



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



---

**TAINÃ SOUZA DO LAGO**

**EXPRESSÃO DE miRNAs ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO  
DE GENES QUE PARTICIPAM DO DANO TECIDUAL  
CAUSADO POR *Leishmania braziliensis***

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



---

**TAINÃ SOUZA DO LAGO**

**EXPRESSÃO DE miRNAs ENVOLVIDOS NA REGULAÇÃO  
DE GENES QUE PARTICIPAM DO DANO TECIDUAL  
CAUSADO POR *Leishmania braziliensis*.**

Professora Orientadora: Léa Cristina Castellucci  
Prof. Co-orientadora: Dra. Dalila Lucíola Zanette

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, na área de concentração em Imunogenética.

**Salvador (Bahia), 2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Lago, Tainã Souza do

Expressão de miRNAs envolvidos na regulação de genes que participam do dano tecidual causado por *Leishmania braziliensis* / Tainã Souza do Lago. -- Salvador, 2018.

110 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Léa Cristina Castellucci.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Dalila Lucíola Zanette

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, 2018.

1. miRNAs. 2. Leishmaniose Tegumentar Americana. 3. Expressão gênica. 4. Dano Tecidual. 5. Imunopatogênese. I. Castellucci, Léa Cristina. II. Zanete, Dalila Lucíola. III. Título.

## COMISSÃO EXAMINADORA

### Membros Titulares:

- 1) *Dra. Deise Souza Vilas Boas* – Professora Adjunta do Departamento de Biomorfologia no Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Tem experiência na área de Biomorfologia e Imunologia, com ênfase no ensino de histologia e pesquisa em histopatologia e imunopatologia, atuando principalmente nos seguintes temas: expressão de genes, microRNAs e proteínas relacionados ao componente imune do microambiente de tumores malignos de cabeça e pescoço.
  
- 2) *Dr. Adriano Queiroz Silva* - Doutor em Imunologia/UFBA, pesquisador do Laboratório Avançado de Saúde Pública do Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz. Pós-doutor na divisão de doenças infecciosas e vacinologia da Universidade da Califórnia, Berkeley, Estados Unidos. Tem experiência em microbiologia, parasitologia e epidemiologia molecular, com ênfase nas doenças infecciosas humanas.
  
- 1) *Dra. Léa Cristina Castellucci* – Pós-doutora em Genética de Doenças Infecciosas pela Universidade de Cambridge. Pesquisador associado do Serviço de Imunologia da Universidade Federal da Bahia e Professora e vice-coordenadora do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Atua principalmente na pesquisa de fatores genéticos do hospedeiro em doenças negligenciadas, especialmente na leishmaniose tegumentar americana e na hanseníase.

### Membro Suplente:

- 1) *Luis Gustavo Carvalho Pacheco* - Doutor em Bioquímica e Imunologia/UFMG, Professor Adjunto de Biologia Molecular e Engenharia Genética no Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Membro da Pós-Graduação em Biotecnologia da UFBA e do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da SBBq. Atua principalmente nos seguintes temas: Genômica Funcional, Expressão Gênica, Biologia Sintética.

*“A grandeza não consiste em receber  
honras, mas em merecê-las”  
Aristóteles.*

*Este trabalho é dedicado aos meus pais **Ednaldo Lago e Neuza Lago**, pelo apoio e amor incondicional que recebo de vocês. Meus sucessos são e serão sempre divididos com vocês, que me instrumentalizaram para que eu possa chegar aonde desejo de modo seguro e amparado. Sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo. Obrigada por estarem ao meu lado de modo tão amoroso e por serem os principais responsáveis por quem eu sou hoje.*

*Agradeço à minha irmã **Jamile**, pela amizade, carinho, incentivo e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Agradeço também aos meus irmãos **Alex e Edney** pela torcida, carinho e apoio.*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

*Agradeço à **profa. Dra. Léa Castellucci**, a oportunidade de tê-la como orientadora. Tenho muito orgulho de citá-la como uma das responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança a mim depositada, pela amizade, conselhos e paciência. Preocupada não só com a realização do trabalho, mas principalmente com o ser humano. Um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Obrigada por ampliar os meus conhecimentos e por respeitar as minhas limitações. Gostaria de ratificar a sua participação, correções e sugestões que permitiram o sucesso deste trabalho. Aprendi a trabalhar em grupo, a respeitar os limites e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir. Seus orientandos sabem que sempre terão uma Profa. amiga e um lugar onde encontrarão apoio e palavras de sabedoria.*

*Muito obrigada pelos ensinamentos que me tem transmitido e que ainda continua a transmitir.*

**“Dar o exemplo não é a melhor maneira de influenciar os outros. É a única.” (Albert Schweitzer)**

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por me abençoar sempre e por colocar pessoas boas no meu caminho.

Ao Prof. **Dr. Edgar Carvalho**, principal exemplo e motivador à pesquisa, meus sinceros agradecimentos e minha profunda admiração. Agradeço pela confiança e pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Serviço de Imunologia.

Ao **Dr. Paulo Machado** pelo suporte, apoio e ensinamentos.

À Profa. **Dalila Lucíola Zanette** pela colaboração inestimável, por todos os ensinamentos, pela acessibilidade e paciência.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular. Agradeço à **Lucas Frederico, Jamile Rêgo, Marcos Braz, Anadilton da Hora e Nadja Lima**, pela convivência extremamente agradável, pelos ensinamentos, colaborações e pelas alegrias que marcaram esses anos.

Aos **colegas do Serviço de Imunologia**, pela agradável convivência e pelas sugestões. Em especial agradeço aos colegas do laboratório de Imunoregulação e do laboratório de Alergia e helmintíases.

À profa. **Dra. Olivia Bacellar** pelo carinho e ensinamentos.

Agradeço também aos amigos **Cristiano, Luiza, Dorival, Orlando e Elisângela**, pelos momentos divididos juntos, pela amizade, apoio e incentivo.

À equipe da área endêmica pela colaboração e contribuições. Agradeço em especial à **Ednaldo Lago** pelo suporte na área endêmica e pela realização da coleta de sangue. Agradeço também à **Neuza Lago, Juliana Almeida e Silvana Conceição** pela realização das biópsias e **Maria Odônio** pelo suporte no Posto de Corte de Pedra.

Agradeço ao colega **Augusto Carvalho** pela paciência, ensinamentos e sua dedicação na análise estatística dos dados.

Aos **pacientes** da área endêmica, por colaborarem com a nossa pesquisa de forma tão generosa.

Aos **professores e funcionários** do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

As **fontes de fomento** pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de mestrado. É como disse Vinícius de Moraes: *“Você não faz amigos, você os reconhece”*.

**Muito Obrigada!**



**FONTES DE FINANCIAMENTO**

- **NIH** - National Institute of Health (Grant P50AI30639-16 e R03AI067663-02)
- **PPSUS** – Programa de Pesquisa para o SUS

## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE TABELAS</b>	13
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	14
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	15
<b>I. RESUMO</b>	18
<b>II. OBJETIVO</b>	19
<b>II.1. Principal</b>	19
<b>II.2. Secundários</b>	19
<b>III. INTRODUÇÃO</b>	20
<b>IV. REVISÃO DA LITERATURA</b>	22
<b>IV.1. Definição e epidemiologia das leishmanioses</b>	22
<b>IV.1.1. A área endêmica de Corte de Pedra-Ba</b>	24
<b>IV. 2. Ciclo do parasita</b>	26
<b>IV. 3. Aspectos clínicos e imunológicos</b>	29
<b>IV. 4. MicroRNAs estrutura e função</b>	32
<b>IV.5. Implicações patológicas da desregulação de miRNAs</b>	37
<b>IV.5.1.miRNAs em doenças inflamatórias e neurodegenerativas</b>	38
<b>IV.5.2.miRNAs em doenças infecciosas, parasitárias e Leishmaniose</b>	41
<b>V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS</b>	45
<b>V.1. Aspectos bioéticos</b>	45
<b>V.2. Seleção de pacientes e controles</b>	45
<b>V.3. Coleta de biópsias</b>	46
<b>V.4. Obtenção do plasma</b>	46
<b>V.5. Método <i>in silico</i> para predição dos alvos</b>	46
<b>V.6. Extração do RNA</b>	47
<b>V.6.1. RNA de pele</b>	47
<b>V.6.2. RNA do plasma</b>	48
<b>V.7. Síntese de DNA complementar (cDNA)</b>	49
<b>V.8. Avaliação da expressão de miRNAs por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR).</b>	50
<b>V.9. Delineamento do estudo</b>	51
<b>V.10. Análise estatística</b>	51
<b>V.11. Fluxograma ilustrativo do estudo</b>	52
<b>VI. RESULTADOS GERAIS</b>	53
<b>VI.1. Características clínico-epidemiológicas da população estudada</b>	53
<b>VI.2. Resultados do objetivo 1</b>	54
<b>VI.3. Resultados do objetivo 2</b>	57
<b>VI.4. Resultados do objetivo 3</b>	60
<b>VI.5. Resultados do objetivo 4</b>	60

<b>VII. DISCUSSÃO</b>	69
<b>VIII. CONCLUSÕES</b>	74
<b>IX. SUMMARY</b>	75
<b>X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	76
<b>XI. ANEXOS</b>	88
<b>XI.1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b>	88
1. The miRNA 361-3p, a regulator of GZMB and TNF is associated with therapeutic failure and longer time healing of cutaneous leishmaniasis caused by <i>L. (Viannia) braziliensis</i> .	89

