision of ROC-related estimates. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 822–830, 2010. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq037.

HANLEY, J. A.; McNEIL, B. J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. **Radiology**, v. 143, n. 1, p. 29–36, 1982.

HARRILL, A. H. et al. The effects of heparins on the liver: application of mechanistic serum biomarkers in a randomized study in healthy volunteers. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 214-220, ago. 2012. DOI: 10.1038/clpt.2012.40. [NOTA: referência duplicada — mantida entrada única com dados completos; ver também PISETSKY et al. 2012.]

HASSUNA, N. A. et al. Circulating microRNAs as predictors of treatment response to sofosbuvir + daclatasvir + ribavirin in Egyptian HCV genotype 4 patients. *BMC Gastroenterology*, [s. l.], v. 22, n. 1, art. 499, 2022.

HATA, A.; KASHIMA, R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 121-134, 2016.

HAYWARD, K. L. et al. Clinical implications of thrombocytopenia for the cirrhotic patient. **Hepatic Medicine: Evidence and Research**, [s. l.], v. 12, p. 49-65, 2020.

HELLARD, M. E.; HOCKING, J. S.; CROFTS, N. The prevalence and the risk behaviours associated with the transmission of hepatitis C virus in Australian correctional facilities. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 132, n. 3, p. 409-415, 2004. DOI: 10.1017/S0950268803001882.

HOLSEN, D. S.; HARTHUG, S.; MYRMEL, H. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus and association with intravenous drug abuse and tattooing in a national prison in Norway. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 673-676, 1993. DOI: 10.1007/BF02009378.

HOOFNAGLE, J. H. Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology*, [s. l.], v. 36, n. 5, p. S21-S29, nov. 2002. DOI: 10.1002/hep.1840360704.

HOOTEN, N. N. et al. Metformin-mediated increase in DICER1 regulates microRNA expression and cellular senescence. *Aging Cell*, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 572-581, 2016. DOI: 10.1111/ace.12469.

HÖRAUF, J. A. et al. Limited diagnostic value of miRNAs in early trauma-induced liver injury: only miRNA-122 emerges as a late-phase marker. **Diagnostics**, [s. l.], v. 15, n. 2, art. 179, jan. 2025. DOI: 10.3390/diagnostics15020179.

HOUGHTON, M. Discovery of the hepatitis C virus. **Liver International**, [s. l.], v. 29, n. s1, p. 82-88, 2009.

HSU, S. H. et al. MicroRNA-122 regulates mitochondrial metabolic gene network in hepatocellular carcinoma. **Molecular Systems Biology**, [s. l.], v. 6, n. 1, art. 394, ago. 2010. DOI: 10.1038/msb.2010.58.

HUSSEIN, M.; MOHAMED, D.; AYMAN, M. Non-invasive biomarkers and FIB-4, APRI scoring system to rule out advanced liver injury. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 223-230, 2022. DOI: 10.30574/wjarr.2022.13.3.0198.

JANSEN, C. et al. Circulating miR-122 levels are associated with hepatic necroinflammation and portal hypertension in HIV/HCV coinfection. *PLoS One*, [s. l.], v. 10, n. 2, e0116768, fev. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0116768.

JAYYOSI, Z. et al. Benign elevations in serum aminotransferases and biomarkers of hepatotoxicity in healthy volunteers treated with cholestyramine. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 15, n. 42, p. 15-42, ago. 2014. DOI: 10.1186/2050-6511-15-42.

JIN, Y. Mechanisms of microRNA biogenesis and stability control in plants. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, 2022. *Front. Plant Sci.* 13:844149. doi: 10.3389/fpls.2022.844149

JOHANNES, M. et al. Updated reference limits for liver blood tests with validation against long-term liver-related outcomes. **Liver International**, [s. l.], nov. 2025.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/41255223/>. Acesso em: 17 jan. 2026.

JOLLIFFE, I. T. Principal component analysis. 2. ed. **New York: Springer**, 2002. (Springer Series in Statistics). DOI: 10.1007/b98835.

JONAS, A.; IZAURRALDE, E. Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. **Molecular Cell**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 11-20, 2022. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.10.028.

JOPLING, C. L. et al. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. **Science**, [s. l.], v. 309, n. 5740, p. 1577-1581, 2005. [NOTA: referência duplicada — mantida uma única entrada.].

KARIC, U. et al. FIB-4 and APRI scores for prediction of severe fibrosis in chronic hepatitis C: a developing-country perspective in the DAA era. **Journal of Infection in Developing Countries**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 178-182, 2018. DOI: 10.3855/jidc.10190.

KAUR, Navneet; GARG, Ravinder; TAPASVI, Chaitanya; GOYAL, Gitanjali. Micro RNAs as a potential biomarker for predicting liver fibrosis severity in hepatitis C virus affected patients. **World Journal of Virology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 101976, 25 jun. 2025. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.5501/wjv.v14.i2.101976>. Acesso em: 19 abr. 2026.

KETELAAR, T. et al. Hepatitis C viral replication complex. *Viruses*, [s. l.], v. 13, n. 3, art. 520, 2021. DOI: 10.3390/v13030520.

KHOLEIF, H. et al. Circulating microRNA-122 in Egyptian patients infected with hepatitis C virus. **Clinical Medicine and Diagnostics**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 114-121, 2015. Disponível em: <http://article.sapub.org/10.5923.j.cmd.20150506.02.html>.

KIM, Y., KIM, B., KIM, V.N., Reavaliação dos papéis de DROSHA , Exportina 5 e DICER na biogênese de microRNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 113 (13) E1881-E1889, <https://doi.org/10.1073/pnas.1602532113> (2016).

KIMURA, S. et al. Diagnostic accuracy of FIB-4 index and FIB-3 index for advanced fibrosis in chronic liver disease and age-specific thresholds. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 23, art. 8473, nov. 2025. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/14/23/8473>. Acesso em: 9 abr. 2026.

KING, A. M. Q. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017. doi: 10.1099/jgv.0.000672.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 18, p. 151-166, 2021.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. D1, p. D155-D162, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1141.

KUMAR, S. et al. Severity of hepatitis C virus (genotype 3) infection positively correlates with circulating microRNA-122 in patients sera. **Disease Markers**, [s. l.], v. 2014, art. 435476, 2014. DOI: 10.1155/2014/435476.

KUO, G. et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*, [s. l.], v. 244, n. 4902, p. 362-364, abr. 1989. DOI: 10.1126/science.2496467.

LAMARRE, D. et al. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. **Nature**, [s. l.], v. 426, n. 6963, p. 186-189, nov. 2003. DOI: 10.1038/nature02099.

LEE, T.-H., MATTA, B., KING, BD, HODGES, MR, TILLMANN, HL, & PATEL, K. (2015). MicroRNA-122 associa-se à apolipoproteína B sérica, mas não a marcadores de fibrose hepática na infecção por CHC genótipo 1. *J Med Virol*, 87 (10), 1722–1726. <https://doi.org/10.1002/jmv.24230>

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

LI, A. et al. HBV triggers APOBEC2 expression through regulation of miR-122 and affects liver cancer cell proliferation. **International Journal of Oncology**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 1137-1148, 2019. DOI: 10.3892/ijo.2019.4870.

LI, Y. et al. MiR-122-5p regulates the mevalonate pathway by targeting HMGCR in non-small cell lung cancer cells. *Pathogens*, [s. l.], 2023. doi: 10.1038/s41419-023-05761-9.

Li S, Yang X, Yang J, Zhen J, Zhang D. Serum microRNA-21 as a potential diagnostic biomarker for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Exp Med*. 2016 Feb;16(1):29-35. doi: 10.1007/s10238-014-0332-3. Epub 2014 Dec 17. PMID: 25516467. LIEBER, C. S. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS) and cytochrome P450 2E1 (CYP2E1). *Alcohol and Alcoholism*, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 379-391, 1994.

LIMA, R. V. C. Papel dos microRNAs (miR-122, miR-29a, miR-21, miR-155 e miR-181a) na expressão fenotípica da doença hepática gordurosa não alcoólica. 2022. Tese (Doutorado em Ciências) — Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

LIU, J. et al. Mechanisms of neuropathogenesis in HIV and HCV. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 643, p. 1-15, 2016. DOI: 10.1016/j.neulet.2016.12.015.

LIU, Y. et al. Liver cirrhosis: molecular mechanisms and therapeutic interventions. *MedComm*, [s. l.], v. 5, n. 10, e721, set. 2024. DOI: 10.1002/mco2.721.

LIU, Y. et al The diagnostic role of miR-122 in drug-induced liver injury: A systematic review and meta-analysis. **Medicine (Baltimore)**. 2018 Dec;97(49):e13478. doi: 10.1097/MD.00000000000013478. PMID: 30544438; PMCID: PMC6310488.

LLEWELLYN, C. et al. Risk stratification after paracetamol overdose using a 3-biomarker panel (K18, miR-122, and GLDH). **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 154-156, mar. 2018.

LOOMBA R, LIANG TJ. Hepatitis B Reactivation Associated With Immune Suppressive and Biological Modifier Therapies: Current Concepts, Management Strategies, and Future Directions. **Gastroenterology**. 2017 May;152(6):1297-1309. doi: 10.1053/j.gastro.2017.02.009. Epub 2017 Feb 20. PMID: 28219691; PMCID: PMC5501983.

LÓPEZ-RIERA, M. et al. Non-invasive prediction of NAFLD severity: a comprehensive, independent validation of previously postulated serum microRNA biomarkers. **Scientific Reports**, v. 8, n. 10606, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-28854-4.

LOPEZ-RUIZ, L. et al. miR-122 — a key factor and therapeutic target in liver disease. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 706-713, 2015.

