

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ**

***RELEVANȚA CLINICĂ A MIRNA ÎN
PERSONALIZAREA DIAGNOSTICULUI ȘI
PROGNOSTICULUI PACIENȚILOR CU INFECȚIE
CRONICĂ VHB***

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător de doctorat:
PROF. UNIV. DR. ILEANA CONSTANTINESCU**

**Student-doctorand:
DR. MARINA MARIA MANEA**

2024

Cuprins

	pagina
Introducere	7
I. Partea generală	10
1. Virusul Hepatitei B- o nouă abordare.....	10
1.1. Noutăți și elemente cheie de epidemiologie	10
1.2. Replicarea virusului- elemente de interes.....	11
1.3. Date actuale de patogenie în infecția cronică.....	18
1.4. Citokine și infecția cronică.....	19
1.5. Diagnosticul bolii cronice- dificultăți și noutăți.....	21
1.6. Tratamentul modern al infecției cronice și al complicațiilor.....	23
2. MicroRNA- o nouă abordare legată de Virusul Hepatitei B.....	26
2.1. Conceptul de microRNA.....	26
2.2. MicroRNA și replicarea virală	28
2.3. MicroRNA-uri- factori de prognostic după terapii antivirale.....	29
2.4. MicroRNA-uri ca biomarkeri ai infecției cu Virusul Hepatitei B..	30
2.5. Detecția microRNA-urilor în practica in vivo.....	32
II. Contribuții personale	35
3. Ipoteza de lucru și obiectivele generale.....	35
4. Metodologia generală a cercetării.....	38
4.1. Stabilirea studiilor derulate în cadrul lucrării de doctorat.....	38
4.2. Detalii legate de subiecții incluși în cercetare.....	41
4.3. Detalii legate de datele incluse în studiu.....	41
4.4. Recoltarea produselor biologice și procesarea lor.....	42
4.5. Aparatul statistic folosit.....	46
5. Obiectiv 1. Asocieri între microRNA și viremie	47
5.1. Introducere	47
5.2. Materiale și metodă	47
5.3. Rezultate.....	48
5.4. Discuții.....	55
6. Obiectiv 2. Asocieri între miR-122 și ALT.....	57
6.1. Introducere	57
6.2. Materiale și metodă	58
6.3. Rezultate.....	58

	pagina
6.4. Discuții.....	65
7. Obiectiv 3. Implicațiile miRNA în prognostic.....	67
7.1. Introducere	67
7.2. Materiale și metodă	67
7.3. Rezultate.....	68
7.4. Discuții.....	88
8. Obiectiv 4. Asocieri între microRNA și gradul fibrozei.....	92
8.1. Introducere	92
8.2. Materiale și metodă	93
8.3. Rezultate.....	94
8.4. Discuții.....	99
9. Obiectiv 5. Analiză bioinformatică.....	101
9.1. Introducere	101
9.2. Materiale și metodă	102
9.3. Rezultate.....	103
9.4. Discuții.....	109
10. Concluzii și contribuții personale.....	112
10.1. Concluzii	112
10.2. Contribuții personale	114
Bibliografie.....	116
Anexe.....	146
Anexa 1.....	146
Anexa 2.....	146

Listă abrevieri prezente în rezumat

ADN- acid dezoxiribonucleic
ADNds- acid dezoxiribonucleic dublu spiralat
AgHBs- antigen s al virusului Hepatitei B
ALT- alanin-aminotransferaza
AST- aspartat-aminotransferaza
ARN (sau RNA)- acid ribonucleic
AUC- aria de sub curba ROC
CHC- carcinom hepatocelular
FAMD- factorul de analiză a datelor mixte
FIB-4- fibrosis-4 index
FOXO- forkhead box transcription factors
GGT-gamma glutamil-transferaza
HBx- proteina X a virusului Hepatitei B
IL- interleukină
MAPK- protein kinaza mitogen activată
OMS- Organizația Mondială a Sănătății
PT-timp protrombină
PTEN- omologul fosfatazei și tensinei
RT-PCR- Real Time-PCR
TGF- Tumour Growth Factor
TP53- proteina tumorală 53
VHB-Virusul Hepatitei B
VHC- Virusul Hepatitei C
WNT- familia sitului de integrare MMTV fără aripi
β- beta

Problema fundamentală

VHB are origini îndepărtate în timp, fapt dovedit de Suh et al. prin analize provenite din urme de acid nucleic preistoric, de la strămoșii păsărilor moderne [1]. În ciuda existenței mijloacelor preventive, OMS atrage atenția asupra lipsei politicilor eficiente de eliminare a virusului din circulație, fiind necesare îmbunătățiri ale mijloacelor de comunicare, diagnosticare și tratament [2].

Pe de altă parte, în ciuda îmbunătățirii sistemelor medicale, diagnosticarea VHB poate cunoaște unele limitări în anumite situații cum ar fi infecția „ocultă” [3]. Unele țări au, conform OMS o problemă în a gestiona și trata infecția cronică, din pricina costurilor, precum și a lipsei mijloacelor terapeutice și de diagnostic eficiente [2]. Purtătorii inactivi ar trebui, conform recomandărilor cercetătorilor, să fie evaluați constant în vederea constatării apariției unor eventuale reactivări virale sau complicații [4]. Aceste cheltuieli ale monitorizărilor repetate nu pot fi, conform OMS, susținute de toate programele guvernamentale. De asemenea, se consideră că o prioritate este tratamentul curativ [2]. După unii autori, o altă problemă a monitorizării este legată de evaluarea evoluției fibrozei prin biopsie hepatică, fiindcă este o tehnică invazivă, cu posibilitatea de a avea complicații importante [5]. Pentru a evita neplăceri în strategia de diagnosticare a stadiilor fibrozei, cercetătorii au optat pentru investigarea testelor non-invazive, însă nu s-a ajuns la o metodă ideală [6].

Pe alt plan, detectarea microRNA-urilor au cunoscut o dezvoltare întrucât este de interes participarea lor în căile replicative [7] și patogene [8] ale VHB. Mai mult, aceste molecule ar putea fi biomarkeri versatili, cu rol diagnostic [9] sau prognostic [10] în mai multe faze ale bolii virale [9, 10]. Terapii moderne ar putea fi, conform unora, concepute cu ajutorul microRNA [11]. Pe de altă parte, nu au fost elucidate mecanismele participării patogene ale moleculelor non-codante în tabloul infecției cronice VHB și a complicațiilor sale. Există divergențe între cercetători, unii fiind de părere că expresia microRNA-urilor scade într-o patologie [12], iar alții găsind o stimulare a moleculelor non-codante în aceeași afecțiune [13]. Problema aceasta, de lipsă de uniformizare a protocoalelor folosite în detecție apare din disensiuni legate de normalizarea corectă în experimentele structurate pe expresia microRNA. Unii autori subliniază importanța mijloacelor de control intern din asemenea cercetări, fiindcă fără o referință optimă rezultatul expresiei devine nesigur [14]. Pentru ameliorarea normalizatorilor, sunt folosite tehnici de evaluare a stabilității, așa cum au fost

descrise de unele lucrări [15]. De asemenea, folosirea unor tehnologii superioare de RT-PCR îmbunătățește rezultatele analizării microRNA [16].

În ciuda impedimentelor, studiile legate de moleculele non-codante au înflorit în ceea ce privește patologia VHB. Unii cercetători se bazează pe rolul predictiv al miR-122 în evaluarea răspunsului la tratamentul antiviral la pacienți cu multiple infecții virale concomitente [17]. Alții aduc în discuție legăturile dintre acest microRNA și viremie [18]. Pe de altă parte, important în replicarea virală din infecția VHB pare să fie și miR-146a, prin proteinele reglatorii asupra cărora intervine [19]. Interesantă este și intervenția microRNA-urilor în procesele de oncogeneză din evoluția infecției, prin interacțiuni cu HBx și TGF- β [20]. Totodată, unii autori au speranța găsirii unor terapii curative în infecțiile cronice virale, bazate pe țintirea unor molecule cu ajutorul microRNA-urilor [21].

Ca atare, tehnologia de detecție a microRNA-urilor există și poate fi îmbunătățită, iar găsirea interacțiunilor dintre moleculele noncodante și VHB ar putea aduce o eficientizare a evaluării și tratamentului bolnavilor.

În cazul României, infecțiile VHB persistă în rândul oamenilor, existând încă un procent de nediagnosticați [22] și o vaccinare de 85% a copiilor [23]. Până la data redactării prezentei teze nu au fost realizate studii de amploare pe pacienți români pentru înțelegerea implicării microRNA în mecanismele bolii și pentru studierea potențialului lor diagnostic sau prognostic.

Lucrarea de față are complexitate, cu o tematică situată la punctul de întâlnire dintre discipline biomoleculare, imunologie și virusologie, în cercetarea microRNA-urilor ca elemente de diagnostic și prognostic în infecția cronică VHB. Noutatea tezei este fundamentată și pe o metodologie elaborată, clădită pe aprofundări teoretice și primele cercetări clinice, având subiecți români, legate de miR-122, miR-146a și replicarea VHB. Astfel, s-au concretizat modele de depistare bazate pe microRNA, ale viremiilor mari și ale valorilor crescute ale ALT. Mai mult, s-au realizat studii în premieră cu tematica asocierilor dintre fibroză, tratament antiviral și microRNA la subiecți români infectați cronic VHB, lansându-se noi perspective de prognostic bazate pe miR-122 și miR-146a. Abordarea modernă și practică a lucrării s-a reflectat și la final, unde autoarea a ilustrat prima amplă analiză bioinformatică focusată pe mecanisme moleculare dintre miR-122 și miR-146a, cu impact asupra depistării unor căi de semnalizare din activitatea imunologică.

Cercetarea aduce și noi perspective de studiu, legate de asocierea microRNA-urilor cu markeri biologici pentru stabilirea prognosticului, sau cu terapii viitoare axate pe asocieri dintre molecule non-codante și elemente imune.

I. Partea Generală

1. Virusul Hepatitei B- o nouă abordare

Conform ultimelor rapoarte internaționale publicate, decesele cauzate de VHB planează încă în tabloul evoluției bolii în lume [2]. În România au fost înregistrați oficial aproape un milion de infectați VHB [24].

VHB, aparținând Hepadnaviridae, are un genom caracteristic, cu un ADNds incomplet circular [25]. Asupra procesului său replicativ acționează numeroși factori printre care și glicozilarea proteinelor de înveliș [26-27].

Infecția cronică VHB trece prin mai multe etape de progresie, iar dintre fazele problematice se poate menționa „infecția ocultă”, întrucât stârnește dificultăți în depistare [28]. Imunodeprimații aflați într-o astfel de etapă pot avea reactivări virale, deci trebuie atenție în monitorizare [29]. O evaluare dificilă apare și la bolnavii a căror patologie nu progresaază conform ghidurilor, în opinia unor autori [30].

Molecular, atenția cercetătorilor este axată pe epuizarea limfocitară, reflectată asupra mai multor categorii celulare [31-32]. Fenomenul a fost studiat recent, de unii autori, pentru abordarea unor noi metode în definirea prognosticului CHC [33].