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Número de casos de LTA entre 2012-2017 na área endêmica de LTA	25
<b>Tabela 2.</b> Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea que curaram ou falharam na terapia com antimonial pentavalente.	54
<b>Tabela 3.</b> Lista dos miRNAs selecionados para análise por qPCR e seus respectivos genes alvo.	55
<b>Tabela 4.</b> Região de ligação dos miR-361-3p, 103a-2-5p e 205-3p aos seus respectivos genes alvos.	56
<b>Tabela 5.</b> Valores obtidos na análise de curva ROC	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição geográfica da Leishmaniose Cutânea no mundo	23
<b>Figura 2.</b> Mapa de localização da área endêmica de LTA	25
<b>Figura 3.</b> Formas alternativas de <i>Leishmania spp</i>	27
<b>Figura 4.</b> Ciclo Evolutivo da <i>Leishmania spp</i>	29
<b>Figura 5.</b> Biogênese dos miRNAs	36
<b>Figura 6.</b> Comparação da expressão relativa dos miRNAs 361-3p e 140-3p em amostras de pele lesionada e amostras de pele normal de pacientes com LC.	58
<b>Figura 7.</b> Comparação da expressão relativa dos miRNAs 103a-2-5p e 205-3p em biópsias de pele lesionada e amostras de pele normal de pacientes com LC.	59
<b>Figura 8.</b> Associação entre o número de cursos de antimonial pentavalente e expressão do miR-361-3p.	61
<b>Figura 9.</b> Análise de correlação de Spearman entre a expressão relativa dos miRNAs 3613p, 140-3p, 103a-2-5p e 205-3p com o número de cursos de Sbv.	62
<b>Figura 10.</b> Análise de correlação de Spearman entre a expressão relativa dos miRNAs 3613p, 140-3p, 103a-2-5p e 205-3p com o tempo de cura após o início do tratamento.	63
<b>Figura 11.</b> Análise de correlação de Spearman entre a expressão relativa dos miRNAs 3613p, 140-3p, 103a-2-5p e 205-3p com a área da lesão.	64
<b>Figura 12.</b> Análise de correlação de Spearman entre a expressão relativa dos miRNAs 3613p, 140-3p, 103a-2-5p e 205-3p com a área da IDRM.	65
<b>Figura 13.</b> Análise de correlação de Spearman entre a expressão relativa dos miRNAs 3613p, 140-3p, 103a-2-5p e 205-3p com o número de lesões ulceradas.	66
<b>Figura 14.</b> Análise de sobrevida de <i>Kaplan-Meier</i> diferenciando o tempo de cicatrização de acordo com os valores de expressão do miR-361-3p.	67
<b>Figura 15.</b> Expressão relativa do miR-361-3p na lesão prediz falha terapêutica em pacientes com LC.	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>3'UTR</b>	Do inglês: <i>3' untranslated region</i> / região 3' não-traduzida
<b>AGO2</b>	Argonauta 2
<b>CA</b>	Antígeno carboidrato
<b>CCL</b>	Do inglês: <i>chemokine ligand</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CEA</b>	Antígeno carcinoembrionário
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CONEP</b>	Comissão Nacional de Ética e Pesquisa
<b>Ct</b>	Do inglês: <i>cycle threshold</i> / limiar de ciclo
<b>CXCL</b>	Ligante de quimiocinas
<b>CXCR</b>	Do inglês: <i>Motif chemokine receptors</i>
<b>CYP27B1</b>	Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1
<b>DA</b>	Dermatite atópica
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer
<b>DC</b>	Doença de Crohn
<b>DNA</b>	Do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i> / ácido desoxirribonucleico
<b>DROSHA</b>	Ribonuclease III
<b>dsRNA</b>	Do inglês: <i>double-stranded RNA</i> / RNA de cadeia dupla
<b>EDTA</b>	Do inglês: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> / Ácido etileno diamino tetracético
<b>ES</b>	Esclerose sistêmica
<b>Exp-5</b>	Exportina-5
<b>FLG</b>	Filagrina
<b>gp63</b>	Glicoproteína 63
<b>HEMOBA</b>	Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia
<b>hsa-miR</b>	Nomenclatura para miRNAs, <i>Homo sapiens</i> miRNA
<b>HTLV</b>	Vírus T- Linfotrópico Humano
<b>IDRM</b>	Intradermorreação de Montenegro
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRF9</b>	Do inglês: <i>Interferon regulatory fator 9</i>
<b>IM</b>	Infarto do miocárdio

<b>JAK</b>	Receptor <i>Janus Kinase</i>
<b>KRT</b>	Queratina
<b>LC</b>	Leishmaniose Cutânea
<b>LCA</b>	Leishmaniose Cutânea Atípica
<b>LD</b>	Leishmaniose Disseminada
<b>LLC</b>	Leucemia Linfocítica Crônica
<b>LM</b>	Leishmaniose Mucosa
<b>LTA</b>	Leishmaniose Tegumentar Americana
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>MEC</b>	Substratos de Matriz Extracelular
<b>miR</b>	MiRNA
<b>miRNA</b>	MicroRNA
<b>miRNA-RISC</b>	Complexo de Silenciamento por microRNAs
<b>mRNA</b>	Do inglês: <i>messenger RNA</i> / RNA mensageiro
<b>NIH</b>	National Institute of Health
<b>NK</b>	Do inglês: <i>Natural Killer Cell</i>
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>PBMC</b>	Célula Mononuclear do Sangue Periférico
<b>PCR</b>	Do inglês: <i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em cadeia da polimerase
<b>Pré-miR</b>	miRNA precursor
<b>Primer</b>	Oligonucleotídeo iniciador
<b>Pri- miRNA</b>	miRNA primário
<b>RISC</b>	Do inglês: <i>RNA-induced silencing complex</i> / Complexo de Silenciamento por RNAs
<b>qRT-PCR</b>	Do inglês: <i>Real Time Quantitative PCR</i> / Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
<b>RCU</b>	Retocolite Ulcerativa
<b>RNase</b>	Ribonuclease
<b>RNA-seq</b>	RNA sequencing
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>STAT</b>	Do inglês: <i>Signal transducer and Activator of transcription</i>
<b>spp</b>	Espécies
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>Th1</b>	T helper 1

<b>TLR</b>	Do inglês: <i>Toll-like receptors</i> / receptores do tipo Toll
<b>TNF</b>	Do inglês: <i>transforming growth factor</i> / Fator de Necrose Tumoral
<b>WHO</b>	Do inglês: <i>World Health Organization</i>



## I. RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* e está entre as endemias com maior impacto em saúde pública, devido à sua distribuição globalizada e limitações referentes ao diagnóstico, tratamento e controle em áreas endêmicas. Nos últimos anos, estudos tem mostrado a capacidade de *Leishmania spp* alterar o transcriptoma de células e tecidos infectados, modulando a expressão de RNAs codificantes e não codificantes do hospedeiro. **OBJETIVO:** Avaliar em pele e plasma a expressão de miRNAs reguladores de genes super expressos em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) causada por *Leishmania braziliensis*. **MÉTODOS:** Foram obtidas duas biópsias de pele de vinte e cinco pacientes com LC infectados por *L. braziliensis* (pele lesionada e pele sadia) e doze amostras de plasmas de indivíduos com LC e controles saudáveis. Para extração do RNA de pele e plasma utilizamos os métodos do *TRIzol* e o kit comercial *MagMAX™ mirVana™ (Thermo Fisher)*, respectivamente. Para obtenção de DNA complementar (cDNA) utilizamos o kit comercialmente disponível *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher)*. Os níveis de expressão de miRNAs em biópsias cutâneas e plasma foram detectados por qRT-PCR usando ensaios *TaqMan®* pré-desenhados (*Thermo Fisher*). Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para comparação dos dados de pele com LC e normal, além de correlação de *Spearman*, análise de sobrevivência pelo método de *Kaplan-Meier* e curva *ROC* utilizando o *software GraphPad Prism 5* para avaliação entre o perfil de expressão dos miRNAs e os parâmetros clínicos avaliados. **RESULTADOS:** Não observamos expressão dos miRNAs selecionados no plasma. Em relação às biópsias, dos quatorze miRNAs testados, quatro mostraram expressão nos tecidos: miR-361-3p, -103a-2-5p, -140-3p e -205-3p. Os miRNAs miR-361-3p e -140-3p foram significativamente mais expressos nas lesões de LC quando comparados a amostras de pele normal, ( $p=0,0001$  e  $p<0,0001$ , respectivamente). Em adição, observamos uma associação entre a expressão do miR-361-3p e falha terapêutica ( $p=0,0071$ ) e correlação direta entre a expressão do miR-361-3p e com um maior tempo de cura das lesões nos pacientes avaliados ( $r=0,5$  e  $p=0,007$ ). Adicionalmente, análises complementares mostraram que o miR-361-3p é capaz de identificar com boa sensibilidade (81,2%) e especificidade (100%) pacientes que tendem a falhar ao tratamento inicial com SbV (área sob a curva *ROC* 0,95;  $p=0,006$ ). Finalmente, a curva de sobrevivência levando o tempo de cura como desfecho mostrou que quanto maior a expressão do miR-361-3p, maior o tempo de cicatrização das úlceras de LC. **CONCLUSÕES:** O miR-361-3p e miR-140-3p possuem um perfil de expressão diferenciado nas lesões de LC em relação à pele normal de pacientes infectados por *L. braziliensis*, mostrando que a regulação de miRNAs é importante na patogênese da LC; O miR-361-3p foi correlacionado com falha terapêutica e com maior tempo de cura da doença, evidenciando o seu potencial como biomarcador de prognóstico na LC causada por *L. braziliensis*.

**Palavras-chave:** 1. miRNAs; 2. Leishmaniose Tegumentar Americana; 3. Expressão gênica; 4. Dano tecidual; 5. Imunopatogênese

## **II. OBJETIVOS**

### **II.1. PRINCIPAL**

Avaliação de miRNAs candidatos envolvidos no controle de genes super expressos em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) causada por *L. braziliensis*.

### **II.2. SECUNDÁRIOS**

- ✓ Identificar miRNAs reguladores de genes super expressos em biópsias de LC em uma análise de transcriptoma em pacientes provenientes da área endêmica de Corte de Pedra-BA.
- ✓ Avaliar a expressão de miRNAs candidatos em biópsias de pele de pacientes com leishmaniose cutânea clássica (LC) e em amostras de pele normal obtidas do mesmo paciente.
- ✓ Avaliar a expressão de miRNAs candidatos no plasma de pacientes com LC e doadores sadios.
- ✓ Correlacionar a expressão de miRNAs com os parâmetros clínicos de pacientes com LC (enduração do teste Montenegro, tamanho da lesão, números de lesões, tempo de cura, falha terapêutica).