LOUREIRO, D. et al. miRNAs as potential biomarkers for viral hepatitis B and C. **Viruses**, [s. l.], v. 12, n. 12, art. 1440, dez. 2020. DOI: 10.3390/v12121440.

MA, Z. H. et al. Detection of miR-122 by fluorescence real-time PCR in blood from patients with chronic hepatitis B and C infections. **Cytokine**, [s. l.], v. 131, art. 155076, jul. 2020. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155076.

MAAN, R.; DE KNEGT, R. J.; VELDT, B. J. Management of thrombocytopenia in chronic liver disease: focus on pharmacotherapeutic strategies. **Drugs**, [s. l.], v. 75, n. 17, p. 1981-1992, 2015.

MAGRI, M. C. et al. Prevalence of hepatitis C virus in Brazil's inmate population: a systematic review. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 49, art. 36, 2015. DOI: 10.1590/S0034-8910.2015049005886.

MALIK, A. et al. Circulating microRNA-122 as a potential biomarker for hepatocellular carcinoma induced by hepatitis C virus. **International Journal of Cancer Management**, [s. l.], v. 15, n. 11, 2022. DOI: 10.5812/ijcm-131221.

MALIK, A. et al. Severity of hepatitis C virus (genotype-3) infection positively correlates with circulating microRNA-122 in patients sera. **Annals of Hepatology**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 549-556, 2014.

MANZOOR, S. et al. Serum microRNAs as predictors for HCV progression and response to treatment in Pakistani patients. **Genes**, [s. l.], fev. 2023. doi: 10.3390/genes14020441.

MARTINELLO, M. et al. Hepatitis C. **The Lancet**, [s. l.], v. 402, n. 10845, p. 36-96, 2023.

McDERMOTT, A. M.; KERIN, M. J.; MILLER, N. Identification and validation of miRNAs as endogenous controls for RQ-PCR in blood specimens for breast cancer

studies. **PLoS One**, [s. l.], v. 8, n. 12, e83718, dez. 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0083718.

MCKNIGHT, M. L., & LEMON, S. M. (2018). Comparative genomics of hepatitis A virus, hepatitis C virus, and hepatitis E virus provides insights into the evolutionary history of Hepatovirus species

MEDINA, M. C. et al. Avaliação da utilização do teste immunoblot recombinante (RIBA) no diagnóstico da infecção pelo vírus da hepatite C (VHC) em doadores de sangue com anti-VHC reagente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 235-239, 1995.

MITCHELL, O. et al. The pathophysiology of thrombocytopenia in chronic liver disease. **Hepatic Medicine: Evidence and Research**, v. 8, p. 39–50, 2016. DOI: 10.2147/HMER.S74612. PMID: 27186144.

MOAYEDI, J. et al. Evaluation of miR-122 serum level and IFN- λ 3 genotypes in patients with chronic HCV and HCV-infected liver transplant candidate. **MicroRNA**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 58-65, 2021. DOI: 10.2174/2211536609666201217101414.

MOKHTARI ARDEKANI, A. et al. miR-122 dysregulation is associated with type 2 diabetes mellitus-induced dyslipidemia and hyperglycemia independently of its rs17669 variant. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 4217-4224, maio 2023. DOI: 10.1007/s11033-023-08344-1.

MUAWIA, S.; EL-SAID, H.; ELFERT, A. Diagnostic value of fibronectin and miR-122 in Egyptian patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis. [S. l.], v. 2, n. 1, p. 111-127, 2016. DOI: 10.21608/RJAB.2016.59642.

MURAKAMI, Y. et al. Comprehensive analysis of transcriptome and metabolome analysis in intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, art. 16294, 2015. DOI: 10.1038/srep16294.

NAINAM, A. et al. Nucleic acid testing for hepatitis C virus: an overview. **Journal of Clinical Virology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 134-140, 2006.

NEUMANN, A. U. et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon- α therapy. **Science**, [s. l.], v. 282, n. 5386, p. 103-107, out. 1998. DOI: 10.1126/science.282.5386.103.

NIEPMANN, M. Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1537-1542, 2009.

NUNES, A. K. S. Avaliação de metodologias moleculares para detecção e quantificação da carga viral do HCV. 2022. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022. Disponível em: <https://www.teses.usp.br>. Acesso em: 17 jan. 2026.

O'BRIEN, J. et al. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 9, art. 402, ago. 2018. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.

OMRAN, A. A. S. et al. MicroRNA-122 as a novel non-invasive marker of liver fibrosis in hepatitis C virus patients. **Clinical Laboratory**, [s. l.], v. 62, n. 7, p. 1329-1337, 2016. DOI: 10.7754/CLIN.LAB.2015.151141.

ONO, C. et al. Various miRNAs compensate the role of miR-122 on HCV replication. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. e1008308, 23 jun. 2020. DOI 10.1371/journal.ppat.1008308

OPENAI. ChatGPT [inteligência artificial]. Versão GPT-4. San Francisco: OpenAI, 2025. Disponível em: <https://chat.openai.com>. Acesso em: mar. 2026.

ORANG, A. V. et al. MicroRNAs: genomics, biogenesis, and mechanism of action. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 1435-1463, 2014. DOI: 10.3390/jcm3041435.

OSTROWSKI, M. et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 19-30, 2010.

OUZAN, D. et al. Using the FIB-4, automatically calculated, followed by the ELF test in second line to screen primary care patients for liver disease. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, art. 12198, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-62932-4.

PACHECO, S. D. B.; LEMOS, J. A. R.; OLIVEIRA FILHO, A. B. Infecção pelo HCV e uso de drogas não-injetáveis no Pará, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA DE FAMÍLIA E COMUNIDADE, 12., 2013, Belém. Anais [...].Belém: SBMFC, 2013.

PALLAORO, M. et al. Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursor protein. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 75, n. 20, p. 9939-9946, out. 2001.

PANIGRAHI, M.; PALMER, M. A.; WILSON, J. A. MicroRNA-122 regulation of HCV infections: insights from studies of miR-122-independent replication. **Pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 9, art. 1005, 2022. DOI: 10.3390/pathogens11091005.

PAPADOPOULOS, N. et al. Liver fibrosis staging with combination of APRI and FIB-4 scoring systems in chronic hepatitis C as an alternative to transient elastography. **Annals of Gastroenterology**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 498-503, set./out. 2019. DOI: 10.20524/aog.2019.0406.

PARIKH, N. D.; MEHTA, M.; TAPPER, E. B. FIB-4 and APRI for cirrhosis detection in a privately insured national cohort. **JHEP Reports**, [s. l.], v. 6, 2023. DOI: 10.1016/j.jhepr.2023.100925.

PASQUALOTTO, A. Expressão de MIR-122, MIR-155 e MIR-217 em um modelo de exposição crônica ao etanol em zebrafish adulto. 2019. Dissertação (Mestrado) — [UFRGS, 2019].

PEDERSEN, I. M. et al. Interferon modulates microRNA-122, which targets the 5' untranslated region of the hepatitis C virus genome. **Nature**, [s. l.], v. 449, n. 7165, p. 1205-1209, 2007.

PELTIER, H. J.; LATHAM, G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 844-852, 2008.

PENNISI G, *et al.* Noninvasive assessment of liver disease severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and type 2 diabetes. **Hepatology**. 2023 Jul 1;78(1):195-211. doi: 10.1097/HEP.0000000000000351. Epub 2023 Mar 17. PMID: 36924031.

PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of microRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1-9, 2016.

PERES, F. Effect sizes for nonparametric tests. **Biochemia Medica**, [s. l.], v. 36, n. 1, art. 010101, fev. 2026. DOI: 10.11613/BM.2026.010101.

PETTA, S. *et al.* Noninvasive tests for liver fibrosis in 2024: are there different scales for different diseases? **Gastroenterology Report, Oxford Academic**, dez. 2023. DOI: 10.1093/gastro/goae024

PILERI, P. *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. **Science**, [s. l.], v. 282, n. 5390, p. 938-941, out. 1998.

PISETSKY, D. S. *et al.* The effects of heparins on the liver: application of mechanistic biomarkers to understand heparin-induced liver injury. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [s. l.], v. 92, n. 4, p. 509-516, 2012. DOI: 10.1038/clpt.2012.40.

PLATT, L. *et al.* Prevalence and incidence of hepatitis C virus infection in men who have sex with men: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 5, n. 11, p. 1129–1142, 2020. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30303-4.

POSIT TEAM. RStudio: integrated development environment for R. Boston: Posit Software, 2024. Disponível em: <http://www.posit.co/>.

QUENTAL, C. *et al.* Medicamentos genéricos no Brasil: impactos das políticas públicas sobre a indústria nacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 619–628, abr. 2008

QIAGEN. miRCURY LNA miRNA PCR handbook. Hilden: QIAGEN, 2019. Disponível em: <https://www.qiagen.com>. Acesso em: mar. 2026.

QIN, G. *et al.* Plasma microRNA: a novel non-invasive biomarker for HBV-associated liver fibrosis staging. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 17, n. 3, p. 1919–1929, 2019. DOI: 10.3892/etm.2019.7175. PMCID: PMC6364194

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAGAZZO, T. G. Comparação entre a acurácia de métodos não invasivos de fibrose e a biópsia hepática em pacientes com hepatite C crônica. 2016. Dissertação (Mestrado) — Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5168/tde-10032017-082215/>. Acesso em: 27 mar. 2026.

RANSOHOFF, D. F.; FEINSTEIN, A. R. Problems of spectrum and bias in evaluating the efficacy of diagnostic tests. **New England Journal of Medicine**, v. 299, n. 17, p. 926–930, 1978. DOI: 10.1056/NEJM197810262991705.