Pe de altă parte, oamenii de știință susțin că citokinele sunt molecule principale în comunicarea dintre celulele implicate în infecția VHB [34]. Conform datelor recente, anumite proteine virale influențează producția de citokine, de pildă IL-6 și IL-10 [35]. Cercetători precum Gu et al. subliniază legături între secreția de interleukine și ciclul replicativ VHB [36]. Alții promovează folosirea citokinelor în stabilirea prognosticului [37].

Din punct de vedere al mijloacelor utilizate în diagnosticul infecției VHB, în literatură sunt menționate progrese prin descoperirea unor tehnici de cuantificare a AgHBs [38], a unor tehnici superioare de RT-PCR [39], precum și a testelor de detecție ale ARN-ului viral [40]. Pe de altă parte, combinații între valoarea încărcăturii virale și prezența unor proteine specifice VHB sunt încercate de unii cercetători pentru dezvoltarea unor paneluri de prognostic [41]. OMS susține folosirea unor teste rapide pentru diagnostic și prognostic, din motive economice [2].

Date din literatură accentuează limitările observate ale tratamentului antiviral actual, cercetătorii optând pentru susținerea găsirii unei terapii curative [42]. Candidați cu acest scop sunt, conform unora, terapii moderne bazate, de pildă, pe microRNA-uri [43] sau terapii imunologice [44].

2. MicroRNA-o nouă abordare legată de Virusul Hepatitei B

MicroRNA-urile sunt reprezentate de molecule care nu codifică proteine în mod direct, rolul lor centrându-se pe influențarea ARN-ului mesager [45]. Unii cercetători consideră că microRNA-urile pot străbate organismul prin exozomi secretați de diverse celule [46].

Rolurile acestor molecule non-codante sunt multiple. MiR-511-5p a fost, de pildă, studiat de Fei et al. în procese de promovare a metastazării CHC [47]. MiR-195a-5p este implicat, conform unora, în procese lezionale, prin generarea de semnale de autofagie [48]. Unii cercetători s-au concentrat pe studiul fibrogenezei din ciroză, mai ales pe interacțiunea miR-541 și TGF- β [49]. Anumite molecule non-codante prezintă și un potențial terapeutic, aici fiind vorba, conform unora, de efectul miR-143-3p asupra regenerării hepatice [50] sau de acțiuni antitumorale a miR-223-3p [51]. Totodată, studiile au demonstrat că VHB prezintă microRNA-uri proprii, unul din acestea, VHB-miR-3, acționând asupra activității sistemului imunitar al gazdei [52].

Legat de patologia asociată infecției cronice VHB, se poate sublinia faptul că cercetările centrate pe microRNA-uri sunt într-o continuă dezvoltare. O abordare modernă a acestei teme a investigat potențialul miR-143 și miR-145 în elaborarea unei testări non-invasive pentru CHC [53]. Pe de altă parte, miR-30e a fost asociat cu HBx în procesele de generare a fibrozei, conform unor studii [54]. Anumite microRNA-uri, cum ar fi miR-17-92, sunt, așa cum este demonstrat în cercetări, conectate cu replicarea VHB [55]. Pe de altă parte, unii autori ilustrează o implicare microRNA-urilor în procese de formare a CHC, prin interacțiunea cu citokine precum TGF- β [56].

Elementele amintite mai sus reprezintă anumite repere teoretice demonstrate de oamenii de știință în periplul printre conexiunile create microRNA-uri și VHB. La momentul elaborării acestei lucrări de doctorat existau păreri multiple cu privire la conceptul abordării moleculelor non-codante pentru înțelegerea patogeniei infecției cronice VHB, însă nu se puteau defini exact căile moleculare de acțiune. Datorită unui volum mare de informații obținut de-a lungul anilor, cercetătorii au creat softuri de analiză bioinformatică menite să proceseze datele pentru generarea unor hărți de interacțiune moleculară în infecția VHB. Unul dintre acestea, actualizat continuu și recent, a semnalat prezența unor legături între miR-122, miR-146a, precum și alte microRNA-uri, în infecția cronică [57-58]

II. Contribuția personală

3. Ipoteza și obiectivele

Tema principală a lucrării a fost legată de investigarea potențialului diagnostic și prognostic al miR-122 și miR-146a în infecția cronică VHB. Efortul științific s-a concentrat pe îndeplinirea obiectivelor generale focusate pe asocierile dintre microRNA și viremie, apoi dintre moleculele non-codante și ALT; găsirea unor elemente predictive bazate pe expresia microRNA în fibroză și tratament; căutarea mecanismelor generatoare a relațiilor dintre microRNA-urile de interes, printr-o analiză bioinformatică de amploare.

Obiectivele specifice au avut drept motive centrale elaborarea de modele diagnostice bazate pe expresia miR-122 la cei cu viremii mari și valori ridicate ale ALT, aprecierea potențialului prognostic al aceluiași microRNA, precum și depistarea relaționărilor între moleculele non-codante urmărite și limfocite în infecția cronică VHB.

Întrebările principale în jurul cărora s-a derulat cercetarea au fost:

1. Se pot găsi corelații între viremie, miR-122, respectiv miR-146a la pacienții români cu infecție cronică VHB?
2. Poate exista o asociere între ALT, miR-122, respectiv miR-146a la pacienții români cu infecție cronică VHB?
3. Tratamentul ar putea influența expresia unor variabile serologice în strânsă legătură cu microRNA?
4. MicroRNA-urile aduc schimbări în valorile serice ale unor biomarkeri clasici?
5. Fibroza poate fi diagnosticată printr-un test non-invaziv bazat pe microRNA?
6. Există legături moleculare între citokine, miR-122 și miR-146a în infecția cronică VHB la români?

Pentru a răspunde, s-au emis o serie de ipoteze secundare de lucru prin care s-a presupus că ar fi adevărată existența unei legături între miR-122, miR-146 și viremie sau ALT, concretizată, posibil, prin interacțiuni bazate pe modificări ale unor proteine. De asemenea, s-a considerat că tratamentul, respectiv fibroza ar influența caracteristicile serologice ale pacienților VHB pozitiv, implicit și expresia moleculelor non-codante. Mai mult, s-a trasat ipoteza unui potențial predictiv al microRNA-urilor, în ceea ce privește evoluția parametrilor biochimici și hematologici din ser.

4. Metodologia de cercetare

4.1. Stabilirea studiilor derulate în cadrul lucrării de doctorat

Derularea studiilor pentru efectuarea tezei s-a realizat etapizat, apoi descoperirile s-au reunit în tabloul complex al prezentei lucrări. Un element care dă greutate cercetării a fost volumul mare de informații cuprinse, obținut prin meta-analize publicate și review-uri sistematice. Astfel, una din publicații, fundamentată pe controlul riguros a peste 58000 de articole, a găsit o relaționare între IL-8, IL-9, IL-10 și viremie în infecția cronică VHB [59]. Lucrarea a stat la baza concluziilor analizei bioinformatică.

Pe de altă parte, viremia a fost corelată de variații ale expresiei microRNA-urilor într-o altă meta-analiză, rezultatul final fiind centrat pe valorile miR-122 [60]. De aici a pornit ideea capitolelor legate de ciclul replicativ viral și acest microRNA. Mai mult, autoarea a conceput primul studiu pilot, in vivo, din România, legat de conexiuni microRNA-viremie [61], continuat printr-o cercetare de validare în cadrul tezei. Un alt articol a ilustrat legături post-terapie între miR-122 și limfocite [62], fiind continuat, în lucrarea de doctorat, cu un studiu prognostic bazat pe același microRNA și loturi de pacienți tratați și netratați. Cunoștințele legate de relaționările fibroză- teste biochimice s-au îmbunătățit prin al treilea articol în care a fost realizată o meta-analiză bazată pe variațiile GGT și ALT, dar și un studiu pilot al unui nou test non-invaziv de identificare a fibrozei importante [63]. Rezultatele de aici au dus la elaborarea unei cercetări de verificare a descoperirilor studiului pilot pe un lot mai mare, dar și la dezvoltarea unor concepte prognostice.

4.2. Detalii legate de subiecții incluși în cercetare

103 pacienți infectați cronic VHB, precum și 21 de indivizi sănătoși au fost incluși în cercetare, cu respectarea Consimțământului Informat, dar și al avizului Consiliului de Etică al Institutului Clinic Fundeni, București (decizia de aprobare 46274 din 6.07.2021). Toți subiecții nu trebuiau să aibă infecții (altele decât cea dată de VHB). Toți participanții trebuiau să fie majori. Nu au fost incluse gravide sau persoane care alăptau.

4.3. Recoltarea produselor biologice și procesarea lor

S-au folosit probe de sânge venos, procesate și stocate separat (la -80°C). Testele biochimice și hematologice au fost realizate pe analizoare Versacell V2- Dimension RXL și SYSMEX-XN-1000-5. ADVIA CENTAUR XPT a determinat antigene virale și anticorpi

anti VHB, iar BOSPHORE HBV QUANTIFICATION KIT a stabilit nivelurile încărcăturii virale. Producătorii aparaturii au fost Siemens Healthineers, Erlangen, Germania, respectiv Anatolia genetworks, Istanbul, Turcia (pentru viremii). În tabelul IV.1 au fost prezentate principiile de lucru ale aparaturii folosite.

Tabel IV.1. Principalele tipuri de analize de laborator efectuate

Tipul analizei	Aparatură utilizată	Principiul de detecție
Transaminaze	VersaCell V2-Dimension RXL	Metodă spectrofotometrică [64-65]
GGT	VersaCell V2-Dimension RXL	Metodă spectrofotometrică [66]
Bilirubina totală	VersaCell V2-Dimension RXL	Metodă spectrofotometrică [67]
Parametri hematologici	Sysmex-XN-1000-01	Flow-citometrie cu fluorescență [68]
PT	Sysmex-CS-2500	Metodă coagulometrică, cromogenă [69]
Deteție antigene și anticorpi virali	Advia Centaur XPT	Metodă chemiluminescentă, de tip sandwich [70-73]
Cuantificare viremie	BOSPHORE HBV QUANTIFICATION KIT	TaqMan multiplex RT-PCR [74]

* GGT-gamma-glutamil-transferaza, PT-timp protrombină, RT-PCR- real-time PCR.

Deteția microRNA au fost bazată pe kit-uri Thermo Fisher, pornindu-se de la extracția ARN-ului total din 100μL de ser, urmat de o serie de pași finalizați cu legarea ARN-ului total de bile magnetice. Ciclurile de revers-transcriere și cuantificarea miRNA a presupus utilizarea unui aparat Applied Biosystems 7300 (Thermo Fisher Scientific, San Francisco, California, Statele Unite ale Americii), cu RT-PCR. MiR-21 a fost controlul intern utilizat, selecția fiind bazată pe stabilitatea sa cea mai mare, conform RefFinder [75]. Metoda $2^{-\Delta\Delta CT}$ a fost aleasă pentru calcularea expresiei microRNA funcție de amplificarea controlului intern. Alegerea microRNA-urilor de interes s-a făcut în baza datelor din literatură (cum ar fi [17-19]). Site-ul producătorului a furnizat mare parte din informațiile necesare pentru alegerea controlului intern [76].