### III. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania spp*, parasitas intracelulares obrigatórios de mamíferos. A maioria destes parasitas se albergam dentro de macrófagos de tecidos infectados, porém outros tipos células tais como as células dendríticas, linfócitos e neutrófilos participam na patogênese desta doença. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) causada por *L. braziliensis* pode causar desde a leishmaniose cutânea (LC), associada a uma ou mais úlceras granulomatosas, até as debilitantes formas disseminada (LD) ou mucosa (LM) da doença (Marsden *et al.*, 1985; Schriefer *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2012)

Não há vacinas contra a leishmaniose, fazendo de novas abordagens para desenvolver a base molecular para vacinas ou novos alvos farmacológicos uma área crucial de continuidade em pesquisa básica e aplicada. A análise do transcriptoma por meio de técnicas avançadas como microarranjos e RNA-seq tem ajudado a elucidar as redes compostas por genes cuja expressão é crítica no processo de interação parasita-hospedeiro. Novais *et al.*, 2014, utilizando análise transcricional em larga escala, analisou diferenças no padrão de expressão gênica entre amostras de lesão de LC e de pele normal de pacientes infectados por *L.braziliensis* e identificou genes associados com o desenvolvimento de lesões e função da resposta imune Th1, tais como as quimiocinas CXCL-9 e CXCL-10. Análise de função *in silico* mostrou que genes associados à ativação do inflamassoma, através da produção de IL-1 $\beta$  e vários genes à jusante de INF- $\gamma$  foram positivamente regulados, o que pode contribuir para o dano tecidual extenso observado na doença. Em contraste, os genes mais negativamente regulados foram associados com manutenção da função da barreira epidérmica.

Os microRNA (miRNAs) são RNAs não codificantes compostos por uma sequência de cerca de 22 nucleotídeos que atuam como reguladores pós-transcricionais

por meio da interferência no processamento e estabilidade dos RNAs codificantes de proteínas e na maquinaria de transcrição (Bartel *et al* 2004; Cowland *et al.*, 2007). Desde a sua identificação, os miRNAs vem sendo associados a diversos processos biológicos e patológicos, tendo sido relacionados a diversas doenças inflamatórias e infecciosas (Cowland *et al.*, 2007; Jinnin *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014; Chowdhari *et al.*, 2017; Ono *et al.*, 2017). No entanto, em leishmaniose, poucos são os trabalhos publicados. Em especial destaca-se os dados de Lemaire *et al.*, 2013 que mostrou alterações na expressão de miRNAs em macrófagos infectados por *L. major*, sendo alguns destes miRNAs envolvidos na ativação de monócitos através da sinalização de TLRs. Em adição, Geraci *et al.*, 2015 mostraram que diferentes espécies de *Leishmania* ativam um perfil diferenciado de expressão de miRNAs espécie-específica, sendo alguns destes associados a vias importantes como JAK-STAT e TGF- $\beta$ . Mais recentemente, alguns miRNAs foram correlacionados com uma boa resposta ao tratamento da leishmaniose cutânea humana causada por *Leishmania braziliensis* (Nunes *et al.*, 2018)

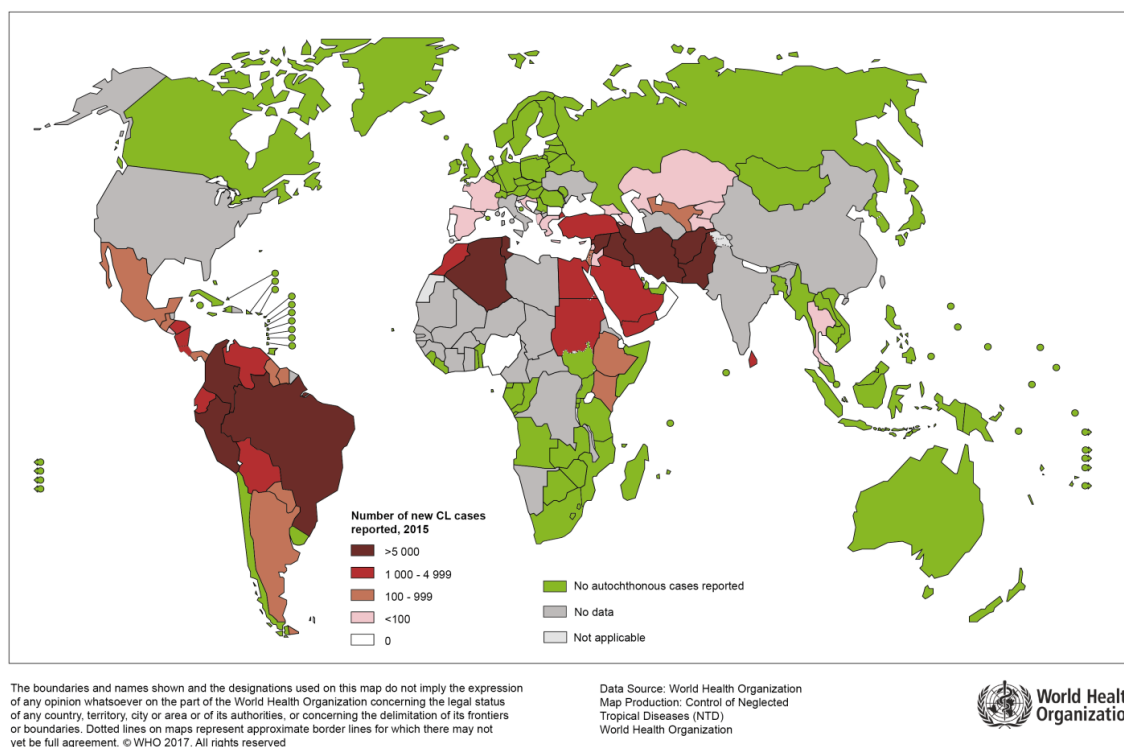
O objetivo deste estudo é investigar a expressão de miRNAs envolvidos na regulação de genes relacionados à imunopatogênese de leishmaniose cutânea. Os resultados de nossa pesquisa podem ajudar a identificar reguladores de moléculas chave na resposta imune da doença, assim como modificadores da resposta ao tratamento. Nossos resultados em última instância podem servir como ferramenta para identificação de novos alvos para drogas ou reaproveitamento de drogas embora reconhecendo que o desdobramento deste, assim como novos estudos são necessários para o avanço desta área.

## IV. REVISÃO DE LITERATURA

### IV.1. Definição e epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses constituem um complexo grupo de doenças de caráter zoonótico causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. São protozoários que têm ampla distribuição geográfica, transmitidos ao hospedeiro vertebrado por flebotomíneos infectados. A depender da região, estes insetos são conhecidos como mosquito palha, tatuquira, birigui, dentre outros (Desjeux *et al.*, 1996; Pearson *et al.*, 1996)

A doença representa uma das seis endemias parasitárias mais importantes no mundo sendo considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma doença negligenciada, pelo seu alto coeficiente de detecção, capacidade de produzir deformidades e pela ineficiência das ações de controle (WHO, 1990, 2015; Alvar *et al.*, 2012; Reveiz *et al.*, 2013). Considerada um grande problema de saúde pública, a leishmaniose ocorre em 98 países, afetando grande parte do continente americano, Ásia, África, Europa e Oriente Médio, **Figura 1** (Alvar *et al.*, 2012). A OMS estima uma incidência total de 1,6 milhões de novos casos por ano. Destes, 0,5 milhão são casos de LV e 1,2 milhões são casos da LTA. Em dez anos, o número de casos de LV no Brasil reduziu 9%, passando de 3.597 casos, em 2005, para 3.289 casos, em 2015. Com relação à LTA, nesse período houve uma redução de 27%, passando de 26.685 casos em 2005 para 19.395 casos em 2015. Em 2015, a região Nordeste registrou o maior número de casos de LV (1.806), seguida pelas regiões Sudeste (538); Norte (469); Centro-Oeste (157); e Sul (5). Em relação à LTA, a região Norte registrou o maior número de casos (8.939); seguida do Nordeste (5.152); Centro-Oeste (2.937); Sudeste (1.762); e Sul (493) (Brasil, 2017).



**Figura 1. Distribuição geográfica da Leishmaniose Cutânea no mundo.** A LTA É Endêmica em 98 países, afetando principalmente grande parte do continente americano, Ásia, África, Europa e Oriente Médio. A OMS estima uma incidência de 1,2 milhões de casos por ano. No Brasil foram registrados 19.395 casos em 2015 **Fonte: OMS/2015.**

Cerca de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Brasil, Nepal e Etiópia (Alvar *et al.*, 2012). No Novo Mundo a principal forma da leishmaniose é a LTA, que se apresenta sob as formas clínicas: Leishmaniose cutânea (LC), Mucosa (LM), Leishmaniose Disseminada (LD) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (Marsden *et al.*, 1985; Carvalho *et al.*, 2012). Os dez países com maior número de casos estimados de leishmaniose tegumentar são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru, que são os responsáveis por aproximadamente 70-75% da incidência global da doença (Alvar *et al.*, 2012).

No Brasil, devido ao aumento das atividades rurais e movimentos migratórios, a doença se espalhou por diferentes regiões, colocando o país entre os sete que concentram 90% dos casos de leishmaniose no mundo, com registro de casos em todas as regiões

brasileiras (Brasil, 2017). Apesar do crescente número de estudos sobre a leishmaniose nas últimas décadas e do crescente conhecimento de sua patogênese, pouco se avançou em medidas de controle e tratamento da doença. Em adição, não há uma vacina que garanta proteção a longo tempo que possa imunizar de forma segura populações expostas.

#### **IV.1.1. A área endêmica de Corte de Pedra-Ba**

Uma importante área endêmica de LTA encontra-se no sudeste do estado da Bahia, na região do município de Presidente Tancredo Neves, situado a 280 km de Salvador. Nesse local está localizada a vila de Corte de Pedra, reconhecida como uma das mais importantes áreas de transmissão de *L. braziliensis* no Brasil. A área é caracterizada por vegetação característica da Mata Atlântica secundária, abrangendo 10.000 Km<sup>2</sup> de área geográfica com cerca de vinte cidades circunvizinhas de população com atividade econômica predominantemente rural, **Figura 2**.