RAPARELLI, V. et al. Thrombocytopenia and hemostatic changes in acute and chronic liver disease: pathophysiology, clinical and laboratory features, and management. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 7, p. 1530, 2021. DOI: 10.3390/jcm10071530. PMID: 33917278.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, [s. l.], v. 403, n. 6772, p. 901-906, 2000. DOI: 10.1038/35002607.

RINGNÉR, M. What is principal component analysis? **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 303-304, 2008. DOI: 10.1038/nbt0308-303.

RIVA, L. et al. Comparative analysis of hepatitis C virus NS5A dynamics and localization in assembly-deficient mutants. *Pathogens*, [s. l.], v. 10, n. 2, art. 172, 2021. DOI: 10.3390/pathogens10020172.

ROBIN, X. et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 12, art. 77, 2011.

RODERBURG, Christoph *et al.* Os níveis séricos elevados de miR-122 são um marcador independente de lesão hepática em doenças inflamatórias. **Liver International**, v. 35, n. 4, p. 1172-1184, 2015. Disponível em: <[nih.gov](https://www.nih.gov)>. Acesso em: 15 mai. 2026

RODRIGUES, P. M. et al. miR-122 protects mice and human hepatocytes from acetaminophen toxicity by regulating cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2 and family 2 subfamily E member 1 expression. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 187, n. 12, p. 2758-2774, dez. 2017.

RODRIGUES, R. R. et al. O impacto dos novos antivirais de ação direta na hepatite C no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 51, n. 45, p. 1-10, 2017.

ROINGEARD, P.; DEPLA, M. The birth and life of lipid droplets: learning from the hepatitis C virus. **Biology of the Cell**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 129-140, 2012.

ROSENBERG, W. M. et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 127, n. 6, p. 1704-1713, 2004.

ROTLLAN, N.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. MicroRNA regulation of cholesterol metabolism. *Cholesterol*, [s. l.], v. 2012, art. 847849, 2012. DOI: 10.1155/2012/847849.

ROUMELIOTIS, S. et al. **ROC curve analysis: a useful statistic multi-tool in the research of nephrology**. *International Urology and Nephrology* / PMC, 2024. PMID: PMC11266376.

RUPRECHT, J. et al. MicroRNA-122 regulation of HCV infections. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 17, art. 2677, 2022.

SALA L, CHANDRASEKHAR S, VIDIGAL JA. AGO unchained: Canonical and non-canonical roles of Argonaute proteins in mammals. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2020 Jan 1;25(1):1-42. doi: 10.2741/4793. PMID: 31585876; PMCID: PMC6827344.

SAKAI, A. et al. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel and is essential for the production of infectious virus particles in cell culture. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 556-563, jan. 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012.

SANTOSI, B. D. et al. Caracterização clínica-epidemiológica de pacientes com cirrose hepática atendidos em um serviço de referência na Amazônia. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [s. l.], v. 24, n. 9, e17480, 2024. DOI: 10.25248/reas.e17480.2024.

SANTOS, Enock Barroso dos. Análise espacial das taxas de incidência de hepatites virais no Amazonas, Brasil, período de 2008 a 2018. *In: Hepatite C - Avanços Recentes*. [Londres]: IntechOpen, 2020. Disponível em: doi.org. Acesso em: 12 abr. 2026

STARKEY LPJ, *at al*. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. **Hepatology**. 2011 Nov;54(5):1767-76. doi: 10.1002/hep.24538. PMID: 22045675.

SCARSELLI, E. et al. The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 21, n. 19, p. 5017-5025, out. 2002.

STAREGA-ROSLAN,J., GALKA-MARCINIAK,P., WLODZIMIERZ J. KRZYZOSIAK, Sequência de nucleotídeos do precursor de miRNA contribui para a seleção do sítio de clivagem pela Dicer, **Nucleic Acids Research** , Volume 43, Edição 22, 15 de dezembro de 2015, Páginas 10939–10951, <https://doi.org/10.1093/nar/gkv968>

SCHIAVON LDE L, NARCISO-SCHIAVON JL, DE CARVALHO-FILHO RJ. Non-invasive diagnosis of liver fibrosis in chronic hepatitis C. **World J Gastroenterol**. 2014 Mar 21;20(11):2854-66. doi: 10.3748/wjg.v20.i11.2854. PMID: 24659877; PMCID: PMC3961992.

SCHMITT, A. M.; CHANG, H. Y. Long noncoding RNAs in cancer pathways. *Cancer Cell*, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 452-463, abr. 2016. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.03.010.

SCHUCH-GOI, S. B. et al. Hepatitis C: clinical and biological features related to different forms of cocaine use. **Trends in Psychiatry and Psychotherapy**, [s. l.], v. 39, n. 4, p. 284-293, 2017. DOI: 10.1590/2237-6089-2016-0076.

SCISPACE. **SciSpace: AI research agent**. [S. l.]: Typeset, 2024. Disponível em: <https://scispace.com>. Acesso em: mar. 2026.

SCOTT, K. M. et al. miR-122 and the WNT/ β -catenin pathway inhibit the effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on articular chondrocytes in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 123, n. 6, p. 1053-1063, 2022. DOI: 10.1002/jcb.30244.

Seyhan AA. Trials and Tribulations of MicroRNA Therapeutics. **Int J Mol Sci**. 2024 Jan 25;25(3):1469. doi: 10.3390/ijms25031469. PMID: 38338746; PMCID: PMC10855871

SENGUPTA, D. et al. Regulation of hepatic glutamine metabolism by miR-122. **Molecular Metabolism**, [s. l.], v. 34, p. 174-186, 2020. DOI: 10.1016/j.molmet.2020.01.003.

SHAKER, O. G.; SENOUSY, M. A. Serum microRNAs as predictors for liver fibrosis staging in hepatitis C virus-associated chronic liver disease patients. **Journal of Viral Hepatitis**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 636-644, 2017. DOI: 10.1111/jvh.12696.

SHARPE, L. J.; BROWN, A. J. Navigating the shallows and rapids of cholesterol synthesis. **Trends in Biochemical Sciences**, [s. l.], v. 40, n. 11, p. 660-672, 2015.

SHIMAKAMI, T. et al. Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2–miR-122 complex. **PNAS**, [s. l.], v. 109, n. 3, p. 941-946, 2012.

SILVA, A. P. et al. Infecção crônica pelo vírus da hepatite C: revisão sistemática sobre diagnóstico e tratamento com antivirais de ação direta. **Lumen et Virtus**, São José dos Pinhais, v. 16, n. 44, p. 311-320, jan. 2025.

SILVA, C. A. M.; SIMON, C. S. Adequação amostral em estudos epidemiológicos. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 175-182, 2005.

SILVA, D.; SIMON, F. Abordagem quantitativa de análise de dados de pesquisa: construção e validação de escala de atitude. **Cadernos CERU**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 11-27, jan./dez. 2005.

SIMONETTA, F. Hepatitis C virus: a review of the new direct-acting antivirals. **Revue Médicale Suisse**, [s. l.], v. 10, n. 433, p. 1195-1199, 2014.

SINGHAL, R. et al. Benign elevations of serum aminotransferases and biomarkers of hepatotoxicity in healthy volunteers treated with cholestyramine. **BMC Pharmacology and Toxicology**, [s. l.], v. 15, art. 42, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Consenso sobre hepatite C crônica. São Paulo: SBH, 2014. Disponível em:

<https://sbhepatologia.org.br/pdf/consenso-sobre-hepatite-cronica.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2026.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HEPATOLOGIA. Elastografia hepática. São Paulo: SBH, 2020. Disponível em: https://sbhepatologia.org.br/wp-content/uploads/2020/07/livro_elastografia_hepatica.pdf. Acesso em: 17 jan. 2026.

SOUZA, F.C. de et al. Aspectos clínicos da hepatite C crônica: experiência do Ambulatório de Hepatites Virais/Instituto ALFA de Gastroenterologia/Hospital das Clínicas da UFMG. **Rev. méd. Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 14, n. 3, p. 136-141, jul.-set. 2004.

SOUZA, M. B. V. et al. Carcinoma hepatocelular. **Revista de Medicina**, [s. l.], v. 104, n. 4 esp., e238591, 2025. DOI: 10.11606/issn.1679-9836.v104i4esp.e-238591.

STATISTICS KINGDOM. Statistics Kingdom: online statistics calculator. [S. l.]: **Statistics Kingdom**, 2024. Disponível em: <https://www.statskingdom.com>. Acesso em: mar. 2025.

STERLING, R. K. et al. Development of a simple noninvasive index to predict significant fibrosis in patients with HIV/HCV coinfection. **Hepatology**, v. 43, n. 6, p. 1317-1325, 2006. DOI: 10.1002/hep.21178.

STRAZZA, L. et al. Estudo de comportamento associado à infecção pelo HIV e HCV em detentas de um presídio de São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 197-205, 2007. DOI: 10.1590/S0102-311X2007000100021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diretrizes para o rastreio, cuidados e tratamento de pessoas com infecção por hepatite C. Genebra: OMS, 2014

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Combate às hepatites B e C para alcançar a eliminação até 2030. Genebra: OMS, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Relatório de progresso global sobre HIV, hepatite viral e infecções sexualmente transmissíveis, 2021. Genebra: OMS, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240027077>. Acesso em: 17 jan. 2026.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OMS alerta para infecções por hepatite viral que causam 3.500 mortes por dia. Genebra: OMS, abril de 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/09-04-2024-who-sounds-alarm-on-viral-hepatitis-infections-claiming-3500-lives-each-day>. Acesso em: 17 de janeiro de 2026.

TAGUCHI, Y. H.; MOTOMU, Y. Principal component analysis-based feature extraction approach to identify circulating microRNA biomarkers. **PLoS One**, [s. l.], v. 8, n. 6, e66714, 2013.