4.4. Aparatul statistic folosit

Toate demersurile științifice s-au derulat după estimarea numărului necesar de pacienți cu softul Open Epi [77]. Apoi programul de calcul statistic a fost reprezentat de soft-ul R 4.2.2 [78]. După asigurarea normalității datelor, s-au făcut corelații Pearson, comparații Mann-Whitney și Kruskal-Wallis. Caracteristicile pacienților au fost evaluate în detaliu prin FAMD, iar legăturile dintre variabile au fost observate prin pachetele mediation și JSmediation. Metoda Youden a fost baza calculelor valorilor prag. Testele diagnostice au necesitat curbe ROC. Lucrarea a inclus și tehnici de statistică avansată de tipul analizelor de regresie și a modelelor de subdistribuție ale riscului derivate din analiza Cox [79]. Stabilirea semnificației testelor statistice a presupus un $p < 0,05$.

5. Obiectiv 1. Asocieri între microRNA și viremie

5.1. Introducere

Scopul capitolului a fost validarea studiilor preliminare legate de asocierea microRNA-replicare VHB la pacienți români cu infecție cronică (s-a descoperit o nouă formulă de diagnostic a viremiilor mari). S-a luat în considerare realizarea unei analize de mediere pentru explorarea potențialelor legături miR-122- viremie, fiind prima de acest tip realizată în România.

5.2. Materiale și metodă

Această parte a studiului doctoral a respectat metodologia generală descrisă anterior, fiind incluși 57 de subiecți infectați cronic VHB, aleși în ordinea internării, în perioada 2021-2023 și 11 persoane sănătoase.

5.3. Rezultate

Valoarea viremiei a fost reperul de clasificare al pacienților în două categorii (subiecți cu încărcătură virală peste 2000 UI/mL și indivizi sub această valoare). Nivelul viremiei a fost ghidat de repere din literatură [80]. 57 de indivizi au fost comparați cu 11 subiecți sănătoși, obținându-se o expresie stimulată a ambelor microRNA-uri. Ambele sexe au avut reprezentare. Dintre microRNA-uri, numai miR-122 a variat semnificativ între grupurile cu viremie diferită ($p=0,002$).

Modelul diagnostic identificat în studiul pilot preliminar (a se vedea capitolul 4 al rezumatului și cel al tezei de doctorat pentru detalii) s-a dovedit a fi legat statistic de o valoare mare a viremiei. AUC al acestui test a fost 0,778, plasându-l în categoria testelor utilizabile pentru depistarea încărcăturii virale. MiR-122 s-a corelat semnificativ cu viremia, iar în urma analizei de mediere s-a observat o legătură între molecula non-codantă, vârstă și valoarea ADN-VHB.

5.4. Discuții

Principalul scop, legat de căutarea legăturilor dintre microRNA-uri și viremie a fost îndeplinit prin miR-122, care, deși a mai fost asociat cu încărcătura virală [81], relația sa cu nivelul ADN-VHB nu a mai fost investigat la pacienți români cu infecție cronică VHB.

Fenomenul de mediere între miR-122 și vârstă a fost explicat prin legătura dintre pre-

zenta moleculă non-codantă și îmbătrânire [82]. Conexiunea dintre miR-122-vârsta-încărcătura virală a fost descoperită, pentru prima dată, în acest studiu.

Principala limitare a cercetării a fost legată de lipsa împărțirii participanților pe grupuri, în funcție de faza infecției VHB, din pricina unui număr mai mic de subiecți. Totuși, complexitatea calculelor statistice efectuate, precum și rigoarea mai multor tipuri de regresii folosite au dus la rezultate valoroase, unice până acum, cu potențial de a propulsa noi metode monitorizare rapide, la patul bolnavului. Astfel, asocierile găsite ar putea deschide drumul unor noi studii viitoare legate de interacțiunea factorilor de risc ai pacienților infectați cronic VHB.

6. Obiectiv 2. Asocieri dintre miR-122 și ALT

6.1. Introducere

Prezentul capitol a cercetat legăturile dintre miR-122, miR-146a și ALT, fiind prima lucrare destinată acestui scop din România. Noutatea se bazează pe faptul că a fost găsită o formulă test, cu acuratețe mare, pentru depistarea valorilor ALT mari. Cercetarea este importantă pentru înțelegerea evoluției către complicațiile apărute în urma injuriei hepatice și pentru demararea unor noi studii legate de aspectele moleculare implicate în evoluția variațiilor transaminazelor.

6.2. Materiale și metodă

68 de pacienți au fost împărțiți în două categorii, după valoarea ALT-ului, fiind realizate, apoi, comparații dintre aceștia și 11 subiecți sănătoși. Alegerea nivelului prag al transaminazei a fost realizată conform ghidurilor în vigoare [80]. Restul metodologiei, precum și calculul statistic, au fost realizate conform descrierii de la capitolul 2 al rezumatului.

6.3. Rezultate

S-a constatat că nivelul expresiei miR-122 a fost mai ridicat în cazul subiecților cu transaminaze mari, comparativ cu ceilalți ($p=0,0004$).

În urma unor teste de regresie uni și multivariată, s-a observat că variabilele sex, AST, GGT, PT și valoarea expresiei miR-122 pot fi potențiali candidați pentru teste de diagnostic în vederea identificării viremiilor mari. S-au conturat, astfel, patru modele de diagnostic dintre care cel bazat pe asocierea dintre miR-122, AST și GGT a avut profilul cel mai bun, cu o sensibilitate de 100% și o specificitate de 82,2%.

6.4. Discuții

Existența asocierilor dintre microRNA-uri și transaminaze au mai fost menționate în literatură [83]. Urmărirea valorilor ALT este importantă, în special pentru încadrarea într-un anumit stadiu al bolii [80] sau pentru prognosticul pacienților [84]. Testul model descoperit, bazat pe expresia miR-122, este util în depistarea valorilor ALT mari, fiind primul astfel conceput în România. Principala limitare a studiului s-a datorat lipsei de evaluări a subiecților pe categorii evolutive ale infecției cronice VHB, din pricina numărului mic de participanți. Totuși, folosirea riguroasă a aparatului statistic înalt dezvoltat a furnizat

îndeplinirea obiectivului propus, printr-un test diagnostic valabil, cu o acuratețe mare. Ar fi posibilă utilizarea lui pentru elaborarea unor analize point-of-care viitoare, centrate pe mecanisme moleculare, eficiente în monitorizare.

7. Obiectiv 3. Implicațiile miRNA în prognostic

7.1. Introducere

Acest capitol a avut ca obiectiv evaluarea efectelor predictive ale microRNA-urilor de interes (ca o continuare a studiului pilot legat de impactul terapiei antivirale- a se vedea detalii în capitolul 4). Mai mult, s-au urmărit capacitățile prognostice ale miR-122 și miR-146a în raport cu scăderea ALT-ului și a viremiei. Este primul studiu de acest fel din România, care reușește să identifice legături între variația în timp a expresiei miR-146a și numărul de limfocite in vivo. De asemenea, este prima cercetare în care se demonstrează potențialul predictiv al modelelor de diagnostic ilustrate în capitolele precedente.

Implicațiile descoperirii sunt importante în studii viitoare, menite să identifice noi teste prognostice bazate pe modelele identificate în cadrul acestei teze. Mai mult, sunt schițate asocieri cu procese imunologice, acestea putând fi baza unor descoperiri ulterioare axate pe miR-146a, la pacienții români infectați cronic VHB.

7.2. Materiale și metodă

Metodologia studiului a urmărit tiparul descris în cadrul capitolului 4. Trebuie accentuat însă că au fost folosite analize statistice avansate, de tipul FAMD, a regresiiilor liniare, precum și a modelelor de subdistribuție derivate din metoda Cox (acestea din urmă fiind importante în predicție [79]). Semnificația statistică a fost aleasă pentru p cu valori sub 0,05.

7.3. Rezultate

Au fost incluși 41 de indivizi VHB pozitivi, cu infecție cronică, o parte tratați și o parte netratați cu agenți antivirali (derivați de interferon sau analogi nucleozidici/nucleotidici). Graficele FAMD au arătat că principalele elemente care ar putea prezice formarea grupurilor de subiecți, după caracteristici comune, au fost modelele de diagnostic identificate anterior (în capitolele 5 și 6), expresia miR-122 și variația în timp a ALT-ului. Totodată, pentru construirea unor modele predictive în vederea aprecierii caracteristicilor pacienților tratați ar fi fost nevoie de variațiile numărului de limfocite și leucocite și valorile expresiilor microRNA-urilor (miR-122 și miR-146), asociate sexului și vârstei.

Proiecțiile temporale construite pe de-o parte, pe baza modelelor de diagnostic găsite în capitolele anterioare, pe de alta, în funcție de expresia miR-122, au ilustrat o serie de as-

pecte nou identificate în rândul românilor infectați cronic VHB. Astfel, valorile mai mari ale miR-122, spre deosebire de cele mai mici, au avut o probabilitate mai ridicată de predicție a scăderilor nivelului ALT și a încărcăturii virale atât la 6 luni, cât și la un an. Modelul de diagnostic găsit în capitolul 6 (legat de valoarea mare a ALT-ului) a avut o capacitate predictivă mai bună decât miR-122 singur în stabilirea scăderii viremiei.

Pe un lot mai mic de pacienți VHB pozitivi (9 subiecți) s-a găsit o corelație semnificativă statistic, negativă, între variația miR-146a în timp și nivelul bazal al limfocitelor indivizilor ($r = -0,7$).

7.4. Discuții

Ghidurile internaționale subliniază necesitatea monitorizării ALT în timp în cazul pacienților VHB pozitivi [80]. Studiul prezentat confirmă impactul variațiilor temporale ale nivelului ALT în caracterizarea parametrilor celor infectați cronic. Noutatea lucrării apare din faptul că miR-122 și modelele de diagnostic derivate din acesta se evidențiază în tabloul potențialilor factori de prognostic ale pacienților VHB pozitivi.

Important este și impactul variațiilor limfocitelor, alături de valorile expresiilor miR-146a și miR-122, asupra prognosticului pacienților tratați. Aceste elemente au fost subliniate în premieră. Unii autori au ilustrat impactul terapiei antivirale asupra variațiilor expresiilor microRNA-urilor, miR-122 [18] și miR-146 [85], precum și a numărului de limfocite [86]. Dar toate aceste elemente nu au mai fost studiate, după cunoștința autoarei, până acum, împreună, la pacienți infectați cronic VHB.

Unii cercetători au schițat în studii pe animale, anumite legături imunologice între limfocite și miR-146a [87]. Pentru prima oară la pacienți VHB pozitivi români, studiul evidențiază o corelație între variația miR-146a și numărul bazal de limfocite. Astfel, este conturată o nouă direcție de cercetare, centrată pe explicația asocierii dintre limfocite și microRNA-uri în infecția cronică VHB.

Proiecțiile predictive au ilustrat potențialul prognostic al formulei de test bazată pe expresia miR-122, AST și GGT, la pacienți infectați cronic VHB. Acesta este un alt element de noutate al tezei.

Au fost identificate limitări legate de numărul pacienților și perioada scurtă de timp în care s-a realizat monitorizarea. Cu toate acestea, lucrarea are importanță, întrucât, prin complexitatea modelelor statistice, reușește să contureze noi modele predictive bazate pe expresia miR-122, precum și asocieri dintre numărul de limfocite și expresia microRNA-urilor.