Assim, pacientes desta área endêmica têm sido acompanhados no Posto de Saúde, que se tornou o centro de referência para o tratamento e diagnóstico da doença na região. Desde então, médicos do Serviço de Imunologia e médicos da Universidade Federal da Bahia (UFBA) incluindo clínicos, imunologistas, infectologistas, dermatologistas e otorrinolaringologistas trabalham quinzenalmente no posto de saúde. Recentemente, foram notificados entre 2012-2017, 6.597 casos de LTA na área endêmica de Corte de Pedra, conforme detalhado na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Número de casos de LTA entre 2012-2017 na área endêmica de LTA

ANO	NÚMERO DE CASOS
2012	1.858
2013	974
2014	727
2015	781
2016	873
2017	1.384

SINAN (<http://sinan.saude.gov.br>)



**Figura 2. Mapa de localização da área endêmica de LTA.** A área é caracterizada por vegetação característica da Mata Atlântica secundária, abrangendo 10.000 Km<sup>2</sup> de área geográfica com cerca de vinte municípios que perfazem esta área endêmica de LTA (verde) localizado no sudeste do estado da Bahia situado a 280Km de Salvador.

Há cerca de 30 anos diversos estudos vêm sendo conduzidos nesta área e conta com o apoio da equipe médica e pesquisadores do Serviço de Imunologia da UFBA. Estes estudos forneceram importantes avanços na compreensão da Imunopatogênese da doença e documentaram um aumento do número de casos mais graves, uma diminuição da eficácia do antimonial pentavalente, mudanças demográficas na área (Turetz *et al.*, 2002;

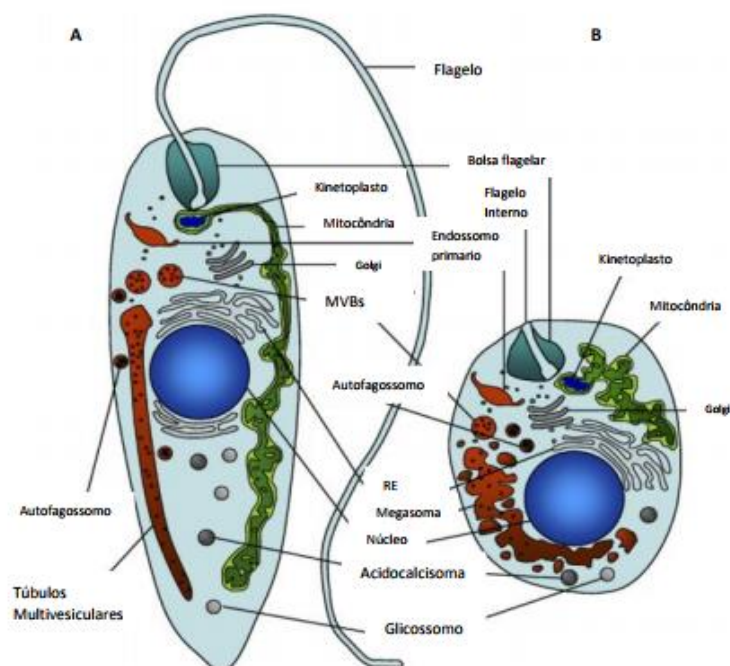


Guimarães *et al.*, 2009), e estabeleceram novos tipos de terapias para LTA (Almeida *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2010). Os estudos realizados nesta área também determinaram a incidência de LC e LM, e descreveram o aumento de formas clínicas emergentes de LTA causadas pela infecção por *Leishmania braziliensis*, tais como a LD e a LCA (Costa *et al.*, 1986; Morgan *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2011).

#### IV. 2. Ciclo do parasita

O ciclo biológico da *Leishmania* é do tipo heteroxênico, passando o parasito por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado, e outra extracelular no inseto vetor. Predominam, respectivamente, as formas amastigotas e promastigotas nestes ciclos, conforme mostrado na **Figura 3**.

Os vetores responsáveis pela transmissão são mosquitos do grupo dos flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Em particular, nas Américas, a transmissão é realizada pelo gênero *Lutzomyia*, onde, já foram descritas cerca de 350 espécies (Basano *et al.*, 2004; Negrão *et al.*, 2009). As principais espécies transmissoras da LTA no Brasil são: *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e *Lu. migonei* (Medeiros *et al.*, 1999; Gontijo *et al.*, 2003). Os flebotomíneos podem ser encontrados em ambientes silvestres, rurais e urbanos, além de se adaptar em condições climáticas diversificadas. De modo geral, possuem hábitos noturnos, entretanto, algumas espécies podem apresentar hábitos diurnos no interior de matas. As modificações em zonas de matas e/ou rurais têm proporcionado uma adaptação destes vetores em domicílios e áreas periurbanas, fazendo com que a disseminação da doença se propague em regiões endêmicas (Cupolillo *et al.*, 2003). Os hábitos de vida da população também exerce um grande papel na transmissão da doença.

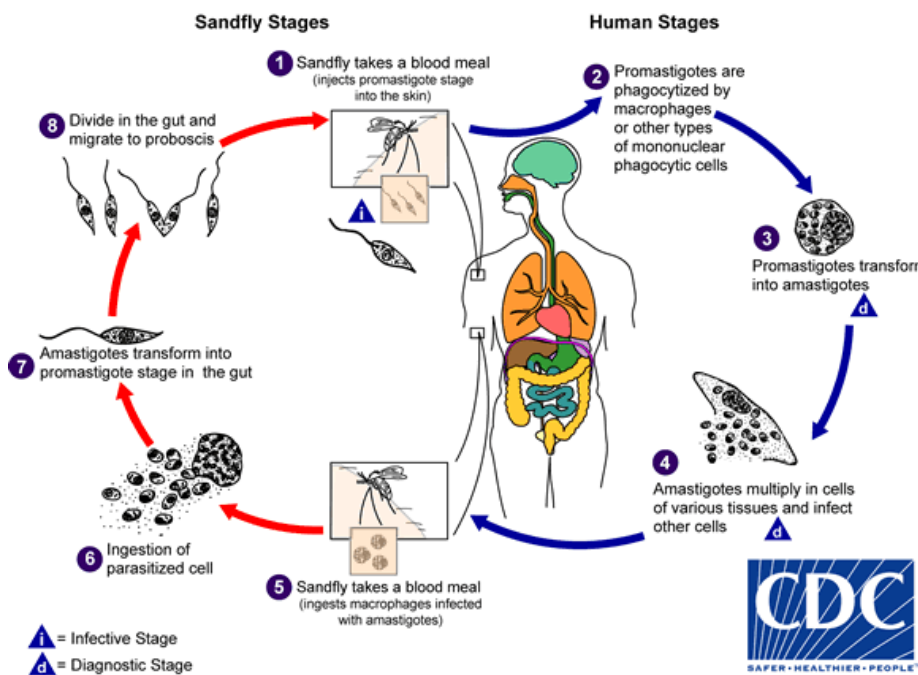


**Figura 3. Formas alternativas de *Leishmania* spp.** Representação esquemática das principais organelas intracelulares das formas promastigotas (A) e amastigotas (B). As formas promastigotas estão situadas no trato digestivo e intestinal dos flebotomíneos, apresentando contorno alongado, presença de flagelo, citoplasma com pequenos vacúolos e núcleo apresentando posições variadas. As formas amastigotas são encontradas em células do sistema fagócito mononuclear apresentando formato ovoide ou esférico, citoplasma com presença de vacúolos, um único núcleo, cinetoplasto e rudimento flagelar (Medeiros et al., 1999) **Fonte: figura “adaptada de Besteiro et al, 2007”.**

De forma geral, o flebotomíneo ao fazer o repasto sanguíneo em indivíduos infectados ingere as formas amastigotas encontradas nos macrófagos infectados, que se convertem em promastigotas no intestino do vetor após sucessivos processos de multiplicação por divisão binária. As formas promastigotas se transformam em promastigotas metacíclicos, a forma infectante, através de um processo denominado metaciclogênese. Estas formas migram para a faringe e cavidade bucal do inseto, aptas a penetrarem nas células dos hospedeiros vertebrados no próximo repasto sanguíneo do vetor conforme ilustrado na **Figura 4** (Brasil, 2007).

O flebótomo fêmea infectado, ao fazer a hematofagia no hospedeiro vertebrado, regurgita as formas promastigotas juntamente com a saliva. A saliva deste inseto apresenta um papel importante na infectividade das formas promastigotas, pois funciona

como vasodilatador e imunossupressor da resposta do hospedeiro vertebrado. Após a penetração, as promastigotas metacíclicas penetram nas células do sistema fagocitário mononuclear (célula alvo) por um processo de fagocitose mediada por receptores e ligantes na superfície dos macrófagos (Ribeiro *et al.*, 1987; Titus & Ribeiro., 1990). No interior dessas células, as promastigotas se transformam em amastigotas envolvidas pelo vacúolo parasitóforo, que as separa do citoplasma celular. Os parasitos, dentro dos macrófagos, se multiplicam por divisão binária no interior dos vacúolos fagocitários. Após a lise dos macrófagos as formas amastigotas são liberadas, sendo novamente fagocitadas por outros macrófagos, dando continuidade ao processo infeccioso conforme mostrado na **Figura 4** (Person & Sousa, 1995; Medeiros & Roselino., 1999; Brasil., 2007).



**Figura 4. Ciclo Evolutivo da *Leishmania* spp.** Ciclo de vida da *Leishmania* sp. no hospedeiro vertebrado. **1.** Ao realizar repasto sanguíneo o flebotômio fêmea infectado inocula promastigotas na pele; **2.** Promastigotas são internalizados por células fagocitárias; **3.** Promastigotas se transformam em amastigotas; **4.** Os amastigotas se replicam nas células fagocitárias e eventualmente levam ao rompimento da mesma, podendo infectar outras células fagocíticas; **5.** O flebotômio fêmea se alimenta de sangue do hospedeiro infectado; **6.** Ingestão de células parasitadas; **7.** As células infectadas (geralmente macrófagos) passam para o intestino do flebotômio e se transformam em formas promastigotas; **8.** Os promastigotas se dividem e se transformam na forma metacíclica infectante, migrando para a proboscideia do flebotômio.