TAPPER, E. B. et al. The effect of hepatic steatosis on the performance of transient elastography in patients with chronic hepatitis C. **Journal of Clinical Gastroenterology**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 608-613, 2015.

TAVABIE, O. D. et al. MicroRNA associated with hepatocyte injury and systemic inflammation may predict adverse outcomes in cirrhotic patients. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 14, n. 1, art. 23831, out. 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-72416-w.

TAYLOR, N. J. et al. Severity of circulating neutrophil dysfunction in patients with cirrhosis is associated with 90-day and 1-year mortality. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 705-715, 2014.

TESCHKE, R. Alcoholic liver disease: alcohol metabolism, cascade of molecular mechanisms, and potential inhibitors. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. 385-403, 2018.

TOBARUELA-RESOLA, A. L. et al. The use of circulating miRNAs for the diagnosis, prognosis, and personalized treatment of MASLD. **Journal of Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 81, n. 3, p. 589-609, ago. 2025. DOI: 10.1007/s13105-025-01110-w.

TOMCZAK, M.; TOMCZAK, E. The need to report effect size estimates revisited: an overview of some recommended measures of effect size. **Trends in Sport Sciences**, [s. l.], v. 1, n. 21, p. 19-25, 2014

TORO-RESTREPO, M. B. Fisiopatologia hepática. In: **Fundamentos da bioquímica clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TREBICKA, J. et al. Hepatic and serum levels of miR-122 after chronic HCV-induced fibrosis. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 234-239, 2013. DOI: 10.1016/j.jhep.2012.10.015.

ULLAH, A. et al. Circulating microRNA-122 in HCV cirrhotic patients with high frequency of genotype 3. **PLoS One**, [s. l.], v. 17, n. 5, e0268526, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0268526.

VALLET-PICHARD, A. et al. FIB-4: an inexpensive and accurate marker of fibrosis in HCV infection — comparison with liver biopsy and fibrotest. **Hepatology**, v. 46, n. 1, p. 32–36, 2007. DOI: 10.1002/hep.21669.

VAROQUAUX, G.; COLLIOT, O. Avaliando modelos de aprendizado de máquina e seu valor diagnóstico. In: COLLIOT, O. (ed.). *Machine learning for brain disorders*. New York: Humana, 2023. cap. 20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK597473/>. DOI: 10.1007/978-1-0716-3195-9_20.

VERLINDEN, W. et al. Validation of APRI and FIB-4 score in an Antwerp cohort of chronic hepatitis C patients. *Acta Gastroenterologica Belgica*, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 373-380, 2015.

VERNEUIL, L. et al. Prevalence and risk factors of the whole spectrum of sexually transmitted diseases in male incoming prisoners in France. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 409-413, 2009. DOI: 10.1007/s10096-008-0642-z.

VIGANÒ, M. et al. Accuracy of FIB-4 to detect elevated liver stiffness measurements in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a cross-sectional study in referral centers. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 20, art. 12489, 2022. DOI: 10.3390/ijms232012489.

VILLAR LM, CALDAS GC, SCALIONI LP, et al. (2017) — *"High prevalence of insulin resistance among Brazilian chronic hepatitis C patients"* — **Archives of Endocrinology and Metabolism**, 61(6):628–632. DOI: 10.1590/2359-3997000000315. PMID: 29412389. PMC10522051.

VOGT, J. et al. Variance component analysis of circulating miR-122 in serum from healthy human volunteers. **PLoS One**, [s. l.], v. 14, n. 7, e0220406, jul. 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0220406.

WAI, C.-T. et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2003 Aug;38(2):518-26. doi: 10.1053/jhep.2003.50346. PMID: 12883497.

WAIDMANN, Marcus et al. Serum microRNA-122 predicts survival in patients with liver cirrhosis. **Journal of Hepatology**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 1323-1329, June 2012.

WANG, C. Y.; LIU, P. Y.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 37-44, 2008.

WANG, G.; ZHAO, Y.; ZHENG, Y. miR-122/Wnt/ β -catenin regulatory circuitry sustains glioma progression. **Tumour Biology**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 8565-8572, 2014.

WANG, X. et al. MicroRNA epigenetic alterations: predicting biomarkers and therapeutic targets. **Clinical Genetics**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 320-327, 2008.

WANG Y, TANG N, HUI T, WANG S, ZENG X, LI H, Ma J. Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR analysis of plasma microRNAs levels in rats with acetaminophen-induced **hepatotoxicity**. **J Appl Toxicol**. 2013 Nov;33(11):1330-6. doi: 10.1002/jat.2864. Epub 2013 Apr 4. PMID: 23558424.

WANG, Y. et al. MiR-122 targets VEGFC in bladder cancer to inhibit tumor growth and angiogenesis. **American Journal of Translational Research**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 3056-3066, 2016.

WEI, S. et al. HNF-4 α regulated miR-122 contributes to development of gluconeogenesis and lipid metabolism disorders in type 2 diabetic mice and in palmitate-treated HepG2 cells. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 791, p. 254-263, 2016.

WESTBROOK, R. H.; DUSHEIKO, G. Natural history of hepatitis C. **Journal of Hepatology**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. S58-S68, nov. 2014. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.07.012.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, [s. l.], v. 75, n. 5, p. 855-862, 1993. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90530-4.

WILLEIT, P. et al. Circulating microRNA-122 is associated with the risk of new-onset metabolic syndrome and type 2 diabetes. **Diabetes**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 347-357, fev. 2017. DOI: 10.2337/db16-0731.

WILSON, R. C., et al. (2015). Dicer–TRBP complex formation ensures accurate mammalian microRNA biogenesis. **Molecular Cell**, 57(3), 397-407.

WÖLK, B. et al. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 74, n. 5, p. 2293-2304, mar. 2000. DOI: 10.1128/jvi.74.5.2293-2304.2000.

WU, J. et al. Molecular targets and signaling pathways of microRNA-122 in liver diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 14, art. 7700, 2022.

XAVIER, D. J. et al. Evolução do tratamento da hepatite C no SUS: dos antivirais de ação direta à simplificação. **Journal of Health and Biological Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1-8, 2023.

YAMAURA, Y. et al. Serum microRNA profiles in patients with chronic hepatitis B, chronic hepatitis C, primary biliary cirrhosis, autoimmune hepatitis, nonalcoholic steatohepatitis, or drug-induced liver injury. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 18, p. 1034-1039, 2017. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2017.08.010.

YEN, Y. H. et al. APRI and FIB-4 in the evaluation of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients stratified by AST level. **PLoS One**, [s. l.], v. 13, n. 6, e0199760, 2018. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0199760.

YOON JH, LEE JM, BAEK JH, SHIN CI, KIEFER B, HAN JK, et al. Evaluation of hepatic fibrosis using intravoxel incoherent motion in diffusionweighted liver MRI. *J Comput Assist Tomogr*. 2014;38:110-6

YU, J.; WANG, F. MicroRNAs: discovery, breakthrough, and innovation. **Blood Science**, [s. l.], v. 6, n. 4, e00210, nov. 2024. DOI: 10.1097/BS9.0000000000000210.

ZHANG, Y. et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. **Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 56, n. 12, p. 1830-1838, 2010. DOI: 10.1373/clinchem.2010.147850.

ZHANG, Y. et al. Circulating microRNAs as biomarkers for liver injury and infection. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 24, p. 125-136, 2019.

ZHANG, Z. et al. Knockdown of microRNA-122 protects H9c2 cardiomyocytes from hypoxia-induced apoptosis and promotes autophagy. **Medical Science Monitor**, [s. l.], v. 23, p. 4284-4290, 2017.

ZHANG J, et al. Role of miRNA-122 in cancer (Review). *Int J Oncol*. 2024 Sep;65(3):83. doi: 10.3892/ijo.2024.5671. Epub 2024 Jul 19. PMID: 39027994; PMCID: PMC11299766.

ZHAO, H. et al. Plasma microRNA signature predicting weight gain among Mexican-American women. **Obesity**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 958-964, 2017.

ZHOU, X. et al. Diagnostic value of circulating miR-122 for hepatitis B virus and/or hepatitis C virus-associated chronic viral hepatitis. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 39, n. 9, BSR20190900, set. 2019. DOI: 10.1042/BSR20190900.

APÊNDICE

APÊNDICE A

RESUMO MIQE – RT-QPCR PARA MIR (*Handbook*-QIAGEN)

Item MIQE	Descrição
Tipo de amostra	plasma humano
Método de extração de RNA	miRNeasy Plasma Advanced Kit (QIAGEN)
Controle de contaminação	Proced. realizados em tubos RNase-free
Quantificação/qual. do RNA	Eletroforese autom. utiliz. High Sensitivity RNA ScreenTape®
Síntese de cDNA (RT)	miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN)
Equip. contr. de qual. do RNA	TapeStation 4200 (Agilent Technologies)
Volume de reação de RT	Conforme protocolo do fabricante
Diluição do cDNA	Conforme protocolo do fabricante
Química de detecção	SYBR® Green
Kit de amplificação	miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN)
Ensaio de miR analisados	hsa-miR-122 (miR alvo) e hsa-miR-103a-3p (controle endógeno)
Primers/ensaio	Ensaio LNA™ específicos para miR (QIAGEN)
Equipamento de RT	Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
Equipamento de qPCR	StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
Configuração das reações	Amostras analisadas em duplicata
Controles negativos	NTC (No Template Control) em todas as corridas
Curva de dissociação (melting)	Real. ao final de cada corrida p/ confirmação da especificidade
Critério de aceitação técnica	Repetição de amostras c/ variação significativa entre duplicatas
Normalização dos dados	Método ΔC_t e $\Delta\Delta C_t$
Controle endógeno	hsa-miR-103a-3p, validado experimentalmente nas amostras da presente modelo de estudo (CV < 15% em todos os grupos; Kruskal-Wallis p > 0,05)
Análise de dados	Software StepOne™