8. Obiectiv 4. Asocieri între microRNA și gradul fibrozei

8.1. Introducere

Acest capitol a avut menirea de a introduce un nou test potențial de identificare a fibrozei la pacienți VHB pozitivi. În plus, s-au căutat, în premieră în România, asocieri dintre testarea gradului fibrozei și expresiile miR-122 și miR-146a.

Algoritmul diagnostic găsit, împreună cu miR-122 au avut rolul de lansa o nouă perspectivă în monitorizarea prognostică legată de fibroză. Pot fi elaborate astfel studii viitoare explicative, care să aprofundeze, la nivel molecular, descoperirile făcute.

8.2. Materiale și metodă

Metodologia s-a bazat pe aspectele ilustrate în cadrul capitolului 4. Evaluarea testului de diagnosticare al fibrozei importante s-a realizat pe 60 de pacienți VHB pozitiv, cu infecție cronică, aleși după criteriile ilustrate anterior (a se vedea capitolul 4). În plus, a fost utilizat scorul FIB4, pentru evidențierea gradului fibrozei, ceea ce a necesitat un soft de calcul gratuit [88]. De asemenea, a fost utilizată metoda FibroScan, bazată pe tehnici de elastografie, pentru determinarea fibrozării hepatice. Pragul de la care s-a stabilit că fibroza este importantă a fost F2.

Pentru a mări complexitatea rezultatelor a fost folosită din nou metoda FAMMD, iar calculul corelațiilor a fost ajustat Holm (semnificația statistică a fost trasată de o valoare $p < 0,05$).

8.3. Rezultate

Noul test de depistare al gradului fibrozei, bazat pe o combinație între valorile GGT și ALT a fost semnificativ statistic mai mare la pacienții cu fibroză importantă (stabilită prin metoda FibroScan), prin comparație cu ceilalți. De asemenea, a existat o corelație notabilă între acest nou model de diagnostic și valorile FIB4 ($r = 0,42$).

Analizând graficele FAMMD s-a constatat că, în cazul celor 41 de pacienți prezentați în capitolul 7, noul test diagnostic al fibrozei, împreună cu miR-122, variația limfocitelor și plachetelor, influențează caracteristicile de grup ale subiecților.

8.4. Discuții

Studiul derulat a adus confirmări cu privire la corelarea noului test de identificare al fi-

brozei cu valorile calculate prin metoda FibroScan și scorul FIB4.

Principala limitare a acestei cercetări a fost bazată pe numărul mic al pacienților cu fibroză importantă, care nu a permis derularea unor teste suplimentare de evaluare a acurateții diagnostice pentru modelul nou descoperit. Cu toate acestea, potențialul testului de a putea fi utilizat pe viitor există, întrucât rezultatele obținute au avut o precizie statistică superioară, dată de elemente corective matematice, de înaltă acuratețe, folosite.

Unii autori au inclus miR-122 în scoruri de diagnostic pentru depistarea fibrozei de grad înalt, la pacienți VHB pozitivi, cu infecție cronică [89]. Noutatea acestei lucrări este legată de conexiuni între miR-122 și noul test diagnostic analizat, în stabilirea prognosticului subiecților infectați cronic VHB. Prezenta teza stabilește astfel noi direcții de cercetare axate pe mecanismele generatoare de fibroză în care este implicat miR-122 și variația unor parametri biochimici de interes precum ALT și GGT. De asemenea, o nouă idee de studiu ar putea fi concentrată pe combinarea testului diagnostic nou descoperit cu valorile expresiei miR-122 în descoperirea unor metode point-of-care de depistare a fibrozei.

9. Obiectiv 5. Analiză bioinformatică

9.1. Introducere

Pentru o analiză complexă a conexiunilor moleculare este nevoie de metode bioinformatică, fiindcă acestea pot conferi o perspectivă multidimensională unui volum mare de date, utilizând instrumente de interpretare din domenii precum fizică, matematică sau biologie [90]. În cazul microRNA-urilor, softurile bioinformatică sunt într-o continuă îmbunătățire, cu performanțe mărite prin algoritmi de triere [91].

Acest capitol a avut ca scop aprofundarea rezultatelor obținute anterior printr-o analiză bioinformatică amplă, folosindu-se datele stocate în patru softuri disponibile gratuit. Noutatea demersului apare din faptul că este prima astfel de interpretare complexă a legăturilor dintre miR-122 și miR-146a. De asemenea, sunt generate noi perspective de interpretare a conexiunilor microRNA din infecția VHB, pentru definirea unor idei viitoare de studiu.

9.2. Materiale și metodă

Pentru realizarea studiului a fost nevoie de accesarea a patru baze de date miRWalk [92-93], g: Profiler [94-95], UniProt [96-97] și STRING [98-99]. Etapele cercetării au presupus, mai întâi, identificarea genelor țintă ale miR-122 și miR-146a cu ajutorul miRWalk [92-93], urmată apoi de analize complexe ale expresiei lor prin algoritmi g: Profiler [94-95]. Un alt pas a fost reprezentat de identificarea proteinelor codificate de genele țintă ale microRNA-urilor de interes prin softul UniProt [96-97]. În final s-au realizat grafice de interconectare complexe ale proteinelor găsite în etapa precedentă, pentru înțelegerea interacțiunilor moleculare, cu ajutorul STRING [98-99].

Platformele au fost selectate după performanțe, toate având îmbunătățiri recente ale bazelor de date [93, 95-96, 99]. Decizia de utilizare a acestor softuri web, cu baze de date ample, a fost influențată și de faptul că acestea prezentau resurse experimentale validate [92, 94, 97, 99], pe de-o parte, iar pe de alta, de modelele statistice superioare folosite de analizoarele automate [92, 95-96, 98]. Astfel, rezultatele furnizate au avut o precizie înalt controlată informatic, dublată de posibilitatea controlării și mai riguroase prin corecții statistice de tip Benjamini-Hochberg (p semnificativ sub 0,05) [94, 99]. Nivelul de încredere asupra graficelor finale de inter-relație a sporit prin utilizarea tuturor tehnicilor combinate.

9.3. Rezultate

8634 ținte genice pentru miR-122 și miR-146a au fost găsite prin căutarea miRWalk [92-93]. Funcționalitatea lor a fost apoi analizată prin g:Profiler [94-95], prin algoritmi complecși de identificare a supra și sub-reprezentărilor. Au rezultat o serie de căi moleculare în care genele găsite erau participante. Dintre acestea se pot menționa cele asociate activării antigenice, funcționalității complexului receptorului T, precum și cele implicate în reglarea activității peptidazelor (a se vedea **Figura 9.1.**).

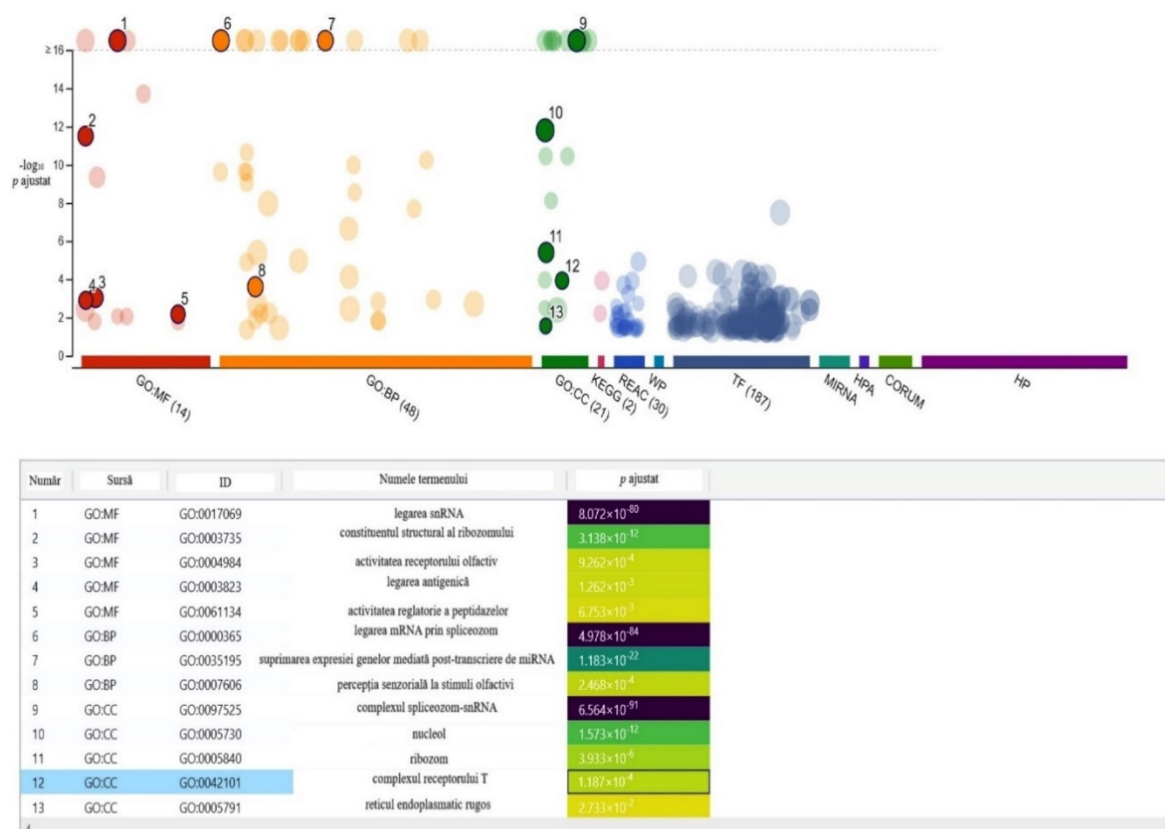


Figura 9.1. Analiza de îmbogățire g:Profiler a genelor asociate miR-146a și miR-122. Rezultate obținute prin analiza platformei g:Profiler [92-93] (GO- Gene Ontology; MF- funcții moleculare; BP- procese biologice; CC- componente celulare; REAC- prescurtare de la denumirea bazei de date REACTOME; WP- WikiPathways; TF- TRANSFAC; HPA- Human Protein Atlas; HP- Human Phenotype Ontology).

Apoi, 367 de proteine cu structură validată au fost atribuite genelor găsite anterior prin softul UniProt [96-97]. Acestea au fost introduse în analiza STRING [98-99]. Rezultatele dovedite experimental, de înaltă încredere statistică, au fost conectate într-o rețea amplă, cu 51 de puncte (a se vedea **Figura 9.2.**). S-a remarcat prezența unor căi de ubiquitinare și de

translație și reglare a ARN-ului mesager și ribozomal [100-101].