#### IV. 3. Aspectos clínicos e imunológicos

Dentro das manifestações clínicas da LTA, a mais frequente é a LC, considerada a forma clássica da doença. Nesta forma clínica, um dos primeiros sinais após a infecção por *L. braziliensis* é a presença da linfadenopatia e a formação de uma pápula seguida de uma exulceração no local da inoculação do parasito (Barral *et al.*, 1992). A úlcera leishmaniótica caracteristicamente possui fundo granulomatoso e bordas elevadas (Carvalho *et al.*, 1995; Pearson *et al.*, 1996). Esta úlcera na maioria das vezes pode apresentar um tempo de cura prolongado, e, em alguns casos, apresentar cura espontânea (Barral *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1995). A resposta imune em LC é complexa, apresentando uma forte resposta inflamatória, tipicamente Th1, com linfoproliferação

importante e produção de citocinas e quimiocinas próinflamatórias que contribuem para a patogênese da doença (Bottrel *et al.*, 2001; Bacellar *et al.*, 2002; Follador *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012). Nesse processo destacam-se as citocinas IFN- $\gamma$ , TNF, IL1 $\beta$  e IL-12, além de quimiocinas como CCL2, CXCL-9 e CXCL-10. Já é bem documentada a produção do IFN- $\gamma$  pelos macrófagos como importante mecanismo de morte do parasita (Carvalho *et al.*, 1995; Kaye *et al.*, 2011). Em adição, a produção de TNF e de óxido nítrico (NO) são também fatores chave no controle da infecção por *Leishmania* (Murray *et al.*, 1983; Bogdan *et al.*, 2000). A LM se desenvolve possivelmente como uma complicação da LC, com parasitas disseminando por via hematogênica para o trato das mucosas. Prevalente em 3 a 5% dos casos ocorre concomitantemente ou mesmo após anos de cura da LC (Weigle *et al.*, 1996; Blum *et al.*, 2004; Machado-Coelho *et al.*, 2005). A LM começa com eritema e ulcerações nas narinas, e pode evoluir para perfuração do septo nasal e lesões inflamatórias destrutivas, podendo obstruir a faringe ou a laringe e levar a desfigurações marcantes caso não tratada (Franke *et al.*, 1990). Nesta forma da doença a exacerbação da resposta imune é ainda maior ao que se observa na LC clássica.

Nas formas cutânea e mucosa da LTA a despeito de existir uma resposta protetora, o desbalanço imune leva à evolução da doença. Indivíduos com LC e LM produzem concentrações altas de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6 e NO (Ribeiro de Jesus *et al.*, 1998; Bacellar *et al.*, 2002), porém em vez de controlar a infecção, os indivíduos susceptíveis desenvolvem uma inflamação exacerbada que concorre para o dano tecidual observado nas úlceras cutâneas e mucosas. Todo esse processo é coordenado pelo recrutamento e atividade de macrófagos, células NK, células TCD4+ e TCD8+. Em adição, a produção de citocinas reguladoras como TGF- $\beta$  e, principalmente IL-10, é menor nestas formas clínicas da doença (Bacellar *et al.*, 2002). Várias evidências apontam para a citotoxicidade como um

mecanismo imune que favorece uma resposta protetora (Brodszyn *et al.* , 1997; Faria *et al.* , 2009). Em adição, estudos revelaram a presença de células T CD8+ associada a dano tecidual na leishmaniose mucocutânea devido a uma resposta inflamatória destrutiva e um número elevado de células citotóxicas no sangue (Novais *et al.* , 2013, 2014 e 2017; Santos *et al.* , 2013). Recentemente, Novais *et al.*, 2017 mostrou que em lesões de pacientes infectados por *L. braziliensis*, a ativação do inflammasoma gera IL-1 $\beta$ , o que promove o aumento da inflamação, estimulando a produção de quimiocinas e também metaloproteinases de matriz, que degradam a matriz extracelular levando ao dano tecidual.

Além das citocinas inflamatórias citadas, a participação de quimiocinas como CXCL-10 e seu receptor CXCR3 já foi documentada. De fato, estas quimiocinas tem sido implicados na patogênese das lesões leishmanióticas (Vargas-Inchaustegui *et al.*, 2010).

A LD é uma forma emergente da doença causada pela infecção por *Leishmania braziliensis*, que se distingue das demais formas clínicas por suas características clínicas e imunológicas exclusivas (Costa *et al.*, 1986; Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002). Caracterizada pela presença de um grande número de lesões cutâneas que abrange mais de uma área do corpo com tipos variados de lesões na pele (papulares, nodulares, ulceradas) e uma alta frequência de envolvimento mucoso (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002). O paciente tende a apresentar uma lesão única inicial, geralmente nas extremidades, seguida da disseminação que pode envolver todo o corpo, por vezes, associada com febre e calafrios. A importância da LD é delineada pela gravidade da doença, terapêutica desafiadora pelo alto grau de refratariedade e aumento da prevalência (Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002). A LD em comparação com a LC, tem sido associada com menor produção de IFN- $\gamma$  e TNF, maior produção de IL-10

(Turetz *et al.*, 2002) e anticorpos anti-Leishmania, com resposta de células T variável entre indivíduos afetados (Carvalho *et al.*, 1994).

Casos de LCA também estão emergindo na área endêmica de Corte de Pedra. São definidos como indivíduos que não preenchem os critérios de LC, LM e LD e claramente não apresentam fatores predisponentes, como imunossupressão (Guimarães *et al.*, 2009). Estes pacientes apresentam lesões atípicas de LC, tais como lesões vegetativas, verrucosas, crostosas e lupóides.

#### **IV. 4. MicroRNAs estrutura e função**

O campo da epigenética tem atraído bastante atenção na área de ciências biológicas. Os eventos epigenéticos regulam a atividade e a herança gênica independente da sequência de nucleotídeos do DNA (Baylin *et al.*, 2001; Das *et al.*, 2004), e correspondem a modificações que ocorrem no próprio DNA e a alterações que se processam na compactação deste polímero (Rothhammer *et al.*, 2007). Os principais mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica compreendem a modificação covalente do DNA e/ou das histonas, e o controle da expressão gênica mediado por miRNAs (Morris *et al.*, 2005).

Durante muito tempo as regiões não codificantes do genoma foram consideradas lixo genético, devido à ausência de informação para síntese de proteínas. Atualmente, diversos estudos mostram que a informação genética é muito mais complexa e não segue o antigo dogma central da biologia molecular, uma vez que a maior porção do transcriptoma produzido pelo genoma de eucariotos é composta por RNAs não codificantes de proteínas (Hui *et al.*, 2005; Nagalakshmi *et al.*, 2008; Guttman *et al.*, 2009)

A partir do ano de 2005 tornou-se claro que os genomas de animais e plantas produzem muitos RNAs não codificantes com função regulatória (Mattick *et al.*, 2009). Em humanos e outros mamíferos, por exemplo, os RNAs não codificantes são transcritos de ambas as fitas do DNA, até mesmo sobrepondo regiões promotoras e de RNAs mensageiros (Carninci *et al.*, 2005; Kapranov *et al.*, 2007). Esses RNAs não codificantes regulam vários mecanismos intracelulares por intermédio de uma variedade de interações RNA-DNA, RNA-RNA e RNA-proteína (Qi *et al.*, 2006).

Os RNAs não codificantes podem ser classificados em moléculas de RNA que tem função estrutural, enzimática e reguladora. Entre aquelas com atividade reguladora estão os miRNAs, que são pequenos RNAs não codificantes endógenos constituídos por 19 a 25 nucleotídeos que surgiram como reguladores-chave da expressão de genes ao nível pós-transcricional através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de mRNA, conduzindo a uma redução na disponibilidade de proteína (Bartel *et al.*, 2004; Cowland *et al.*, 2007).

Já é bem documentado na literatura que um único miRNA pode regular a expressão de múltiplos genes e das suas proteínas codificadas. Neste sentido, miRNAs podem influenciar diversas vias de sinalização molecular e tem sido implicado na maioria das principais funções celulares, como proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação transcricional (Cowland *et al.*, 2007; Kozaki *et al.*, 2008).

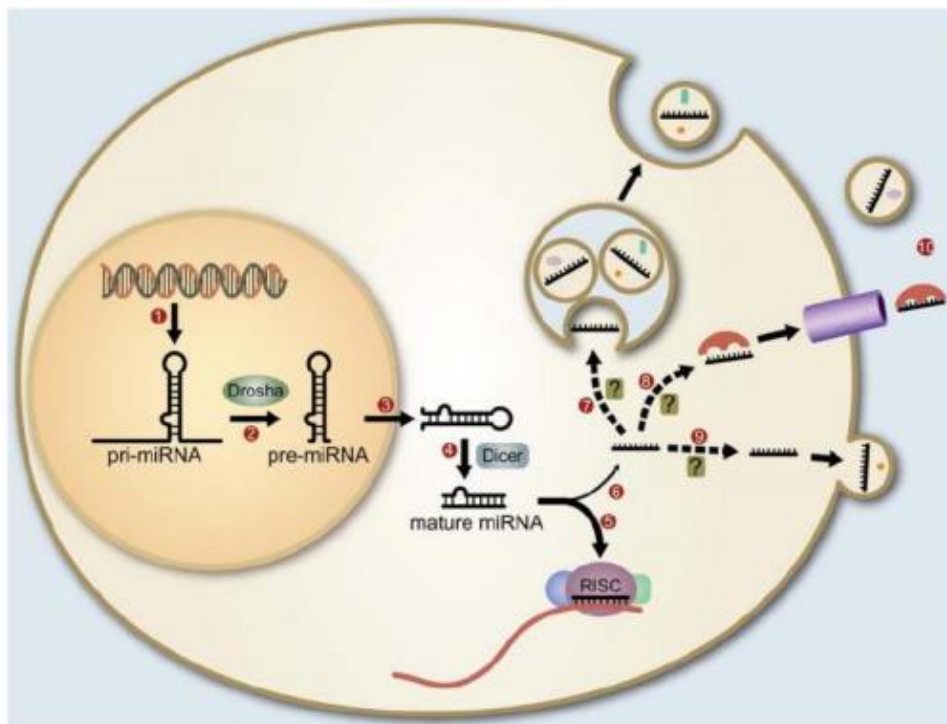
No que remete ao histórico dos miRNAs, Lee *et al.*, 1993, descobriram o primeiro miRNA, em *Caenorhabditis elegans* para o qual deram o nome de lin-4, um pequeno RNA codificado a partir do locus lin-4 associado com o processo de desenvolvimento do nematóide, por meio da regulação da expressão da proteína *lin-14*. Após o surgimento dos primeiros miRNAs, muitos outros foram e ainda estão sendo descobertos, aumentando cada vez mais esta família. Centenas de miRNAs foram encontrados em vermes, assim como moscas, plantas e vertebrados (Pasquinelli *et al.*, 2000; Carrington *et*



*al.*, 2003; Bartel *et al.*, 2004), representando um novo nível nos processos de regulação gênica (Reinhart *et al.*, 2000). Atualmente essas moléculas têm seu papel estabelecido em termos de mecanismo de ação, pela complementaridade ao mRNA alvo e a importância disso no controle das funções nas células eucariotas. Além disso, sabe-se que estes são filogeneticamente conservados e que são codificados por genes localizados nas regiões entre os genes codificadores de proteínas e por íntrons (Mattick *et al.*, 2001, 2005, 2006; Bartel *et al.*, 2004). Quanto à nomenclatura, os miRNAs são nomeados pela identificação da espécie seguida do número do miRNA, de acordo com a ordem de sua descoberta. Assim, por exemplo, para denominar o microRNA 21 em *Homo sapiens*, utiliza-se a nomenclatura hsa-miR-21 (Ambros *et al.*, 2003).