Fonte: Elaborado pelo autor (2025)

Apêndices

Apêndice C – Participação no congresso XXIV da Semana Brasileira do Aparelho Digestivo

XXIV Semana Brasileira do Aparelho Digestivo
XXIV SBAD
 13 a 15 de Novembro | 2025 | São Paulo | SP

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado

Expressão sérica do microRNA (miR-122) e sua correlação com enzimas hepáticas e estadiamento do grau de fibrose: potencial como biomarcador não invasivo na hepatite C crônica *

dos autores **CARLOS ANDRÉ DE SOUZA ANDRÉ DE SOUZA, LUIZ RIBEIRO, RAFAELE LUIZ SILVESTRE-MANHÃES, FABIO SANTIAGO, EDUARDO NOGUEIRA, MARCIA MARIA AMENDOLA PIRES, CARLOS EDUARDO BRANDÃO-MELLO**, foi apresentado por **CARLOS EDUARDO BRANDÃO-MELLO** na **XXIV SEMANA BRASILEIRA DO APARELHO DIGESTIVO**, realizado no Centro de Convenções - Distrito Anhembi, 13 a 15 de novembro de 2025, na forma de apresentação: **Aprovado para Pôster Eletrônico - exibição.**

São Paulo, 13 a 15 de novembro de 2025

Para verificar a autenticidade deste certificado acesse <https://validacertificados.lweventos.com.br> e use o código: **c1614bfa4d**


Dr. Eduardo Guimarães Hounneux de Moura
 Presidente da SOBED e da XXIV SBAD


Dr. Aureo de Almeida Delgado
 Presidente da FBG


Dr. Paulo Kassab
 Presidente do CBCD

Realização:



Associação Brasileira de Endoscopia Digestiva



Federação Brasileira de Gastroenterologia



Colégio Brasileiro de Coloproctologia

SBAD

Apêndice C – Participação no congresso XXIX Congresso Brasileiro de Hepatologia



Apêndice D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIRIO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO GAFFREE E
GUINLE / HUGG- UNIRIO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: O papel do MicroRNAs (miRNAs) e da microbiota intestinal na infecção pelo HCV e na coinfeção pelos vírus HCV-HBV e HCV-HIV e na resposta ao tratamento das Hepatites virais

Pesquisador: Carlos Eduardo Brandão Mello

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 43185715.4.0000.5258

Instituição Proponente: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

Patrocinador Principal: Hospital Universitário Gaffree e Guinle/HUGG/UNIRIO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.618.903

Apresentação do Projeto:

O papel do MicroRNAs (miRNAs) e da microbiota intestinal na infecção pelo HCV e na coinfeção pelos vírus HCV-HBV e HCV-HIV e na resposta ao tratamento das Hepatites virais.

Trata-se emenda ao projeto original com a adição de que serão analisados a pesquisa do MicroRNA em pacientes infectados pelo HCV coinfectados pelo HCV-HIV e HCV-HBV, assim como o papel da microbiota intestinal nessas populações.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo principal deste estudo é avaliar a resposta virológica sustentada (RVS) ao esquema combinado de Peg-IFN-2a/2b e Ribavirina em pacientes monoinfectados pelo vírus C da hepatite (HCV) do HUGG e sua relação com os miRNAs circulantes no plasma. Como objetivos específicos temos: - avaliar nos pacientes do HUGG a eficácia do tratamento ao tratamento combinado de Peg-IFN-2a/2b e Ribavirina; - sequenciar os miRNAs (miRNoma) circulantes no plasma dos diferentes grupos de paciente e/ou tratamento por Sequenciamento de Nova Geração; correlacionar os miRNAs com a eficácia do tratamento; encontrar algum miRNA que sirva como biomarcador para uma das situações estudadas.

Objetivo Secundário:

O objetivo principal deste estudo é avaliar a resposta virológica sustentada (RVS) ao esquema

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: cephugg@gmail.com

**UNIRIO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO GAFFREE E
GUINLE / HUGG- UNIRIO**



Continuação do Parecer: 3.618.903

combinado de Peg-IFN-2a/2b e Ribavirina em pacientes mono infectados pelo vírus C da hepatite (HCV) do HUGG e sua relação com os miRNAs circulantes no plasma. Como objetivos específicos temos: - avaliar nos pacientes do HUGG a eficácia do tratamento ao tratamento combinado de Peg-IFN-2a/2b e Ribavirina; - sequenciar os miRNAs (miRNoma) circulantes no plasma dos diferentes grupos de paciente e/ou tratamento por Sequenciamento de Nova Geração; correlacionar os miRNAs com a eficácia do tratamento; encontrar algum miRNA que sirva como biomarcador para uma das situações estudadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os possíveis riscos e desconfortos são aqueles relacionados com a retirada rotineira de sangue, tais como, rápida dor ou roxidão no local da picada da agulha. Contudo, haverá um profissional experiente da equipe médica sempre presente para evitar ou minimizar possíveis transtornos decorrentes desse procedimento.

Benefícios: Espera-se ao longo deste subprojeto avaliar a eficácia do tratamento combinado de Peg-IFN-2a/2b e Ribavirina em pacientes do HUGG. Identificar os miRNAs do plasma diferencialmente expressos nos diferentes grupo de paciente e/ou tratamentos utilizados. Espera-se que os dados obtidos possam identificar um miRNA que sirva com biomarcador no plasma para alguma das situações estudadas. Esperamos que esses dados aumentem o conhecimento sobre as razões para as diferentes resposta ao tratamento de hepatites virais e a importância dos miRNAs nesses processos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa em andamento, já avaliada anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados de forma satisfatória.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775		CEP: 22.270-004
Bairro: Tijuca		
UF: RJ	Município: RIO DE JANEIRO	
Telefone: (21)1264-5317	Fax: (21)1264-5177	E-mail: cephugg@gmail.com

Página 02 de 04

**UNIRIO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO GAFFREE E
GUINLE / HUGG- UNIRIO**



Continuação do Parecer: 3.618.903

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1406498_E1.pdf	01/08/2019 12:39:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Microma_e_Microbiota.pdf	01/08/2019 12:33:47	Carlos Eduardo Brandão Mello	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	cv_1985644924072270_curriculo_vitae_2019.pdf	01/08/2019 12:32:51	Carlos Eduardo Brandão Mello	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HCV_HIV_e_MicroRNA_e_Microbiota.pdf	01/08/2019 12:32:30	Carlos Eduardo Brandão Mello	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	15/04/2016 12:54:39	Carlos Eduardo Brandão Mello	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	15/04/2016 12:51:49	Carlos Eduardo Brandão Mello	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	titulo_do_projeto.pdf	15/04/2016 12:38:44	Carlos Eduardo Brandão Mello	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Título do Projeto FAPERJ e TCLE.pdf	19/03/2015 09:53:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Título do Projeto FAPERJ e TCLE.pdf	19/03/2015 09:53:11		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto estudo Faperj 001.jpg	19/03/2015 09:50:48		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 03 de Outubro de 2019

Assinado por:

**Jorge Francisco da Cunha Pinto
(Coordenador(a))**

Endereço: Rua Mariz e Barros nº 775

Bairro: Tijuca

CEP: 22.270-004

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)1264-5317

Fax: (21)1264-5177

E-mail: cephugg@gmail.com

Apêndice E – POP para Extração, RT E RT-qPCR DE miR (PLASMA) - QIAGEN

POP ^{Versão: X | Ano}

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DOS SERVIDORES DO ESTADO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

HUSE-UNIRIO/HU BRASIL

**RT-qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO
DE microRNA (hsa-miR-122)**

Versão: 1 | 2026

SUPERINTENDENTE

JOÃO MARCELO RAMALHO ALVES

GERENTE de ATENÇÃO A SAÚDE

PEDRO EDER PORTARI FILHO

CHEFE DE SETOR/UNIDADE

CRISTIANE GOMES DE CASTRO MOREIRA — UNIDADE DE ANÁLISES CLÍNICAS E ANATOMIA
PATOLÓGICA

ELABORAÇÃO

Carlos André de Souza Pereira Rodrigues — UACA/LAPIA Luiz Claudio Pereira Ribeiro — UACA/LAPIA

ANÁLISE

Luiz Claudio Pereira Ribeiro — UACA/LAPIA

VALIDAÇÃO

Nome do responsável – sigla do setor/unidade

APROVAÇÃO

Nome do responsável – sigla do setor/unidade Nome do responsável – sigla do setor/unidade

Data da emissão: 07/2026

Código do documento: **POP.UACA.LAPIA.001**

1. OBJETIVO

Definir e padronizar as etapas pré-analíticas, de extração de RNA total contendo microRNAs, quantificação/qualificação, transcrição reversa (RT) e amplificação por PCR em tempo real (RT-qPCR) para quantificação relativa de hsa-miR-122 em amostras de soro/plasma humano, utilizando hsa-miR-103-3p como controle endógeno, assegurando qualidade, rastreabilidade, reprodutibilidade e biossegurança das análises.

2. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

2.1. FUNDAMENTO DO MÉTODO

O procedimento compreende quatro fases: (i) lise e isolamento de RNA total contendo microRNAs a partir de soro/plasma; (ii) quantificação e qualificação do RNA; (iii) síntese de cDNA por transcrição reversa específica para miRNA; e (iv) detecção por RT-qPCR com química SYBR® Green, com confirmação de especificidade por curva de dissociação (melting). A expressão do miRNA-alvo é normalizada pelo controle endógeno (hsa-miR-103-3p) e quantificada pelos métodos ΔCt e $\Delta\Delta Ct$.