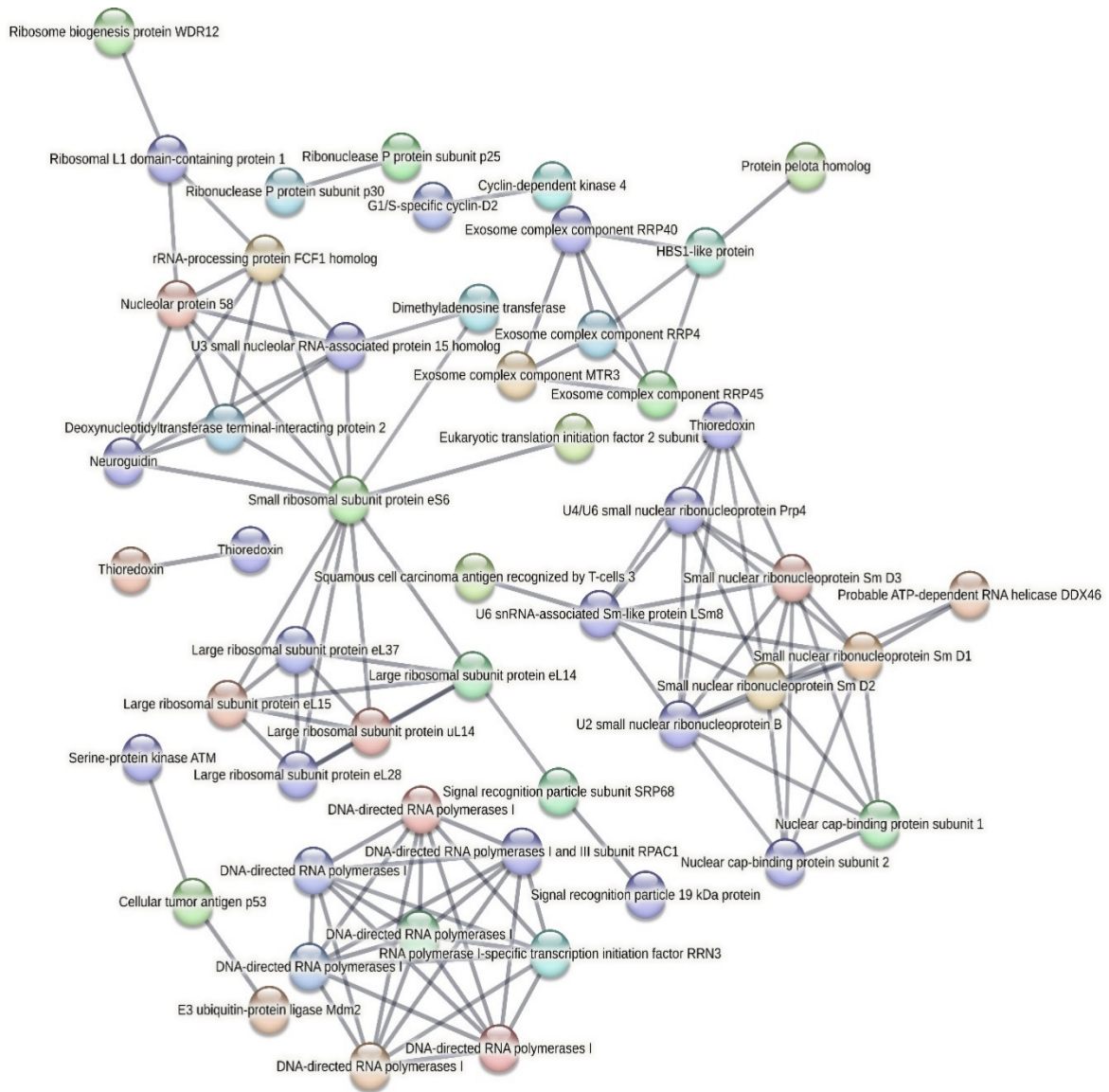


Figura 9.2. Analiza STRING a proteinelor asociate cu gene reglate de miR-146a și miR-122. Rezultate obținute de pe platforma STRING [98-99].

După îmbogățirea rezultatelor cu o serie de informații culese din baze de date conectate automat la platforma STRING [100-105], s-a ajuns la o împărțire a căilor moleculare în clustere, cel predominant conținând căi moleculare de tipul: proliferarea celulelor T din răspunsul imun, procesarea miRNA [100-101], calea de semnalizare p53, calea de semnalizare FOXO, carcinogeneză virală, senescență celulară, microRNA în cancer [102-104], calea de semnalizare MAPK6/MAPK4, translația ARN-ului mesager viral, reglarea

PTEN, semnalizarea independentă WNT, semnalizarea prin NOTCH, căi moleculare asociate bolilor infecțioase [105].

9.4. Discuții

Pentru analizarea rezultatelor obținute trebuie evidențiate câteva repere teoretice. În primul rând, în opinia unor autori, ubiquitinarea poate fi o metodă de instalare și menținere a infecției cronice VHB în organism, fiind relaționată cu replicarea virală [106]. Legat de aceasta din urmă este și TP53, după alți oameni de știință [107]. Pe de altă parte, după studii publicate, o serie de elemente moleculare găsite prin analiza rețelelor proteice sunt implicate în procese carcinogene, precum PTEN [108], WNT [109] și TP53 [110]. Mai mult, cercetătorii au arătat posibilități de implicare în generarea de IL-10 pentru MAPK1 [111] și FOXO1 [112]. Aceasta din urmă este studiată de unii oameni de știință în relație cu producția de limfocite [112].

Ca atare, coroborând informațiile din studiile preliminare (a se vedea capitolul 4), precum și din capitolele anterioare și având în vedere faptul că toate moleculele mai sus menționate sunt implicate în rezultatele obținute pe platforme bioinformatică, în urma analizei proteinelor relaționate cu miR-122 și miR-146a se pot aduce noi idei în tabloul interacțiunilor din infecția cronică VHB. Astfel, studiul aduce noutate, prin emiterea unei posibile interacțiuni între procese de ubiquitinare, TP53 și miR-122, respectiv miR-146a în replicarea VHB. Mai mult, legat de influența microRNA-urilor asupra ciclului celular, cercetări anterioare demarate în derularea lucrării de doctorat (a se vedea capitolul 4) ilustrează influența IL-10 în procese replicative virale. În lumina celor prezentate în cadrul acestei analize bioinformatică, se poate aduce noutatea posibilității asocierii dintre miR-122, miR-146a, limfocite și IL-10 în procese imunologice din infecția cronică VHB, unele chiar legate de replicarea VHB. Nu în ultimul rând, studiul promovează noutatea legăturilor dintre miR-122, miR-146a, PTEN, WNT și TP53 în carcinogeneza asociată VHB. În urma cercetărilor întreprinse în capitolele anterioare, se poate emite ipoteza că aceste căi ar putea fi legate de procese fibrogene sau de creșterea transaminazelor, având în vedere că există păreri care asociază fibroza de apariția cancerului [41], precum și de creșterea ALT-ului [113]. Deși au existat limitări legate de folosirea unor studii in vitro în bazele de date accesate, fără suport in vivo, complexitatea aparatului statistic a ajutat la depășirea lor.

Așadar, prezenta cercetare subliniază, în premieră, posibilitatea unor căi moleculare prin care ar fi explicate rezultate dovedite anterior. Toate acestea converg către tendința realizării unor studii viitoare pentru dezvoltarea terapiilor bazate pe microRNA, anti-VHB.

10. Concluzii și contribuții personale

10.1. Concluzii

1. Lucrarea atinge un obiectiv important legat de validarea unor asocieri între miR-122 și viremie, la pacienții cu infecție cronică VHB (a se vedea capitolul 5). Ultimul capitol, al analizei bioinformatică, întărește rezultatele obținute in vivo (a se vedea capitolul 9), astfel atingându-se încă un scop al cercetării. Demonstrațiile făcute au aplicabilitate practică, deoarece pot fundamenta dezvoltarea unor teste point-of-care, legate de expresia miR-122. Beneficiul lor ar fi unul financiar, dar și unul raportat la rapiditatea răspunsului. Există, de asemenea, potențialul unor studii viitoare de investigare și a altor microRNA-uri asociate încărcăturii virale, posibil conectate cu miR-122.
2. Studiul ilustrat în capitolul 5 arată, de asemenea, utilitatea unui model diagnostic al viremiilor mari, bazat pe miR-122 și vârstă, singurul de acest fel, până acum. Aceasta este o noutate a cercetării, fiind utile pentru dezvoltarea unor viitoare metode de diagnostic și monitorizare, bazate pe elemente moleculare de tip microRNA.
3. Un alt obiectiv important îndeplinit a fost găsirea unui model de depistare al nivelului mare al ALT-ului, folosind expresia miR-122. Acesta este primul astfel de model, conceput în urma unor observații făcute pe subiecți români. Utilitatea lui se remarcă, întrucât un astfel de test, care s-a dovedit a avea o acuratețe mare, ar putea fi un punct de plecare al unor strategii non-invazive de monitorizare a pacienților VHB pozitivi, care să confere un rezultat mai rapid și mai exact asupra derulării unor mecanisme complexe de injurie hepatică.
4. Predicții bazate pe expresia microRNA-urilor au dus la atingerea unui alt obiectiv al studiului (a se vedea capitolul 7). Acestea au aplicabilitate în monitorizarea mai complexă a proceselor imunopatologice implicate în evoluția infecției cronice VHB.
5. O noutate pentru pacienții români cu infecție VHB a apărut prin potențialul predictiv al miR-146a legat de cuantificarea limfocitelor serice (a se vedea capitolul 7). Analiza bioinformatică de la capitolul 9 întărește rezultatele. Importanța unor asemenea descoperiri ar putea fi reflectată în descoperirea unor terapii antivirale cu punct de plecare imunologic, ceea ce ar aduce beneficii pe termen lung, prin contribuția adusă pentru eradicarea infecției. Studii viitoare pot fi derulate pornind de rezultatele din această teză.
6. Pacienții tratați au fost caracterizați de legături între variația numărului de limfocite în timp, expresia miR-122 și expresia miR-146a (a se vedea capitolul 7). Aceasta este o noutate

a lucrării, cu utilitate în îmbunătățirea terapiilor antivirale existente, printr-o înțelegere aprofundată a mecanismelor moleculare.

7. Noul test pentru depistarea fibrozei găsit se corelează cu expresia miR-122 (a se vedea capitolul 8). Astfel, se pot dezvolta metode noi de monitorizare a evoluției bolnavilor, prin înțelegerea mecanismelor moleculare pe care se bazează evoluție fibrozei.

8. Sunt trasate asocieri imunologice (a se vedea capitolul 9), prin care sunt explicate rezultate obținute anterior. Astfel, teza capătă profunzime, prin faptul că analize statistice înalt dezvoltate pot duce la validarea unor ipoteze trasate la început. Se întrevede, așadar, aplicabilitatea descoperirilor făcute.

9. Toate obiectivele lucrării au fost îndeplinite, promovându-se noi direcții de cercetare cu impact în practică.

10.2. Contribuții personale

Întreaga lucrare stă sub semnul noului în cercetarea legată de infecția VHB la români.

Modelele de diagnostic concepute, în premieră, (a se vedea capitolul 5, subcapitolul 5.3. și capitolul 6, subcapitolul 6.3.) au fost verificate prin metode statistice dezvoltate și complicate, ceea ce le ridică nivelul de încredere.

Conceptul analizei de mediere dintre miR-122, vârstă și încărcătura virală (a se vedea capitolul 5, subcapitolul 5.3.) este unul inovator, care deschide calea unor noi explicații ale mecanismelor implicate în infecția cronică. Astfel, se pot întrezări terapii antivirale noi, precum și mijloace de monitorizare nuanțate în funcție de expresia microRNA-urilor. Întărirea conceptelor trasate în urma rezultatelor obținute in vivo, prin analiza bioinformatică atent controlată statistic (capitolul 9, subcapitolele 9.3., 9.4.) aduce încă un argument asupra încrederii acordată rezultatelor.