Os miRNAs são capazes de se ligar em seus mRNA alvos e inibir sua estabilidade e/ou tradução por pareamento. Essa ligação impossibilita que os ribossomos consigam traduzir a informação genética contida no mRNA, acarretando na diminuição da síntese proteica do gene-alvo sem impactar nos níveis correspondentes de mRNA. De modo geral, a regulação mediada pelos miRNAs é através da associação da região “*seed*” ou seja região semente do miRNA (nucleotídeos 2-7 do miRNA) com a região 3’ não traduzida (3’ UTR) do mRNA alvo (Lewis *et al.*, 2003). Este tipo de associação entre os miRNAs e o mRNA alvo são utilizadas como parâmetro para o desenvolvimento de algoritmos que permitem a predição dos mRNA alvos dos miRNAs. No entanto, ainda é desconhecida a proporção dos miRNAs que interagem com seus alvos segundo estas normas e a quantidade de miRNAs que reconhecem regiões do mRNA que não compreende a região 3’ UTR. Estima-se que cada miRNA tenha muitos alvos e que cada mRNA possa ser regulado por mais de um miRNA (Lim *et al.*, 2005; Rajewsky *et al.*, 2006).

A biogênese de um miRNA diz respeito a todos os eventos, a partir do gene, até se chegar ao miRNA maduro integrado ao complexo RISC (*RNA-induced silencing complex*), ou seja transcrição no núcleo celular, maturação e incorporação do miRNA em RISC (Ha *et al.*, 2014). A maturação, por sua vez, refere-se às etapas que envolvem o (1) processamento do pri-miRNA pela endonuclease chamada DROSHA, RNase tipo III, para produzir um RNA em formato de grampo ou “*hairpin*” com aproximadamente 65 a 67 nucleotídeos (pré-miR); (2) transporte do pré-miR do núcleo para o citoplasma pelo fator de exportação exportina-5 (Exp-5); (3) clivagem do pré-miR no citoplasma pela RNase tipo III específica para dupla-fita, Dicer em um RNA dupla-fita (dsRNA) de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento; (4) seleção de uma fita do duplex como miR e incorporação no complexo ribonucléico RISC (Murchison *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). O complexo miRNA-RISC se liga ao mRNA alvo de maneira sequência-específica, induzindo sua clivagem ou impossibilitando a ligação dos ribossomos (Valencia-Sanchez *et al.*, 2006). Esse processo é conhecido como silenciamento gênico e acarreta em depleção dos níveis proteicos, conforme **Figura 5**.



**Figura 5. Biogênese dos miRNAs.** 1. Transcrição do pri-miRNA pela RNA pol II ou III. 2. No núcleo, os pri-miRNAs são processados pela Drosha produzindo grampos de pre-miRNAs 3. São exportados ao citosol 4. pre-miRNAs são processado pela Dicer em uma fita dupla de miRNA maduro de 19-24 nucleotídeos 5. Uma das fitas do miRNA maduro é incorporada ao complexo RISC onde pode regular a expressão de mRNAs alvos 6. A outra fita será degradada ou possivelmente preparada para ser exportada da célula 7. Alguns miRNAs são encontrados empacotados em exossomos 8. Exportados na presença de proteínas ligadoras ou 9. em micropartículas 10) Uma vez no espaço extracelular os miRNAs podem ser importados por outras células ou degradados por RNases **Fonte: Erheridge *et al.*, 2011.**

Normalmente a interação miRNA-mRNA é imperfeita, ou seja, todos os nucleotídeos do miRNA ligados ao mRNA. Assim, a não obrigatoriedade de interação completa somado ao fato de os miRNAs possuírem sequências pequenas, confere aos miRNA funções redundantes em diversos processos, de modo que um único miRNA pode regular centenas de genes-alvo distintos, além de cooperarem no controle de um único gene-alvo (Lewis *et al.*, 2005; Miranda *et al.*, 2006).

Finalmente, uma característica dos miRNAs, a qual torna essas moléculas atrativas para estudos moleculares, é a sua estabilidade. De fato, os miRNAs são moléculas mais estáveis quando comparados à molécula de RNA mensageiro (mRNA). Devido a essa

característica, a sua expressão pode ser mais facilmente quantificada em amostras clinicamente relevantes, tais como tecidos e fluidos corporais como o plasma e soro e têm sido considerados como biomarcadores sensíveis e minimamente invasivos para a detecção de células tumorais circulantes (Hu *et al.*, 2010).

#### **IV. 5. Implicações patológicas da desregulação de miRNAs**

Vários mecanismos podem levar a alterações na expressão de miRNAs, incluindo alterações genômicas como amplificações e deleções, mutações, polimorfismos, alterações epigenéticas e alterações na maquinaria de biogênese de miRNAs. Essas alterações são responsáveis pela desregulação dos níveis de expressão de miRNAs ou por alterações nos genes-alvo dos miRNAs em células tumorais (Iorio *et al.*, 2012).

Por outro lado, estudos *in silico* predizem que aproximadamente 60% dos genes podem ser regulados pelos miRNAs (Friedman *et al.*, 2009). Durante a última década, uma série de estudos tem focado na biologia dos miRNAs, principalmente sobre a desregulação dessas moléculas em diversas doenças. Desta forma, todos esses avanços vislumbram a possibilidade do uso real de perfis de expressão de miRNAs para fins diagnósticos, prognósticos e terapêuticos. Esse fato é confirmado pelos mais de 273 testes clínicos registrados na plataforma clinicaltrials.gov, que avaliam o uso de miRNAs como biomarcadores ou candidatos a drogas (Blenkiron *et al.*, 2007; Van Rooij *et al.*, 2012). Contudo, uma das primeiras evidências do envolvimento de miRNAs em doenças humanas veio da área de oncologia, publicado por Calin *et al.*, 2002, descrevendo a deleção ou regulação negativa de miR-15a e miR-16-1 na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) (Calin *et al.*, 2002). Adicionalmente, dados mostram que o miR-30a e o miR-155 circulantes foram considerados melhores marcadores de carcinoma de mama metastático do que os marcadores sanguíneos gerais, antígeno carcinoembrionário (CEA) e antígeno

carboidrato (CA) (Sun *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2012; Zeng 2014). Neste sentido, o nível sérico do miR-155 é elevado em tumores primários de mama, em relação a indivíduos normais (Roth *et al.*, 2010). Recentemente Zuo *et al.*, 2018 mostrou a importância do miR-155 como alvo terapêutico, onde o silenciamento do miR-155 seria uma maneira potencial de curar o câncer de mama. Em adição, segundo Wang *et al.*, 2013, a alta expressão do miR-125b não está somente associada com a resistência à quimioterapia, mas também com a quantidade de células-tronco tumorais e com a metástase no câncer de mama. Sugerindo que miR-125b tem grande potencial a marcador de prognóstico para a terapia do câncer.

Com os avanços científicos nessa área, especialmente pelo volume de dados gerados em plataformas de sequenciamento de última geração, o número de miRNAs conhecidos, depositados na base de dados miRbase (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>) aumentou consideravelmente, sendo atualmente 1881 sequências de pré-miRNAs, que expressam 2.588 miRNAs maduros no genoma humano. A análise de expressão de miRNAs, integrada à predição dos genes-alvo regulados por miRNAs, pode levar à elucidação de vias moleculares desreguladas em diversas patologias (Lodin *et al.*, 2015).

#### **IV.5.1. miRNAs em doenças inflamatórias e neurodegenerativas**

A maioria dos estudos associados ao uso de miRNAs como biomarcadores está relacionado a neoplasias, porém um grande número de estudos vem documentando o papel destes RNAs reguladores também em outras doenças, como descreveremos a seguir. Em um estudo de pacientes com epilepsia, foi demonstrada uma elevada expressão de miRNAs como Let-7d-5p, miR-130a-3p, miR-146a-5p e uma diminuição de outros como miR-15a-5p e miR-194-5p no soro de pacientes, em comparação com

indivíduos saudáveis (Wang *et al.*, 2015). Outra doença favorecida pelo estudo dos miRNAs é a Esclerose Múltipla. Diversos estudos demonstraram a desregulação da expressão de miRNAs em linfócitos T isolados do sangue periférico de pacientes com esta doença (Keller *et al.*, 2009; Otaegui *et al.*, 2009; Lindberg *et al.*, 2010; Fenoglio *et al.*, 2011; Lorenzi *et al.*, 2012).

Na doença de Alzheimer (DA), foi observada a alteração dos níveis séricos específicos de miR-98-5p, miR-885-5p, miR-483-3p, miR-342-3p, miR-191-5p e miR-let-7d-5p nos pacientes em comparação com indivíduos saudáveis. Entre os miRNAs, o miR-342-3p foi determinado como um bom preditor de DA, pois apresentou boa sensibilidade e especificidade (Tan *et al.*, 2014). Da mesma maneira, em líquido cefalorraquidiano de pacientes com DA, foi demonstrado que os níveis de miR-27a-3p estavam reduzidos quando comparados com os níveis de indivíduos do grupo controle (Frigerio *et al.*, 2013). Assim como na DA, outra patologia importante associada ao processo de envelhecimento é a doença de Parkinson. Foi identificado e validado um painel de miRNAs circulantes incluindo miR-19b, miR-24 e miR-195, com expressão diferencial no soro de pacientes, tendo sido postulado que estas moléculas seriam capazes de permitir o diagnóstico da doença (Cao *et al.*, 2017).