2.2. BIOSSEGURANÇA

Todas as amostras biológicas devem ser consideradas potencialmente infectantes. Manipular preferencialmente em cabine de segurança biológica Classe II e trabalhar em área dedicada a pré-PCR para evitar contaminação cruzada. Durante a execução do procedimento é obrigatório o uso de:

Jaleco de mangas longas;

Luvas nitrílicas descartáveis;

Óculos de proteção quando houver risco de respingos;

Máscara cirúrgica ou respiratória, conforme avaliação de risco.

Descontaminantes de bancada e materiais reutilizáveis: hipoclorito de sódio 0,5–1% (v/v), seguido de etanol 70% quando compatível.

2.3. MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

2.3.1. EQUIPAMENTOS

Cabine de segurança biológica Classe II (manipulação de material biológico);

Centrífuga refrigerada capaz de atingir $12.000 \times g$;

Vórtex;

Micropipetas (0,5–10 μL ; 10–100 μL ; 100–1000 μL) e ponteiras com filtro;

Termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) — etapa de RT;

Real-Time PCR System 7500 / 7500 Fast (Applied Biosystems) — etapa de qPCR e melting;

Fluorômetro Qubit™ (Qubit 3/4/Flex) — quantificação fluorimétrica (Qubit™ microRNA Assay);

Espectrofotômetro DeNovix DS-11 / NanoDrop — quantificação por absorbância (opcional);

Agilent TapeStation 4200 — eletroforese microfluídica (High Sensitivity RNA / Small RNA ScreenTape®).

2.3.2. AMOSTRAS

Tipo: soro e/ou plasma humano (material potencialmente infectante);

Volume mínimo recomendado para extração: 200 µL por amostra;

Identificação: código único e rastreável (sem identificação nominal em bancada);

Armazenamento: conforme item 2.4 (pré-analítica).

2.3.3. REAGENTES E KITS (PREFERENCIALMENTE QIAGEN)

miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN) — extração de RNA total contendo miRNA;

QIAzol® Lysis Reagent (QIAGEN) e auxiliares grau molecular (ex.: clorofórmio, etanol), quando aplicável ao fluxo descrito;

miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN) — síntese de cDNA;

miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN) — amplificação por qPCR;

Ensaio/primers LNA™ específicos (QIAGEN) para hsa-miR-122 (alvo) e hsa-miR-103-3p (controle endógeno);

Água RNase-free (QIAGEN ou grau molecular);

Controles: NTC (No Template Control) em todas as corridas; controles internos adicionais conforme planejamento do estudo.

Observação: a quantificação por Qubit™ (item 2.6.1) utiliza reagentes do fabricante do sistema Qubit™, não QIAGEN.

2.3.4. MATERIAIS CONSUMÍVEIS E EPI

Tubos RNase-free (1,5 mL e 2,0 mL) e tubos 0,2 mL / placas de 96 poços compatíveis;

Colunas de sílica MinElute (fornecidas no kit) e coletores;

Filmes/selos ópticos para placa de qPCR;

Luvas nitrílicas, jaleco, óculos de proteção e máscara (conforme avaliação de risco);

Descontaminantes: hipoclorito de sódio 0,5–1% (v/v) e etanol 70%.

2.4. RECEBIMENTO E TRIAGEM DAS AMOSTRAS (PRÉ-ANALÍTICA)

Receber amostras de soro/plasma identificadas e registrar em planilha/livro de controle (ID, data/hora, condição da amostra, operador);

Inspecionar integridade: hemólise intensa, lipemia extrema ou volume insuficiente devem ser registrados como não conformidade (avaliar impacto);

Aliquotar, preferencialmente, em tubos RNase-free, minimizando ciclos de congelamento/descongelamento;

Armazenar a -80°C até o processamento. Para processamento no mesmo dia, manter a $2-8^{\circ}\text{C}$ e evitar permanência prolongada em temperatura ambiente;

Antes da extração, descongelar em gelo/ 4°C e homogeneizar suavemente; centrifugar brevemente (ex.: $2.000-3.000 \times g$, 5 min) para remover partículas, se necessário.

2.5. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL CONTENDO MICRORNA

Executar todas as etapas com técnica RNase-free. Utilizar EPI e trabalhar em área dedicada a pré-PCR para evitar contaminação cruzada. O fluxo descrito emprega QIAzol® + coluna de sílica.

Quadro 1 — Fluxo de extração de RNA/miRNA a partir de soro/plasma

Lise da amostra	Adicionar 1,0 mL de QIAzol® + 200 µL de soro/plasma em tubo RNase-free.	Vórtex 10–15 s; incubar 5 min à temperatura ambiente.	Lise e dissociação de complexos proteína–RNA.
Separação de fases	Adicionar 200 µL de clorofórmio, homogeneizar e incubar.	Incubar 2 min; centrifugar $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C .	Separar fase aquosa, interfase e fase orgânica.
Recuperação da fase aquosa	Transferir fase aquosa (~600 µL) para novo tubo RNase-free e adicionar 1,5 volume de etanol 100%.	Misturar por inversão manual.	Ajustar condições para ligação do RNA à sílica.
Ligação à coluna	Aplicar a mistura na coluna de sílica MinElute.	Centrifugar conforme protocolo do fabricante.	Adsorção do RNA à membrana de sílica.
Lavagens	Lavar com 700 µL de Buffer RWT, 500 µL de Buffer RPE e 500 µL de etanol 80%.	Centrifugar após cada lavagem.	Remover contaminantes e sais residuais.
Secagem da coluna	Realizar centrifugação adicional (spin seco).	Velocidade máxima.	Remover resíduos de etanol.
Eluição do miRNA	Transferir a coluna para tubo limpo e adicionar 14 µL de água RNase-free; centrifugar.	1 min, velocidade máxima.	Recuperar miRNA purificado.
Armazenamento	Armazenar o eluato contendo RNA total/miRNA.	-80°C .	Preservar integridade do RNA.

Fonte: adaptado de protocolos QIAGEN (miRNeasy/QIAzol®).

2.6. QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA

2.6.1. QUANTIFICAÇÃO FLUORIMÉTRICA (QUBIT™ MICRORNA ASSAY)

Recomendada quando se deseja maior seletividade para pequenos RNAs e menor interferência de contaminantes. Utilizar kit de quantificação de microRNA compatível com Qubit™ e seguir as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

Preparação: conectar o cabo de força (liga automaticamente; em modo sleep, tocar na tela); garantir reagentes e amostras em temperatura ambiente; usar apenas tubos de PCR transparentes de 0,5 mL (parede fina).

Solução de trabalho (working solution): diluir o reagente microRNA no tampão microRNA na proporção 1:200 (exemplo para 5 tubos: 995 µL de tampão + 5 µL de reagente); preparar em tubo limpo e proteger da luz (reagente fotossensível).

Tabela 1 — Preparo de padrões e amostras (Qubit™ microRNA Assay)

Solução de trabalho	190 µL	180–199 µL
Padrão (standard)	10 µL	—
Amostra de RNA	—	1–20 µL
Volume final	200 µL	200 µL
Incubação	2 min à temp. ambiente	2 min à temp. ambiente

Vórtex 2–3 s; repouso de 2 min antes da leitura. Fonte: Thermo Fisher Scientific (Qubit™ microRNA Assay).

Execução: na tela inicial, selecionar RNA → microRNA; calibrar lendo Standard #1 e Standard #2 (Read standard); em Run samples, informar o volume pipetado (1–20 µL) e a unidade (ng/µL); inserir a amostra e pressionar Read tube.

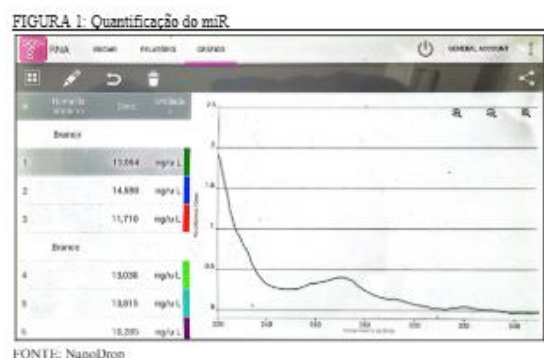
2.6.2. ESPECTROFOTOMETRIA (DENOVI DS-11 / NANODROP) — OPCIONAL

Preparação: ligar o equipamento/software; limpar pedestal inferior e detector superior com lenço macio seco (Kimwipes); realizar o branco com 1–2 µL de água RNase-free (DEPC) ou tampão de eluição.

Medição: selecionar Nucleic Acid → RNA; garantir amostra homogeneizada; pipetar 1–2 µL no pedestal; baixar o braço e tocar em Measure/Sample; registrar concentração (ng/µL) e razões A260/280 e A260/230; limpar imediatamente os pedestais.

Interpretação (QC do RNA): A260/280 de RNA puro entre 1,9 e 2,1 (valores baixos → contaminação proteica/fenólica); A260/230 idealmente > 1,8 (valores baixos → sais/orgânicos); espectro com pico suave em 260 nm e vale próximo a 230 nm.

Figura 1 — Exemplo de quantificação por espectrofotometria (NanoDrop/DeNovix)



Fonte: NanoDrop/DeNovix.

2.6.3. ELETROFORESE MICROFLUÍDICA (TAPESTATION 4200)

Avaliar a distribuição de fragmentos de RNA com ScreenTape® de alta sensibilidade. Para RNA plasmático/extracelular, espera-se predominância de fragmentos < 200 nt e ausência de bandas 18S/28S. As métricas RIN/RINe não são aplicáveis a RNA plasmático fragmentado; registrar a interpretação qualitativa do eletroferograma.