Potențialul prognostic al miR-122 și al miR-146a (a se vedea capitolul 7, subcapitolul 7.3.) aduce monitorizarea bolnavilor români într-un alt plan, sugerând o posibilă modernizare a tehnicilor deja existente. Perspectiva microRNA-urilor în evaluare este de interes, în ideea că acestea ar putea introduce o nouă viziune asupra mecanismelor patogene, aducând în prim-plan posibilitatea controlării în detaliu a evoluției lor. Aceasta ar aduce beneficii în timp, deoarece ar putea determina o dezvoltare a tehnicilor non-invazive și la mărirea acurateții lor. Astfel, noutatea asocierii miR-122 cu un nou test de monitorizare a

fibrozei (capitolul 8, subcapitolul 8.3.) are utilitate în vederea înțelegerii apariției CHC, pe de-o parte, dar și în demararea unor studii legate de îmbunătățirea testelor non-invazive, pe de cealaltă parte.

Legătura dintre microRNA-uri, limfocite, citokine și viremie, este un alt element de noutate, fiind prima astfel de lucrare care subliniază un asemenea rezultat prin coroborarea rezultatelor obținute anterior cu analiza bioinformatică (capitolul 9, subcapitolul 9.3.). În prezenta teză s-a realizat prima abordare minuțioasă a legăturilor miR-122 și miR-146a prin o tehnică atent controlată statistic. Astfel, descoperirea făcută capătă încredere, putând sta la baza înțelegerii unor elemente imunologice din evoluția bolii. Utilitatea unor asemenea conexiuni științifice ar putea fi concretizată prin elaborarea unor terapii curative, noi, anti-VHB.

Toate demersurile de început efectuate în cadrul lucrării de doctorat (a se vedea capitolul 4, subcapitolul 4.1.) au adus și ele contribuții noi pe plan științific, fiind publicate în reviste ISI.

Lucrarea per ansamblu, este, în concluzie, un cumul de elemente noi, complexe, care au aplicabilitate în dezvoltarea strategiilor diagnostice, prognostice și terapeutice din infecția cronică VHB.

Bibliografie

1. Suh A, Brosius J, Schmitz J, Kriegs JO. The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses. *Nat Commun.* 2013; 4:1791. doi: 10.1038/ncomms2798
2. Global hepatitis report 2024: Action for access in low- and middle-income countries. World Health Organization, Geneva, 2024. Accesat în 20.06.2024 la <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091672>
3. Wang C, Xue R, Wang X, Xiao L, Xian J. High-sensitivity HBV DNA test for the diagnosis of occult HBV infection: commonly used but not reliable. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 13:1186877. doi: 10.3389/fcimb.2023.1186877
4. Invernizzi F, Viganò M, Grossi G, Lampertico P. The prognosis and management of inactive HBV carriers. *Liver Int.* 2016; 36 Suppl 1:100–104. doi: 10.1111/liv.13006
5. Tobkes AI, Nord HJ. Liver biopsy: review of methodology and complications. *Dig Dis.* 1995; 13:267–274. doi: 10.1159/000171507
6. Agbim U, Asrani SK. Non-invasive assessment of liver fibrosis and prognosis: an update on serum and elastography markers. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology.* 2019; 13:361–374. doi: 10.1080/17474124.2019.1579641
7. Wang Y, Cao J, Zhang S, Sun L, Nan Y, Yao H, Fan J, Zhu LY, Yu L. MicroRNA-802 induces hepatitis B virus replication and replication through regulating SMARCE1 expression in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis.* 2019; 10:1–9. doi: 10.1038/s41419-019-1999-x
8. Chen C, Wu M, Zhang W, Lu W, Zhang M, Zhang Z, Zhang X, Yuan Z. MicroRNA-939 restricts Hepatitis B virus by targeting Jmjd3-mediated and C/EBP α -coordinated chromatin remodeling. *Sci Rep.* 2016; 6:35974. doi: 10.1038/srep35974
9. Li B, Li D, Chen C, Liu B, Xia C, Wu H, Wu C, Ji G, Liu S, Ni W, et al. Potentials of the elevated circulating miR-185 level as a biomarker for early diagnosis of HBV-related liver fibrosis. *Sci Rep.* 2016; 6:34157. doi: 10.1038/srep34157
10. Cisilotto J, do Amaral AE, Rosolen D, Rode MP, Silva AH, Winter E, da Silva TE, Fischer J, Matiollo C, Rateke EC de M, et al. MicroRNA profiles in serum samples from Acute-On-Chronic Liver Failure patients and miR-25-3p as a potential biomarker for survival prediction. *Sci Rep.* 2020; 10:100. doi: 10.1038/s41598-019-56630-5
11. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017; 16:203–222. doi: 10.1038/nrd.2016.246

12. Yu G, Chen X, Chen S, Ye W, Hou K, Liang M. MiR-19a, miR-122 and miR-223 are differentially regulated by hepatitis B virus X protein and involve in cell proliferation in hepatoma cells. *Journal of Translational Medicine*. 2016; 14: doi: 10.1186/s12967-016-0888-7
13. Qi P, Cheng S -q., Wang H, Li N, Chen Y -f., Gao C -f. Serum microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *PLoS ONE*. 2011; 6: doi: 10.1371/journal.pone.0028486
14. Masè M, Grasso M, Avogaro L, D'Amato E, Tessarolo F, Graffigna A, Denti MA, Ravelli F. Selection of reference genes is critical for miRNA expression analysis in human cardiac tissue. A focus on atrial fibrillation. *Sci Rep*. 2017; 7:41127. doi: 10.1038/srep41127
15. Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Daca-Roszak P, Kosmalka M, Jaksik R, Witt M, Dawidowska M. Identification of Endogenous Control miRNAs for RT-qPCR in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19:2858. doi: 10.3390/ijms19102858
16. Tan GW, Khoo ASB, Tan LP. Evaluation of extraction kits and RT-qPCR systems adapted to high-throughput platform for circulating miRNAs. *Sci Rep*. 2015; 5:9430. doi: 10.1038/srep09430
17. Yen Y-H, Huang C-M, Wei K-L, Wang J-H, Lu S-N, Lee C-M, Hung C-H, Chen C-H, Tseng P-L, Chang K-C, et al. MicroRNA-122 as a predictor of HBsAg seroclearance in hepatitis B and C dual infected patients treated with interferon and ribavirin. *Sci Rep*. 2016; 6:33816. doi: 10.1038/srep33816
18. Wu Y, Gao C, Cai S, Xia M, Liao G, Zhang X, Peng J. Circulating miR-122 Is a Predictor for Virological Response in CHB Patients With High Viral Load Treated With Nucleos(t)ide Analogs. *Front Genet*. 2019; 10:243. doi: 10.3389/fgene.2019.00243
19. Wang Y, Li Y. miR-146 promotes HBV replication and expression by targeting ZEB2. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 2018; 99:576–582. doi: 10.1016/j.biopha.2018.01.097
20. Dong K, Chen Y, Yang G, Liao Z, Zhang H, Liang H, Chen X, Dong H. TGF- β 1 accelerates the hepatitis B virus X-induced malignant transformation of hepatic progenitor cells by upregulating miR-199a-3p. *Oncogene*. 2020; 39:1807–1820. doi: 10.1038/s41388-019-1107-9
21. Emanuelson C, Ankenbruck N, Kumbhare R, Thomas M, Connelly C, Baktash Y, Randall G, Deiters A. Transcriptional Inhibition of MicroRNA miR-122 by Small Molecules Reduces Hepatitis C Virus Replication in Liver Cells. *J Med Chem*. 2022; 65:16338–16352. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c01141

22. Hepatitis B-Annual Epidemiological Report 2022. European Centre for Disease Prevention and Control. Hepatitis B. În: ECDC. Annual epidemiological report for 2022. Stockholm: ECDC; 2024.
23. Hepatitis B (HepB3) Immunization coverage estimates by country. World Health Organization, 2023. Accesat la 20.06.2024 la <https://apps.who.int/gho/data/view.main.80300>
24. Analiza rezultatelor studiului sero-epidemiologic de prevalență a markerilor de infecție cu virusul hepatitic B (VHB) și virusul hepatitic C (VHC), România, anii 2022-2023. Centrul Național de Supraveghere și Control al Bolilor Transmisibile, București, 2023. Accesat în 20.06.2024 la <https://www.cnscbt.ro/index.php/analiza-date-supraveghere/hepatita-virala-tip-b-si-c>
25. Cernescu C. *Virusologie medicală*. Editura Medicală, București, 2018; 299-301.
26. Tepjanta P, Fujiyama K, Misaki R, Kimkong I. The N-linked glycosylation modifications in the hepatitis B surface protein impact cellular autophagy, HBV replication, and HBV secretion. *PLoS One*. 2024; 19:e0299403. doi: 10.1371/journal.pone.0299403
27. Dobrica M-O, Lazar C, Branza-Nichita N. N-Glycosylation and N-Glycan Processing in HBV Biology and Pathogenesis. *Cells*. 2020; 9:1404. doi: 10.3390/cell9061404
28. Ceaușu M., et al. *Tratat de boli infecțioase*. Editura Medicală, București, 2018; 362-364.
29. Guidelines for the prevention, diagnosis, care and treatment for people with chronic hepatitis B infection. World Health Organization, Geneva, 2024. Accesat în 20.06.2024 la <https://www.who.int/publications/i/item/9789240090903>
30. Liu J, Yu Y, Zhao H, Guo L, Yang W, Yan Y, Lv J. Latest insights into the epidemiology, characteristics, and therapeutic strategies of chronic hepatitis B patients in indeterminate phase. *Eur J Med Res*; 2024. 29:343. doi: 10.1186/s40001-024-01942-0
31. Marotel M, Villard M, Drouillard A, Tout I, Besson L, Allatif O, Pujol M, Rocca Y, Ainouze M, Roblot G, et al. Peripheral natural killer cells in chronic hepatitis B patients display multiple molecular features of T cell exhaustion. *eLife*. 2021; 10:e60095. doi: 10.7554/eLife.60095
32. Ferrando-Martinez S, Snell Bennett A, Lino E, Gehring AJ, Feld J, Janssen HLA, Robbins SH. Functional Exhaustion of HBV-Specific CD8 T Cells Impedes PD-L1 Blockade Efficacy in Chronic HBV Infection. *Front Immunol*. 2021; 12: doi: 10.3389/fimmu.2021.648420
33. Li J, Chen H, Bai L, Tang H. Identification of CD8+ T-cell exhaustion signatures for prognosis in HBV-related hepatocellular carcinoma patients by integrated analysis of single-