As doenças cutâneas são caracterizadas por múltiplos caminhos de comunicação intercelular, desencadeados por diversos estímulos e mediados por reguladores heterogêneos, incluindo miRNAs. Na psoríase, foi descrito um papel relevante dos miRNAs miR-31, miR-21 e miR-4516. As funções destes miRNAs foram atribuídas à desregulação de mecanismos de apoptose, migração de células T e hiperproliferação de queratinócitos (Joyce *et al.*, 2011; Meisgen *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2014; Yan *et al.*, 2015; Chowdhari *et al.*, 2017).

Na esclerose sistêmica (ES) foi demonstrado que o miR-29a medeia a regulação pós-transcricional de colágenos, o que contribui para fibrose tecidual (Kawashita *et al.*,

2011; Jinnin *et al.*, 2014). Adicionalmente, foi descrito que os níveis séricos de miR-150 foram diminuídos em pacientes com ES e foram inversamente correlacionados com a prevalência de cicatrizes ou de úlceras, indicando potencial terapêutico de miRNAs no diagnóstico das doenças de pele (Honda *et al.*, 2013).

O perfil distinto de expressão dos miRNAs miR-203 e miR-483-5p foram identificados no soro e na urina de crianças com dermatite atópica (DA), sugerindo, que níveis aumentados de miR-483-5p no soro, pode ser indicativo de outras condições atópicas, como rinite e/ou asma, enquanto que a regulação negativa do miR-203 na urina, foi apontado como um bom biomarcador de gravidade da inflamação de crianças com DA (Yani *et al.*, 2014).

Para outras condições como doenças cardiovasculares e diabetes há estudos na literatura documentando a dosagem de miRNAs no soro com perspectivas de colocar os miRNAs como biomarcadores para estas doenças. Foi demonstrado um papel significativo do miR-22, let-7, miR-21, miR-17, miR-1, miR-133 no infarto do miocárdio (IM), incluindo efeitos regulatórios no estresse oxidativo, apoptose, autofagia, hipertrofia, fibrose e regeneração (Cheng *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2016; Bostjancic *et al.*, 2012). Do mesmo modo, os níveis circulantes dos miRNAs miR-19b-3p e miR-181b-5p foram associados com alterações metabólicas no miocárdio durante o desenvolvimento de cardiomiopatia diabética, sugerindo que estes miRNAs são biomarcadores potenciais com eventual aplicação no diagnóstico clínico para prevenir alterações metabólicas e funcionais em pacientes diabéticos assintomáticos (Copier *et al.*, 2017).

Foi estabelecida também a participação destas moléculas em doenças inflamatória intestinal. Particularmente, na doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU), a desregulação do miR-126, miR-155 e miR-21 foi associada a inflamação, ativação do

sistema imune e diferenciação nestas doenças (O'Connell *et al.*, 2007; Min *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2014; Guan *et al.*, 2015; Pathak *et al.*, 2015; Svrcek *et al.*, 2013).

Os relatos acima citados representam apenas uma pequena parte dos dados disponíveis na literatura, mas exemplificam a ampla gama de evidências que colocam os miRNAs na condição de importante fator epigenético envolvido na regulação da expressão gênica em diferentes condições imunopatológicas.

#### **IV.5.2. miRNAs em doenças infecciosas, parasitárias e leishmaniose**

A importância dos miRNAs tem sido descrita em muitas enfermidades parasitárias. Na infecção crônica por helmintos, particularmente na esquistossomose, foi demonstrado que os miRNAs miR-10, miR-223, miR-454 e miR-3479-3p podem regular o desenvolvimento do parasita, a patologia hepática e poderiam ser utilizados como biomarcadores para o diagnóstico da doença (Cai *et al.*, 2013; He *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2014).

Uma série de estudos avaliando o papel dos miRNAs associados à distúrbios cardiovasculares na doença de Chagas, causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* foi relatado recentemente, destacando o papel de miRNAs como o miR-1, o miR-133a-2, o miR-133b, o miR-208a e o miR-208b na patogênese, com implicações potenciais como ferramentas diagnósticas e prognósticas (Ferreira *et al.*, 2014; Linhares-Lacerda *et al.*, 2015, 2016; Navarro *et al.*, 2015).

Espécies de *Mycobacterium* também podem modular miRNAs para fugir da resposta imune do hospedeiro. Assim como outras bactérias patogênicas, a infecção por *Mycobacterium* leva ao aumento da expressão do miR-21 e miR-146a (Liu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013). O *M. leprae*, também pode induzir a expressão de miR-21 em monócitos e macrófagos infectados.



Atuando sobre CYP27B1 e IL-1 $\beta$ , o miR-21 pode inibir a síntese de dois peptídeos antimicrobianos dependentes da vitamina D e, portanto, permitir que o *M. leprae* persista nas células (Liu *et al.*, 2012). Recentemente Soares *et al.*, 2017, identificou um perfil diferencial de expressão de vários miRNAs ( miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146b-5p, miR-342-3p, miR-361-3p, miR-3653, miR-484 e miR-1290) em lesões de pele de indivíduos com hanseníase e várias outras doenças de cunho autoimune, especialmente aquelas relacionadas à resposta imune, sugerindo que esses miRNAs podem desempenhar um papel importante na patogênese da doença.

Os vírus produzem miRNAs que possuem papel fundamental no ciclo replicativo viral e durante sua infecção. Mukherjee *et al.*, 2015, demonstraram que a expressão do miR-373 é regulada positivamente na infecção crônica pelo vírus da hepatite C e modula o sistema imune inato, que por sua vez suprime a expressão de JAK1, IRF9 e suas moléculas envolvidas na via de sinalização do IFN. Em adição, foi descrito também que o miR-122 participa do processo de replicação do vírus da hepatite C e quando inibido faz com que a quantidade de partículas virais produzidas pelos hepatócitos diminua significativamente (Jopling *et al.*, 2005; Jangra *et al.*, 2010; Ono *et al.*, 2017). Na infecção por HTLV-1, estudos tem demonstrado diversos miRNAs do hospedeiro (miR-24, miR-146a, miR-155, miR-221, miR-223, miR-18a, miR-93, miR-130b, miR-125b) tem expressão alterada em linhagens celulares, PBMCs e em células T CD4+ infectadas podendo revelar mecanismos relacionados à patogênese desta doença (Pichler *et al.*, 2008; Ghisi *et al.*, 2011; D'Agostino *et al.*, 2012; Nicolette *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2012; Tomita *et al.*, 2012; Ruggero *et al.*, 2014). Estes estudos demonstraram que a infecção pelo HTLV-1 modula a expressão de miRNAs humanos, podendo influenciar no estabelecimento da infecção e/ou no desenvolvimento de doenças a ela associadas.

Há uma carência de estudos documentando a importância dos elementos de regulação pós-transcricional na leishmaniose. No caso de miRNAs em particular, há uma

escassez de trabalhos hoje na literatura. A grande maioria dos estudos descritos são espécies de leishmania que causam a forma visceral da doença ou utilizam espécies que são do novo mundo (Ghosh *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2015; Singh *et al.*, 2016). Em relação à leishmaniose tegumentar não há documentação destacando miRNAs envolvidos na regulação do dano tecidual e na patogênese da doença em amostras provenientes de pacientes.

Ghosh *et al.*, 2013, mostrou a importância do miR-122 em células hepáticas, durante a infecção experimental por *L. donovani* no fígado de camundongos, demonstrando que esse miRNA tem expressão reduzida, associada também com a redução da síntese de colesterol do fígado. O estudo mostrou que quando esse miRNA é re-administrado nesses camundongos, houve aumento da expressão da regulação de colesterol, indicando que esse miRNA é relevante para a entrada da leishmania na célula. O grupo também mostrou que a proteína gp63, proteína importante na virulência da leishmania, inibe a endonuclease Dicer do complexo que regula a formação dos miRNAs maduros.

Lemaire *et al.*, 2013, analisando o perfil de expressão de miRNAs de macrófagos de doadores saudáveis infectados por *L. major* observou mudanças rápidas na modulação de 20% dos miRNAs avaliados, sendo alguns destes miRNAs envolvidos na ativação de monócitos através da sinalização de TLRs. Esses dados evidenciam que alterações nos níveis de miRNAs resultam a notável capacidade do parasito modificar as respostas do hospedeiro e assegurar sua diferenciação e multiplicação intracelular. Em adição, Geraci *et al.*, 2015, avaliou o perfil de miRNAs de células infectadas com ambos, *L. major* e *L. donovani*, identificando um padrão de modulação negativa espécie-específica da maioria dos miRNAs maduros, especialmente na infecção por *L. donovani*, com alguns destes miRNAs associados a vias importantes como a JAK-STAT e TGF- $\beta$ , segundo

análises *in silico*. Esses dados dão suporte a ideia de que a célula hospedeira sofre seleção e regulação miRNA específica após a infecção com parasitas de Leishmania.

Recentemente, Nunes *et al.*, 2018 investigou o envolvimento de miRNAs e seus genes alvos na LCL causada por *L. braziliensis*, usando conjuntos de dados de transcriptomas seguidos de validação *ex vivo*. O estudo fornece evidências de que os miR-193b, miR-671 e TREM-1 estão associados com o processo inflamatório e com o tempo de cicatrização, revelando que esses miRNAs podem vir a ser utilizados como indicadores preditivos de prognóstico para LCL.

## **V- CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS**

### **V.1. Aspectos bioéticos**

O estudo faz parte de um projeto maior do National Institute of Health (NIH) (AI030639), os procedimentos adotados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, sob o cadastro (CEP-UFBA 22/2012), e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP: 1258513.1.000.5537). Todos os pacientes e indivíduos-controle participantes do estudo forneceram consentimento informado por escrito para a coleta de amostras e posterior análise.