Fluxo resumido: equilibrar ScreenTape® e reagentes por 30 min à temperatura ambiente; descongelar RNA Ladder e amostras no gelo; pipetar 5 μL de RNA Sample Buffer + 1 μL de amostra (e + 1 μL de Ladder em poço próprio); selar, vortexar 1 min a 2000 rpm e spin down; desnaturar a 72 °C por 3 min e resfriar no gelo por 2 min; inserir a ScreenTape® (QR para o leitor), com o Ladder obrigatoriamente na posição A1; executar e gerar relatório (File → Create Report).

2.7. TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT) — SÍNTESE DE CDNA

Padronizar o RNA de entrada para 5 ng/μL. Quando necessário, ajustar a concentração por diluição ($C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$). **Exemplo:** $C1 = 20 \text{ ng}/\mu\text{L}$, $C2 = 5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e $V2 = 10 \mu\text{L} \Rightarrow V1 = (5 \times 10)/20 = 2,5 \mu\text{L}$ de RNA + 7,5 μL de água RNase-free.

Tabela 2 — Composição da reação de transcrição reversa (miRCURY LNA RT Kit)

miRCURY RT Reaction Buffer	5×	2,0	Tampão, sais e dNTPs para síntese de cDNA.
miRCURY Enzyme Mix	10×	1,0	Enzimas para conversão do RNA em cDNA.
RNA (amostra)	5 ng/μL	2,0	Molde para síntese de cDNA.
Água RNase-free	—	5,0	Completa o volume final e previne degradação.
Volume final	—	10,0	—

Fonte: QIAGEN (miRCURY LNA RT Kit).

Figura 2 — Montagem da reação de transcrição reversa (RT)

Padronização da entrada de RNA para RT (5 ng/μL)

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

Exemplo:
 C1 (amostra) = 20 ng/μL
 C2 (alvo) = 5 ng/μL
 V2 (volume final) = 10 μL

$$V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1} = \frac{5 \times 10}{20} = 2,5 \mu\text{L (RNA)}$$

$$V_{H_2O} = V_2 - V_1 = 10 - 2,5 = 7,5 \mu\text{L (água RNase-free)}$$

Fonte: QIAGEN (miRCURY LNA RT Kit).

2.7.1. CICLAGEM NO TERMOCICLADOR (VERITI™ 96-WELL)

Tabela 3 — Perfil de ciclagem da transcrição reversa

Síntese do cDNA	42 °C	60 min	Ativar a transcriptase reversa e converter RNA em cDNA.
Inativação da enzima RT	95 °C	5 min	Inativar a RT e desnaturar o híbrido RNA:cDNA.
Resfriamento	4 °C	∞ (hold)	Preservar a integridade do cDNA.

Fonte: QIAGEN (miRCURY LNA RT Kit).

Operação (Veriti™): ligar e aguardar o carregamento (~1 min); verificar bloco limpo; preparar a mistura (Master Mix + amostra) em tubos 0,2 mL ou placa de 96 poços; usar o spacer para tubos/tiras individuais; fechar e travar a tampa (Lock); programar o método (item 2.7.1) com tampa a ~105 °C e volume de reação correto; iniciar em Start Run. Boas práticas: manter amostras no gelo até o carregamento; o recurso VeriFlex permite zonas de temperatura independentes; nunca forçar a tampa e assegurar o aterramento.

2.7.2. ARMAZENAMENTO DO CDNA

Curto prazo: manter no gelo durante o preparo de placas;

Médio prazo: -20 °C por até 8 dias;

Longo prazo: -30 °C a -15 °C por até 5 semanas, evitando ciclos repetidos de congelamento/descongelamento.

2.8. PCR EM TEMPO REAL (QPCR) — DETECÇÃO DE MICRORNA

Após a RT, diluir o cDNA 1:60 antes da montagem da placa de qPCR (ajustar conforme validação interna). Utilizar primers LNA™ específicos para hsa-miR-122 e hsa-miR-103-3p. Incluir NTC em todas as placas (substituindo o cDNA por água).

Nota técnica — ROX (7500 / 7500 Fast): estes equipamentos requerem baixa concentração de ROX (diluição final 1:200). Para facilitar a pipetagem em reações de 10 µL, preparar ROX de trabalho 1:10 (ex.: 10 µL de ROX Reference Dye + 90 µL de água RNase-free, protegido da luz) e utilizar 0,5 µL por reação. Alternativamente, adicionar ROX ao 2× Master Mix na proporção de 10 µL por 1 mL (1:100), obtendo diluição final 1:200 após o preparo da reação.

Tabela 4 — Composição da reação de qPCR (miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit)

SYBR® Green Master Mix (2×)	5,0	DNA polimerase, dNTPs, tampão e corante intercalante SYBR® Green.
ROX Reference Dye (trabalho 1:10)	0,5	Referência passiva de fluorescência; baixa concentração (1:200 final) para 7500/7500 Fast.
Primer específico (LNA™)	1,0	Oligonucleotídeo específico para amplificação do miRNA-alvo.
cDNA diluído	3,0	Molde para amplificação.
Água RNase-free	0,5	Completa o volume final.
Volume final	10,0	—

Fonte: QIAGEN (miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit).

2.8.1. CONDIÇÕES DE CICLAGEM TÉRMICA (7500 / 7500 FAST™)

Tabela 5 — Perfil de ciclagem térmica do qPCR

Ativação inicial da DNA polimerase	95 °C	2 min	1
Desnaturação	95 °C	10 s	40
Anelamento/extensão	56 °C	60 s	40

Fonte: QIAGEN (parâmetros usuais de qPCR; validar conforme ensaio/primer e equipamento).

Operação (7500 / 7500 Fast): ligar o equipamento e aguardar a inicialização (~2–3 min); abrir o software 7500 e verificar calibrações de fábrica (ROI, Background, PureDye); em Experiment Wizard → New Experiment, nomear e selecionar o instrumento e a química; em Define Targets, inserir hsa-miR-122 (alvo) e hsa-miR-103-3p (controle endógeno) e atribuí-los aos poços; confirmar o programa térmico (item 2.8.1); posicionar a placa (poço A1 no canto superior esquerdo) e Start Run.

Análise dos dados: após a corrida (~40–50 min), na aba Analysis, manter/ajustar a linha de base (baseline, tipicamente ciclos 3–15) e posicionar o threshold na fase exponencial; calcular a expressão relativa por $\Delta\Delta C_t$; exportar os valores de C_q (Excel/GraphPad Prism). Boas práticas: placa limpa e centrifugada (sem bolhas), selos ópticos e proteção contra luz.

2.8.2. CURVA DE DISSOCIAÇÃO (MELTING)

Ao final da amplificação, executar a análise de melting conforme configuração do equipamento para confirmar a especificidade: presença de pico único e ausência de amplificação no NTC. Perfis com múltiplos picos ou ombros sugerem produtos inespecíficos/primer-dímeros e requerem investigação.

2.9. CONTROLE DE QUALIDADE, CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO E REPETIÇÃO

Duplicatas técnicas: executar todas as amostras em duplicata para hsa-miR-122 e hsa-miR-103-3p;

NTC (No Template Control): incluir em todas as placas, para cada ensaio;

Critério de duplicata: diferença $|Cq1 - Cq2| \leq 0,5$ ciclos; acima disso, repetir a reação e verificar pipetagem/bolhas/selagem;

Non-detects: se apenas uma réplica amplificar, classificar como detecção incerta e repetir; se nenhuma amplificar, registrar como indetectável;

Melting: exigir pico único para cada ensaio; múltiplos picos invalidam a corrida daquele ensaio.

2.10. NORMALIZAÇÃO E ANÁLISE DOS DADOS (ΔCt E $\Delta\Delta Ct$)

Obter o Cq médio das duplicatas válidas para hsa-miR-122 e hsa-miR-103-3p;

Calcular $\Delta Ct = Cq(miR-122) - Cq(miR-103-3p)$ para cada amostra;

Definir o calibrador como a média dos ΔCt do grupo controle;

Calcular $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(amostra) - média[\Delta Ct(controle)]$;

Expressar a quantificação relativa como $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, quando aplicável;

Registrar resultados e exportar relatórios via software do equipamento.

2.11. VALIDAÇÃO DO CONTROLE ENDÓGENO (HSA-MIR-103-3P)

A estabilidade do hsa-miR-103-3p deve ser verificada no conjunto amostral do estudo. Recomenda-se avaliar a distribuição de Cq entre grupos e calcular o coeficiente de variação (CV%). Valores de CV < 15% são compatíveis com estabilidade técnica para controle endógeno, conforme prática laboratorial e recomendações MIQE. Cálculo: $CV(\%) = (DP / Média) \times 100$.

Tabela 6 — Estatística descritiva do Cq do hsa-miR-103-3p por grupo

Controle	29	~30,6	Mediana ~31,4; 22,3–38,0
F0/F1	23	~29,9	Mediana ~30,3; 24,9–36,7
F2	15	~31,4	Mediana ~31,7; 26,7–35,8
F3/F4	15	~31,0	Mediana ~31,8; 26,2–35,9

Fonte: próprio autor (dados do estudo).

Tabela 7 — Coeficiente de variação (CV%) do Cq do hsa-miR-103-3p por grupo

Controle	29	30,22	3,83	12,67%
F0/F1	23	30,08	3,21	10,67%
F2	15	31,45	3,31	10,54%
F3/F4	15	31,20	2,84	9,12%

Fonte: próprio autor (dados do estudo).