- cell and bulk RNA-sequencing. *BMC Cancer*. 2024; 24:53. doi: 10.1186/s12885-023-11804-3
34. Yang L, Jia S, Shao X, Liu S, Zhang Q, Song J, Wang W, Jin Z. Interleukin-35 modulates the balance between viral specific CD4+CD25+CD127dim/- regulatory T cells and T helper 17 cells in chronic hepatitis B virus infection. *Virol J*. 2019; 16:48. doi: 10.1186/s12985-019-1158-0
35. Xie X, Luo J, Zhu D, Zhou W, Yang X, Feng X, Lu M, Zheng X, Dittmer U, Yang D, et al. HBeAg Is Indispensable for Inducing Liver Sinusoidal Endothelial Cell Activation by Hepatitis B Virus. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: doi: 10.3389/fcimb.2022.797915
36. Gu Y, Lian Y, Gu L, Chen L, Li X, Zhou L, Huang Y, Wang J, Huang Y. Correlations between cytokines produced by T cells and clinical-virological characteristics in untreated chronic hepatitis B patients. *BMC Infectious Diseases*. 2019; 19:216. doi: 10.1186/s12879-019-3853-2
37. Fischer J, Long S, Koukouloti E, Müller T, Fueloep B, Heyne R, Eslam M, George J, Finkelmeier F, Waidmann O, et al. Association of Common Polymorphisms in the Interleukin-1 Beta Gene with Hepatocellular Carcinoma in Caucasian Patients with Chronic Hepatitis B. *Pathogens*. 2022; 12:54. doi: 10.3390/pathogens 12010054
38. Baklouti R, Gueddiche A, Ben Abdelwahed M, Aissaoui F, Zakhama M, Bouhlel W, Sriha A, Kooli I, Sallem OK, Argoubi A, et al. The role of quantitative HBsAg in the natural history of e antigen-negative chronic hepatitis B: A Tunisian prospective study. *Infectious Diseases Now*. 2021; 51:464–469. doi: 10.1016/j.idnow.2020.10.004
39. Fu MX, Simmonds P, Andreani J, Baklan H, Webster M, Asadi R, Golubchik T, Breuer J, Ijaz S, Ushiro-Lumb I, et al. Ultrasensitive PCR system for HBV DNA detection: Risk stratification for occult hepatitis B virus infection in English blood donors. *Journal of Medical Virology*. 2023; 95:e29144. doi: 10.1002/jmv.29144
40. Xiao Y, Cao J, Zhang Z, Zeng C, Ou G, Shi J, Liu Z, Li Y, Deng J, Xu Y, et al. Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Reflecting Viral Replication in Distal Non-tumor Tissues as a Determinant of the Stemness and Recurrence of Hepatocellular Carcinoma. *Front Microbiol*. 2022; 13: doi: 10.3389/fmicb.2022.830741
41. Thio CL, Hawkins C. *Hepatitis B Virus*. În: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, ediția a noua. Elsevier, Philadelphia, 2020; 145:1940-1963.
42. Yardeni D, Chang K-M, Ghany MG. Current Best Practice in Hepatitis B Management & Understanding Long-Term Prospects for Cure. *Gastroenterology*. 2023; 164:42-60.e6.

doi: 10.1053/j.gastro.2022.10.008

43. Roy S, Trautwein C, Luedde T, Roderburg C. A General Overview on Non-coding RNA-Based Diagnostic and Therapeutic Approaches for Liver Diseases. *Front Pharmacol.* 2018; 9:805. doi: 10.3389/fphar.2018.00805
44. Boni C, Janssen HLA, Rossi M, Yoon SK, Vecchi A, Barili V, Yoshida EM, Trinh H, Rodell TC, Laccabue D, et al. Combined GS-4774 and Tenofovir Therapy Can Improve HBV-Specific T-Cell Responses in Patients With Chronic Hepatitis. *Gastroenterology.* 2019; 157:227-241.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2019.03.044
45. Hall JE, Hall ME. *Genetic Control of Protein Synthesis, Cell Function, and Cell Reproduction.* În: Hall JE, Hall ME et al. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, ediția a 14-a. Elsevier, Philadelphia, 2021; 3: 31-47.
46. Yu C, Zhang M, Xiong Y, Wang Q, Wang Y, Wu S, Hussain S, Wang Y, Zhang Z, Rao N, et al. Comparison of miRNA transcriptome of exosomes in three categories of somatic cells with derived iPSCs. *Sci Data.* 2023; 10:616. doi: 10.1038/s41597-023-02493-5
47. Fei D, Wang F, Wang Y, Chen J, Chen S, Fan L, Yang L, Ren Q, Duangmano S, Du F, et al. Circular RNA ACVR2A promotes the progression of hepatocellular carcinoma through mir-511-5p targeting PI3K-Akt signaling pathway. *Mol Cancer.* 2024; 23:159. doi: 10.1186/s12943-024-02074-z
48. Yuan Y, Yuan L, Yang J, Liu F, Liu S, Li L, Liao G, Tang X, Cheng J, Liu J, et al. Autophagy-deficient macrophages exacerbate cisplatin-induced mitochondrial dysfunction and kidney injury via miR-195a-5p-SIRT3 axis. *Nat Commun.* 2024; 15:4383. doi: 10.1038/s41467-024-47842-z
49. Liu J-P, Song S-H, Shi P-M, Qin X-Y, Zheng B-N, Liu S-Q, Ding C-H, Zhang X, Xie W-F, Shi Y-H, et al. miR-541 is associated with the prognosis of liver cirrhosis and directly targets JAG2 to inhibit the activation of hepatic stellate cells. *BMC Gastroenterol.* 2024; 24:84. doi: 10.1186/s12876-024-03174-2
50. Xiong J-L, Wang Y-X, Luo J-Y, Wang S-M, Sun J-J, Xi Q-Y, Chen T, Zhang Y-L. Pituitary-derived small extracellular vesicles promote liver repair by its cargo miR-143-3p. *Sci Rep.* 2024; 14:16635. doi: 10.1038/s41598-024-67434-7
51. Engel A, Ludwig N, Grandke F, Wagner V, Kern F, Fehlmann T, Schmartz GP, Aparicio-Puerta E, Henn D, Walch-Rückheim B, et al. Skin treatment with non-thermal plasma modulates the immune system through miR-223-3p and its target genes. *RNA Biol.* 2024; 21:31–44. doi: 10.1080/15476286.2024.2361571
52. Zhao X, Sun L, Mu T, Yi J, Ma C, Xie H, Liu M, Tang H. An HBV-encoded miRNA

- activates innate immunity to restrict HBV replication. *J Mol Cell Biol.* 2019; 12:263–276. doi: 10.1093/jmcb/mjz104
53. Zhao Q, Sun X, Liu C, Li T, Cui J, Qin C. Expression of the microRNA-143/145 cluster is decreased in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and may serve as a biomarker for tumorigenesis in patients with chronic hepatitis B. *Oncol Lett.* 2018; 15:6115–6122. doi: 10.3892/ol.2018.8117
54. Feng GX, Li J, Yang Z, Zhang SQ, Liu YX, Zhang WY, Ye LH, Zhang XD. Hepatitis B virus X protein promotes the development of liver fibrosis and hepatoma through downregulation of miR-30e targeting P4HA2 mRNA. *Oncogene.* 2017; 36:6895–6905. doi: 10.1038/onc.2017.291
55. Jung YJ, Kim J-W, Park SJ, Min BY, Jang ES, Kim NY, Jeong S-H, Shin CM, Lee SH, Park YS, et al. c-Myc-mediated overexpression of miR-17-92 suppresses replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells. *Journal of Medical Virology.* 2013; 85:969–978. doi: 10.1002/jmv.23534
56. Dong K, Chen Y, Yang G, Liao Z, Zhang H, Liang H, Chen X, Dong H. TGF- β 1 accelerates the hepatitis B virus X-induced malignant transformation of hepatic progenitor cells by upregulating miR-199a-3p. *Oncogene.* 2020; 39:1807–1820. doi: 10.1038/s41388-019-1107-9
57. Chang L, Zhou G, Soufan O, Xia J. miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48:W244–W251. doi: 10.1093/nar/gkaa467
58. miR-Net- a miRNA-centric network visual analytics platform. McGill University, Quebec, Canada. Accesat în 10.04.2024 la <https://www.mirnet.ca/>
59. **Manea M**, Mărunțelu I, Constantinescu I. Extended Analysis on Peripheral Blood Cytokines Correlated with Hepatitis B Virus Viral Load in Chronically Infected Patients- A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Medicine.* 2024; 11. doi: 10.3389/fmed.2024.1429926
60. **Manea M**, Mărunțelu I, Constantinescu I. An In-Depth Approach to the Associations between MicroRNAs and Viral Load in Patients with Chronic Hepatitis B—A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024; 25:8410. doi: 10.3390/ijms25158410
61. **Manea M**, Apostol D, Constantinescu I. A MicroRNA-Based Method for High-Viremia Detection—A New Approach on a Romanian Lot of Chronically Infected Patients with

- Hepatitis B Virus. *Diagnostics*. 2023; 13:3425. doi: 10.3390/diagnostics13223425
62. **Manea M**, Apostol D, Constantinescu I. The Connection between MiR-122 and Lymphocytes in Patients Receiving Treatment for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Microorganisms*. 2023; 11:2731. doi: 10.3390/microorganisms11112731
63. **Manea M**, Mărunțelu I, Constantinescu I. A New Assessment of Two Transferase-Based Liver Enzymes in Low- and High-Fibrosis Patients Chronically Infected with Hepatitis B Virus: A Meta-Analysis and Pilot Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2024; 13:3903. doi: 10.3390/jcm13133903
64. ALTI Flex Reagent cartridge. Dimension Vista System. Bibliotecă documente. Siemens Healthineers. 2024. Accesat în 5.03.2024 la <https://doclib.siemens-healthineers.com/home>
65. AST Flex reagent cartridge. Dimension Vista System. Bibliotecă documente. Siemens Healthineers. 2024. Accesat în 5.03.2024. la <https://doclib.siemens-healthineers.com/home>
66. GGT Flex reagent cartridge. Dimension Vista System. Bibliotecă documente. Siemens Healthineers. 2024. Accesat în 5.03.2024. la <https://doclib.siemens-healthineers.com/home>
67. TBI. Dimension Vista System. Bibliotecă documente. Siemens Healthineers. 2024. Accesat în 5.03.2024. la <https://doclib.siemens-healthineers.com/home>
68. Sysmex XN-1000 Hematology Analyzer Brochure. Sysmex. 2024. Accesat în 5.03.2024 la <https://www.sysmex.com/US/en/products/hematology/xnseries/pages/xn-1000-hematology-analyzer.aspx>
69. CS 2500 System Brochure. Siemens Healthineers. 2024. Accesat în 5.03.2024 la <https://www.siemens-healthineers.com/ro/hemostasis/systems/cs-2500-system>
70. Anti-HBs2 (aHBs2). Sistemele ADVIA Centaur XP și ADVIA Centaur XPT. Siemens Healthineers. 2024. Accesat în 5.03.2024 la <https://doclib.siemens-healthineers.com/home>
71. Quantitative HBsAg (QHBS). ADVIA Centaur XP și ADVIA Centaur XPT Systems. Accesat în 5.03.2024 la <https://doclib.siemens-healthineers.com/home>
72. Antigen e al virusului hepatitei B (HBeAg).Sistemele ADVIA Centaur XP și ADVIA Centaur XPT. Siemens Healthineers. 2024. Accesat în 5.03.2024 la <https://doclib.siemens-healthineers.com/home>
73. HBc Total 2 (HBcT2). ADVIA Centaur XP și ADVIA Centaur XPT Systems. Accesat în 5.03.2024 la <https://doclib.siemens-healthineers.com/home>
74. Hepatitis kits. Anatolia geneworks. 2023. Accesat în 5.03.2024. la <https://www.anatoliageneworks.com/kits/microbiology/hepatitis-kits/>
75. RefFinder. 2024. Accesat în 5.03.2024 la <https://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder->

master/

76. A technical guide to identifying miRNA normalizers using TaqMan Advanced miRNA Assays. Applied Biosystems. Thermofisher. 2016. Accesat în 24.03.2024 la <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/GSD/Reference-Materials/identifying-mirna-normalizers-white-paper.pdf>
77. OpenEPI. 2024. Accesat în 5.03.2024 la https://www.openepi.com/Menu/OE_Menu.htm
78. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. *R Foundation for Statistical Computing*. Vienna, Austria, 2022. Accesat în 5.03.2024 la <https://www.R-project.org/>.
79. Fine JP, Gray RJ. A Proportional Hazards Model for the Subdistribution of a Competing Risk. *Journal of the American Statistical Association*. 1999; 94:496–509. doi: 10.1080/01621459.1999.10474144
80. Lampertico P, Agarwal K, Berg T, Buti M, Janssen HLA, Papatheodoridis G, Zoulim F, Tacke F. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 2017; 67:370–398. doi: 10.1016/j.jhep.2017.03.021
81. Mthethwa L, Parboosing R, Msomi N. MicroRNA levels in patients with chronic hepatitis B virus and HIV coinfection in a high-prevalence setting; KwaZulu-Natal, South Africa. *BMC Infectious Diseases*. 2024; 24:833. doi: 10.1186/s12879-024-09715-0
82. Okamatsu-Ogura Y, Matsushita M, Bariuan JV, Nagaya K, Tsubota A, Saito M. Association of circulating exosomal miR-122 levels with BAT activity in healthy humans. *Sci Rep*. 2019; 9:13243. doi: 10.1038/s41598-019-49754-1
83. Gim J-A, Bang SM, Lee Y-S, Lee Y, Yim SY, Jung YK, Kim H, Kim B-H, Kim JH, Seo YS, et al. Evaluation of the severity of nonalcoholic fatty liver disease through analysis of serum exosomal miRNA expression. *PLoS One*. 2021; 16:e0255822. doi: 10.1371/journal.pone.0255822
84. Segeal O, Dim B, Durier C, Prak S, Chhim K, Vong C, Pech S, Tiv S, Nem B, Hout K, et al. Hepatitis B e Antigen (HBeAg) Rapid Test and Alanine Aminotransferase Level-Based Algorithm to Identify Pregnant Women at Risk of HBV Mother-to-Child Transmission: The ANRS 12345 TA PROHM Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2020; 71:e587–e593. doi: 10.1093/cid/ciaa282
85. Kondo Y, Kogure T, Ninomiya M, Fukuda R, Monma N, Ikeo K, Tanaka Y. The reduction of miR146b-5p in monocytes and T cells could contribute to the immunopathogenesis of hepatitis C virus infection. *Sci Rep*. 2019; 9:13393. doi: 10.1038/s41598-019-49706-9

86. Beudeker BJB, Osmani Z, van Oord GW, Groothuisink ZMA, de Knecht RJ, Hoogenboezem RM, Bindels EMJ, van de Werken HJG, Boonstra A. Association of HBsAg levels with differential gene expression in NK, CD8 T, and memory B cells in treated patients with chronic HBV. *JHEP Reports*. 2024; 6:100980. doi: 10.1016/j.jhepr.2023.100980
87. Liu Y, Qin L, Wang J, Xie X, Zhang Y, Li C, Guan Z, Qian L, Chen L, Hu J, et al. miR-146a Maintains Immune Tolerance of Kupffer Cells and Facilitates Hepatitis B Virus Persistence in Mice. *The Journal of Immunology*. 2022; 208:2558–2572. doi: 10.4049/jimmunol.2100618
88. Fibrosis-4 (FIB-4) Index for Liver Fibrosis. MDCalc, 2024. Accesat în 14.03.2024 la <https://www.cdc.gov/hepatitis/policy/npr/2024/index.htm>
89. Halász T, Horváth G, Pár G, Werling K, Kiss A, Schaff Z, Lendvai G. miR-122 negatively correlates with liver fibrosis as detected by histology and FibroScan. *World J Gastroenterol*. 2015; 21:7814–7823. doi: 10.3748/wjg.v21.i25.7814
90. Bayat A. Bioinformatics. *BMJ*. 2002; 324: 1018–1022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1122955/>
91. Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS, Olivieri F, Procopio AD. Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44:24–44. doi: 10.1093/nar/gkv1221
92. Sticht C, De La Torre C, Parveen A, Gretz N. miRWalk: An online resource for prediction of microRNA binding sites. *PLoS One*. 2018; 13:e0206239. doi: 10.1371/journal.pone.0206239
93. miRWalk 3. Heidelberg University. Heidelberg, Germania. 2017. Accesat în 5.05.2024 la <http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>
94. Kolberg L, Raudvere U, Kuzmin I, Adler P, Vilo J, Peterson H. g:Profiler—interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic Acids Res*. 2023; 51:W207–W212. doi: 10.1093/nar/gkad347
95. g:Profiler. Universitatea din Tartu. Tartu, Estonia, 2005. Accesat în 5.05.2024 la <https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/page/docs>
96. UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res* (2023) 51:D523–D531. doi: 10.1093/nar/gkac1052
97. UniProt. UniProt Consortium. European Bioinformatics Institute. Hinxton, Regatul Unit, 2002. Accesat în 5.05.2024 la <https://www.uniprot.org/id-mapping>
98. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, Gable AL, Fang T, Doncheva NT, Pyysalo S, et al. The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res*. 2023; 51:D638–D646. doi: 10.1093/nar/gkac1000

99. STRING. SIB-Swiss Institute of Bioinformatics. Lausanne, Elveția, 2000. Accesat în 5.05.2024 la <https://www.R-project.org/>.
100. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* 2000; 25:25–29. doi: 10.1038/75556
101. Gene Ontology Consortium, Aleksander SA, Balhoff J, Carbon S, Cherry JM, Drabkin HJ, Ebert D, Feuermann M, Gaudet P, Harris NL, et al. The Gene Ontology knowledgebase in 2023. *Genetics.* 2023; 224: iyad031. doi: 10.1093/genetics/iyad031
102. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:27–30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102409/>
103. Kanehisa M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Science.* 2019; 28:1947–1951. doi: 10.1002/pro.3715
104. Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Kawashima M, Ishiguro-Watanabe M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Research.* 2023; 51:D587–D592. doi: 10.1093/nar/gkac963
105. Milacic M, Beavers D, Conley P, Gong C, Gillespie M, Griss J, Haw R, Jassal B, Matthews L, May B, et al. The Reactome Pathway Knowledgebase 2024. *Nucleic Acids Res.* 2024; 52:D672–D678. doi: 10.1093/nar/gkad1025
106. Kong F, You H, Kong D, Zheng K, Tang R. The interaction of hepatitis B virus with the ubiquitin proteasome system in viral replication and associated pathogenesis. *Virology Journal.* 2019; 16:73. doi: 10.1186/s12985-019-1183-z
107. Lim H-Y, Han J, Yoon H, Jang KL. Tumor Suppressor p53 Inhibits Hepatitis B Virus Replication by Downregulating HBx via E6AP-Mediated Proteasomal Degradation in Human Hepatocellular Carcinoma Cell Lines. *Viruses.* 2022; 14:2313. doi: 10.3390/v14102313
108. Huang F, Guo J, Zhao N, Hou M, Gai X, Yang S, Cai P, Wang Y, Ma Q, Zhao Q, et al. PTEN deficiency potentiates HBV-associated liver cancer development through augmented GP73/GOLM1. *Journal of Translational Medicine.* 2024; 22:254. doi: 10.1186/s12967-024-04976-4
109. Tran BM, Flanagan DJ, Ebert G, Warner N, Tran H, Fifis T, Kastrappis G, Christophi C, Pellegrini M, Torresi J, et al. The Hepatitis B Virus Pre-Core Protein p22 Activates Wnt Signaling. *Cancers (Basel).* 2020; 12:1435. doi: 10.3390/cancers12061435
110. Zheng Y, Zhou Z, Wang G, Tu J, Cheng H, Ma S, Ke C, Wang Y, Jian Q, Shu Y, et al. MiR-122-5p regulates the mevalonate pathway by targeting p53 in non-small cell lung

cancer. *Cell Death Dis.* 2023; 14:234. doi: 10.1038/s41419-023-05761-9

111. Guindi C, Cloutier A, Gaudreau S, Zerif E, McDonald PP, Tatsiy O, Asselin C, Dupuis G, Gris D, Amrani A. Role of the p38 MAPK/C/EBP β Pathway in the Regulation of Phenotype and IL-10 and IL-12 Production by Tolerogenic Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *Cells.* 2018; 7:256. doi: 10.3390/cells7120256

112. Wang S-R, Hu R-D, Ma M, You X, Cui H, He Y, Xu D, Zhao Z-B, Selmi C, Eric Gershwin M, et al. FoxO1 suppresses IL-10 producing B cell differentiation via negatively regulating Blimp-1 expression and contributes to allergic asthma progression. *Mucosal Immunol.* 2022; 15:459–470. doi: 10.1038/s41385-022-00504-z

113. Du Y, Du B, Fang X, Shu M, Zhang Y, Chung H, Sun Y, Teng J, Visalath P, Qiu H, et al. ALT Flare Predicts Hepatocellular Carcinoma Among Antiviral Treated Patients With Chronic Hepatitis B: A Cross-Country Cohort Study. *Front Oncol.* 2021; 10:615203. doi: 10.3389/fonc.2020.615203

Listă lucrări științifice publicate *in extenso* în tema tezei

- 1. **Manea M**, Mărunțelu I, Constantinescu I. Extended Analysis on Peripheral Blood Cytokines Correlated with Hepatitis B Virus Viral Load in Chronically Infected Patients- A Systematic Review and Meta-Analysis. *Frontiers in Medicine*. 2024; 11. doi: 10.3389/fmed.2024.1429926 (menționată în capitolul 4, a stat la baza capitolului 9)
- 2. **Manea M**, Mărunțelu I, Constantinescu I. A New Assessment of Two Transferase-Based Liver Enzymes in Low- and High-Fibrosis Patients Chronically Infected with Hepatitis B Virus: A Meta-Analysis and Pilot Study. *Journal of Clinical Medicine*. 2024; 13:3903. doi: 10.3390/jcm13133903 (menționată în capitolul 4, a stat la baza capitolului 8)
- 3. **Manea M**, Apostol D, Constantinescu I. A MicroRNA-Based Method for High-Viremia Detection—A New Approach on a Romanian Lot of Chronically Infected Patients with Hepatitis B Virus. *Diagnostics*. 2023; 13:3425. doi: 10.3390/diagnostics13223425 (menționată în capitolul 4, a stat la baza capitolelor 5 și 7)
- 4. **Manea M**, Apostol D, Constantinescu I. The Connection between MiR-122 and Lymphocytes in Patients Receiving Treatment for Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Microorganisms*. 2023; 11:2731. doi: 10.3390/microorganisms11112731 (menționată în capitolul 4, a stat la baza capitolului 7)
- 5. **Manea M**, Mărunțelu I, Constantinescu I. An In-Depth Approach to the Associations between MicroRNAs and Viral Load in Patients with Chronic Hepatitis B—A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25:8410. doi: 10.3390/ijms25158410 (menționată în capitolul 4, a stat la baza capitolelor 5 și 9)