2.12. QUADRO-RESUMO MIQE (RT-QPCR PARA MICRORNA)

Quadro 2 — Quadro-resumo MIQE (RT-qPCR para microRNA, QIAGEN)

Tipo de amostra	Soro/plasma humano
Método de extração de RNA	miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (QIAGEN)
Controle de contaminação	Tubos RNase-free; segregação de áreas pré/pós-PCR
Quantificação/qualidade do RNA	Eletroforese microfluídica (High Sensitivity RNA ScreenTape®)
Equipamento de QC do RNA	TapeStation 4200 (Agilent Technologies)
Síntese de cDNA (RT)	miRCURY LNA RT Kit (QIAGEN)
Equipamento de RT	Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems)
Volume de reação de RT	10 µL (conforme protocolo do fabricante)
Diluição do cDNA	1:60 (ajustar conforme validação interna)
Química de detecção	SYBR® Green
Kit de amplificação	miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (QIAGEN)
Equipamento de qPCR	Real-Time PCR System 7500 / 7500 Fast (Applied Biosystems)
Ensaio de miRNA	hsa-miR-122 (alvo) e hsa-miR-103-3p (controle endógeno)
Primers/ensaios	Ensaios LNA™ específicos para miRNA (QIAGEN)
Configuração das reações	Amostras analisadas em duplicata
Controles negativos	NTC em todas as corridas
Curva de dissociação (melting)	Realizada ao final de cada corrida para confirmação da especificidade
Critério de aceitação técnica	Repetição de amostras com $ \Delta Cq > 0,5$ entre duplicatas
Normalização dos dados	Métodos ΔC_t e $\Delta\Delta C_t$
Controle endógeno	miRNA de referência validado (hsa-miR-103-3p)
Análise de dados	Software do equipamento (7500) e estatística complementar

2.13. CRITÉRIOS PARA LIBERAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados somente poderão ser liberados quando:

Controles de qualidade do RNA (concentração e pureza) dentro dos limites estabelecidos;

NTC sem amplificação em todas as placas;

Duplicatas técnicas dentro do critério ($|Cq1 - Cq2| \leq 0,5$);
Curva de dissociação com pico único para cada ensaio;
Controle endógeno estável (CV compatível) e normalização concluída;
Ausência de alertas instrumentais ou não conformidades pendentes.

2.14. REGISTROS E RASTREABILIDADE

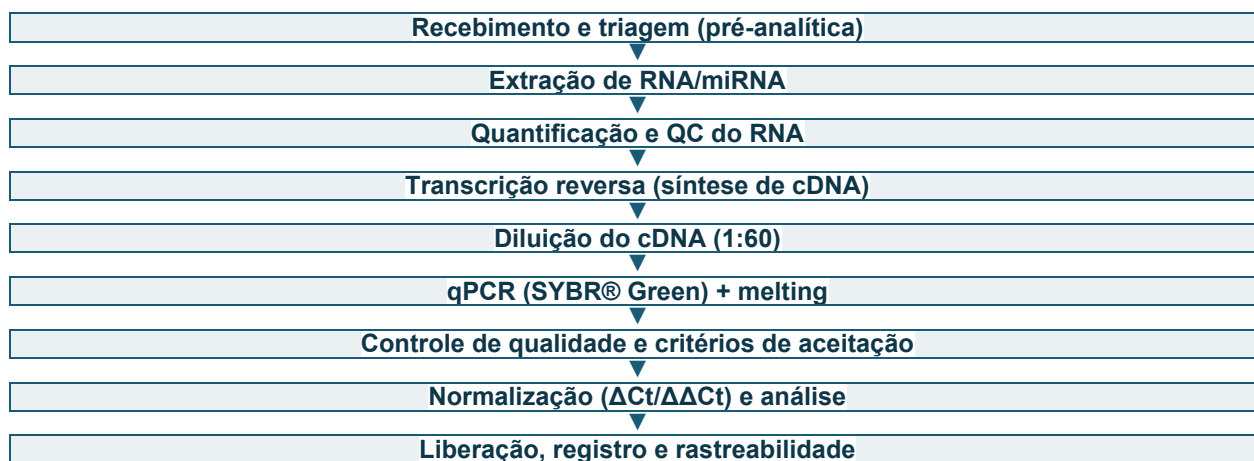
Registrar: ID da amostra, lote/validade dos kits, operador, datas/horas, equipamentos utilizados, desvios e resultados de QC (NTC, melting, duplicatas);
Arquivar: relatórios do equipamento de qPCR, planilhas (Excel) e logs de manutenção/calibração dos equipamentos, conforme rotina institucional;
Manter a segregação de áreas: pré-PCR (extração/RT) e pós-PCR (análise de produtos), para minimizar contaminação.

2.15. DESCARTE E DESCONTAMINAÇÃO

Descartar resíduos biológicos e plásticos contaminados em recipiente apropriado (infectante), conforme normas locais;
Descontaminar bancadas e materiais reutilizáveis com hipoclorito 0,5–1%, seguido de etanol 70% (quando compatível);
Descartar reagentes contendo corantes intercalantes (ex.: reagente Qubit™ em DMSO) como resíduo químico, conforme legislação aplicável.

3. FLUXOGRAMA

Fluxo geral do processo (substituir este esquema textual pelo fluxograma gráfico institucional, conforme padrão da Gestão da Qualidade):



4. REFERÊNCIAS

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

QIAGEN. miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit Handbook. Hilden: QIAGEN, [s.d.].

QIAGEN. QIAzol Lysis Reagent Handbook. Hilden: QIAGEN, [s.d.].

QIAGEN. miRCURY LNA RT Kit Handbook. Hilden: QIAGEN, [s.d.].

QIAGEN. miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit Handbook. Hilden: QIAGEN, [s.d.].

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Qubit microRNA Assay Kits: user guide. Waltham: Thermo Fisher Scientific, [s.d.].

AGILENT TECHNOLOGIES. Agilent 4200 TapeStation System: user manual. Santa Clara: Agilent, [s.d.].

APPLIED BIOSYSTEMS. 7500/7500 Fast Real-Time PCR System: user guide. Foster City: Applied Biosystems, [s.d.].

Nota: completar ano e local de publicação das documentações técnicas dos fabricantes (substituir [s.d.] pela data correspondente) para conformidade plena com a ABNT NBR 6023

5. HISTÓRICO DE REVISÃO

01	28/01/2026	Elaboração do documento.
02	01/07/2026	Adequação ao formato institucional (UACA/LAPIA): reorganização em seções numeradas, padronização tipográfica, inclusão de biossegurança, critérios de liberação, fluxograma e anexos.
03	07/2026	Migração para o modelo institucional HUSE/EBSERH (HU Brasil): reestruturação sob as seções-padrão (Objetivo, Descrição dos Procedimentos, Fluxograma, Referências, Histórico de Revisão, Responsáveis, Apêndice) e atualização do quadro de responsáveis institucionais.

6. RESPONSÁVEIS PELO DOCUMENTO

Elaboração	Carlos André de Souza Pereira Rodrigues — UACA/LAPIA	Assinatura: Data: <u>07/ 07 /2026</u>
Análise	Luiz Claudio Pereira Ribeiro — UACA/LAPIA	Assinatura: Data: ____/____/____
Validação	A definir — Setor de Gestão da Qualidade	Assinatura: Data: ____/____/____
Aprovação	A definir — Chefia da Unidade / Gerência	Assinatura: Data: ____/____/____

APÊNDICE A — LISTA DE VERIFICAÇÃO (CHECKLIST)

Conferir os pontos abaixo a cada rotina de RT-qPCR de microRNA.

Pré-analítica	Amostras identificadas por código único e rastreável; integridade inspecionada; conservação adequada (–80 °C / 2–8 °C).	☐
Área e EPI	Área pré-PCR dedicada; EPI completo; bancada descontaminada (hipoclorito 0,5–1% + etanol 70%).	☐
Extração	Técnica RNase-free; volumes e centrifugações conforme Quadro 1; eluição em 14 µL; eluato a –80 °C.	☐
QC do RNA	Concentração e pureza registradas (A260/280 e A260/230) ou eletroferograma qualitativo (TapeStation).	☐
RT	RNA padronizado a 5 ng/µL; master mix conforme Tabela 2; ciclagem conforme Tabela 3; cDNA armazenado corretamente.	☐
qPCR	cDNA diluído 1:60; ROX na concentração correta (1:200 final); NTC incluído; placa selada e centrifugada.	☐
Melting	Pico único por ensaio; NTC sem amplificação.	☐
Duplicatas	$ Cq_1 - Cq_2 \leq 0,5$; repetições registradas quando necessário.	☐
Análise	Baseline e threshold ajustados; $\Delta Ct/\Delta\Delta Ct$ calculados; controle endógeno estável.	☐
Liberação e registro	CrITÉRIOS de liberação atendidos; resultados, lotes e desvios registrados; relatórios arquivados.	☐

APÊNDICE B — NOTAS DE ADAPTAÇÃO E VALIDAÇÃO

Para adequação ao formato institucional, os itens abaixo foram incluídos/adaptados a partir de boas práticas e manuais técnicos externos, além do texto original fornecido. Recomenda-se validação interna antes do uso rotineiro.

CrITÉRIO numérico para aceitação de duplicatas ($|\Delta Cq| \leq 0,5$): referência operacional ajustável conforme validação;

Descrição estruturada de biossegurança, descarte e rastreabilidade: padrão de POP institucional;

Quantificação fluorimétrica por Qubit™ microRNA Assay: etapa opcional, baseada em manual do fabricante (não QIAGEN);

Nomenclatura do kit de extração: o fluxo descreve QIAzol® + clorofórmio; caso o laboratório utilize o kit 'Advanced' com química livre de QIAzol®, substituir o item 2.5 pelo protocolo QIAzol-free do handbook correspondente;

Notas de estabilidade/armazenamento e segregação de áreas pré/pós-PCR: complementadas como boas práticas de controle de contaminação.