### **V.2. Seleção dos pacientes e controles**

Os participantes do estudo consistiram de pacientes com LC recrutados no posto de saúde de Corte de Pedra, uma vila localizada a 280Km a sudeste de Salvador e que pertence ao município de Presidente Tancredo Neves-Ba. Médicos vinculados ao serviço de Imunologia da UFBA visitam à área a cada duas semanas e atuam, vinculados à estrutura do posto, na assistência para a população local acometida pela leishmaniose. Desta forma, a referida unidade de saúde tornou-se um centro de referência para o diagnóstico e tratamento da LC na região, contemplando 20 municípios abangidos dentro de uma área de 10.000 Km<sup>2</sup>.

Os pacientes foram selecionados aleatoriamente no período de março à novembro de 2016. Para a elegibilidade dos casos, foram incluídos no estudo apenas pacientes portadores de LC sem tratamento prévio. Todos os pacientes tiveram diagnóstico clínico confirmado por detecção de DNA do parasita por PCR. Características demográficas, duração da doença, número, localização e tamanho das úlceras foram registrados. Os pacientes foram tratados com GLUCANTIME<sup>®</sup> antimoniato, conforme preconizado pelo

Ministério da Saúde do Brasil. Glucantime (Sanofi / Aventis) foi administrado por via intravenosa diariamente em uma concentração de 20mg / Kg / dia por 20 dias. Foram excluídos pacientes que apresentaram lesões atípicas, gestantes ou menores de 18 anos de idade.

### **V.3. Coleta de biópsias**

A coleta de biópsias de lesões de LC foi baseada no recrutamento de casos novos de leishmaniose cutânea apresentados no posto de saúde de Corte de Pedra, e que ainda não tinham iniciado o tratamento. As biópsias de pele normal foram coletadas em membro oposto aqueles que foram obtidos as biópsias de LC. As biópsias foram realizadas utilizando *punch* de 4mm, e preservadas em RNALater Solution (Ambion) até posterior extração de RNA.

### **V.4. Obtenção do plasma**

Foram coletados 4mL de sangue através de punção venosa em tubos contendo Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) obtidos de doentes com LC e voluntários não residentes na área endêmica. Após centrifugar a amostra a 12.000 (rpm) durante 10 min, o plasma foi obtido e armazenado a -70°C.

### **V.5. Método *in silico* para predição dos alvos**

A seleção dos miRNAs candidatos foi feita utilizando-se a base de dados do miRBase e a ferramenta de predição *TargetScanHuman*, versão 7.0. Esta última, embora identifique a partir de pareamentos completos na região correspondente ao *seed* do miRNA com a 3' UTR do alvo predito, permite também a identificação com base em pareamentos fora dessa região, desde que certas propriedades termodinâmicas do duplex sejam mantidas. Um aspecto importante na restrição da análise à porção 3' UTR do

transcrito se deve ao fato da maioria dos miRNAs experimentalmente testados se ligarem preferencialmente nessa região. Além disso, o programa parte do pressuposto de que interações verdadeiras entre miRNAs e alvos deveriam ser conservadas ao longo do processo evolutivo. O miRbase, por sua vez, é um banco de dados *online* compreensivo e periodicamente atualizado, que reúne coleções de dados gerados por clonagem, sequenciamento e predição computacional. O banco apresenta ferramentas de busca com as quais é possível identificar rapidamente uma sequência de miRNA por homologia às sequências depositadas.

## V.6. Extração do RNA

### V.6.1. RNA de pele

Após maceração usando o homogeneizador de amostras *TissueRuptor* (QIAGEN), o RNA foi extraído de biópsias cutâneas usando *TRIzol*<sup>®</sup> Reagent, da seguinte forma: o tecido macerado foi transferido para tubos *ependorf* de 1,5mL, depois foram adicionados 500µl de TRIzol e 200µl de clorofórmio a cada tubo. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada durante 5 min à temperatura ambiente (TA) e centrifugada a 12000 rpm durante 5 min em seguida, a fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo de 1,5mL. Nesta fase de extração o RNA foi cuidadosamente aspirado. A cada tubo foi adicionado 500µl de isopropanol e 2µl de glicogénio. O material foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 min; O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 1 mL de etanol 75% com centrifugação posterior a 7500 rpm durante 5 min; O sobrenadante foi novamente descartado por inversão do tubo durante 5 min ou até que o *pellet* estivesse completamente seco. O RNA foi ressuspensão em 20µl de água livre de RNase e sua concentração e grau de pureza foram aferidos por meio do sistema *Nanodrop*<sup>®</sup>.

### V.6.2. RNA do plasma

O RNA do plasma foi extraído utilizando *MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kit*, seguindo precisamente o protocolo da seguinte forma: as amostras foram digeridas utilizando *Proteinase K*, misturando-se 50µl de PK Digestion Mix com 150µl de plasma em tubos *epENDORF*. O material foi homogeneizado e incubado a 65°C por 30 minutos. Para lisar as amostras e ligar o RNA ao RNA *Binding beads*, foram adicionados 100µl de *Lysis Binding Mix* a cada amostra e 20µl de RNA *Binding beads*. Após misturar o material, foram adicionados 270µl de isopropanol e a mistura foi homogeneizada. Para purificar o RNA os tubos foram posicionados na *MagnaRack* por 5 minutos ou até a solução ficar clara. Cuidadosamente o sobrenadante foi descartado sem mexer o RNA *Binding beads* e adicionado 150µl de *Wash Solution 1* a cada amostra. Repetiu-se os passos com 150µl de *Wash Solution 2*. Para tratar as amostras com *TURBO Dnase* e religar o RNA ao RNA *Binding beads*, foi adicionado a cada tubo 50µl de *TURBO Dnase Solution* e misturado em agitador. Logo após, foi adicionado 50µl de *Rebinding Buffer* e 100µl de isopropanol. Os tubos foram posicionados na *MagnaRack*. Cuidadosamente o sobrenadante foi descartado sem mexer o RNA *Binding beads* e adicionado 150µl de *Wash Solution 1* a cada amostra. Para eluir o RNA, foi adicionado a cada amostra 50µl de *Elution Buffer* pré-aquecido, seguido de incubação. O sobrenadante foi transferido para tubos *epENDORF* e as amostras estocadas a -70°C.

A concentração e a pureza de RNA foram determinadas por medições de densidade óptica (260nm e 280nm) usando *Nanodrop®* e, finalmente, os ácidos nucleicos foram armazenados a -70 ° C até a sua utilização.

## V.7. Síntese de DNA complementar cDNA

Utilizando RNA previamente extraído de biópsias de pele e de plasma, a obtenção de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit comercialmente disponível *TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Applied Biosystems), seguindo precisamente as orientações do fabricante. De forma resumida: as amostras de tecido foram diluídas na concentração final 10ng e o plasma foi utilizado concentrado. Para reação de cauda poly(A) foi adicionado em tubo *epENDORF* o mix da reação poly(A) com os seguintes componentes: 0,5µl de 10x Poly(A) Buffer, 0,5µl ATP, 0,3µl *Poly(A) Enzyme* e 1,7µl água livre de Rnase. Em uma placa de reação foi adicionado 2 µl da amostra e 3 µl do mix de reação poly(A). As amostras foram incubadas em um termociclador e obedeceram a seguinte ciclagem: **(I)** 45 minutos a 37°C, **(II)** 10 minutos a 65°C e **(III)** *Hold* 4°C. Para ligação do adaptador foi adicionado em tubo *epENDORF* o mix de reação de ligação com os seguintes componentes: 3µl de *DNA ligase Buffer* 5x, 4,5 µl 50 PEG 8000, 0,6 µl ligação do adaptador 25x, 1,5 de RNA ligase e 0,4 µl de água livre de Rnase. 10 µl do mix foi transferido para cada poço da placa de reação. Posteriormente obedecendo os tempos de ciclagens: **(I)** 60 minutos a 16°C, **(III)** *hold* 4°C. Para reação da transcriptase reversa foram utilizados os seguintes componentes para preparar o mix de reação: 6µl de RT Buffer 5x, 1,2µl dNTP mix, 1,5µl primer RT universal 20x, 3µl enzima RT 10x e 3,3µl de Rnase-free water. Para cada poço da placa de reação foi adicionado 15µl do mix. As amostras foram incubadas seguindo os devidos tempos de ciclagens: **(I)** 15 minutos a 42°C, **(II)** 5 minutos a 85°C e **(III)** *hold* 4°C. Para reação de amplificação de miRNAs (miR-AMP) os componentes utilizados para preparar o mix de reação foram: 25µl de Master mix miR-AMP 2x, 2,5µl primer miR-AMP 20x e 17,5µl de água livre de RNase. Em uma nova placa foi adicionado 45µl do mix de reação miR-AMP e 5µl do produto de reação RT. As amostras foram incubadas seguindo os seguintes tempos de ciclagens: **(I)** 5 minutos a 92°C – 1 ciclo **(II)** 3 segundos a 95°C e 30



segundos a 60°C - 14 ciclos **(III)** 10 minutos a 99°C – 1 ciclo **(IV)** *hold* 4°C. O produto final da reação miR-AMP foi estocado a -20°C, até 2 meses.

#### **V.8. Avaliação da expressão de miRNAs por RT-PCR quantitativa (qRT-PCR)**

Utilizando o equipamento 7500 *Real Time PCR System* (Applied Biosystems), Para as reações de qRT-PCR, as amostras foram preparadas como descrito a seguir: 2,5µl de cDNA, 5µl de *TaqMan Universal Mastermix*, 2µl de água livre de DNase-RNase e 0,5µl de ensaio em um volume final de 10µl. As condições de amplificação obedeceram a seguinte ciclagem **(I)** 5 minutos a 50°C, **(II)** 10 minutos a 95°C, **(III)** 15 segundos a 95°C e **(IV)** 1 minuto a 60°C, sendo os ciclos 3 e 4 repetidos 40 vezes. Todas as amostras foram utilizadas em duplicatas. A expressão dos miRNAs foi normalizado para o nível de hsa-miR-24-3p correspondente para cada amostra a fim de controlar a variabilidade entre as amostras. Liang et al., 2007 relatou a expressão estável do hsa-miR-24-3p em 40 tecidos normais.

Por fim, a comparação dos padrões de expressão dos miRNAs de interesse foi realizada utilizando o método de Ct comparativo, onde  $\Delta Ct$  corresponde ao valor de Ct do gene alvo subtraído do valor Ct do gene endógeno, e  $\Delta\Delta Ct$  corresponde ao valor  $\Delta Ct$  de cada alvo em lesão subtraída do  $\Delta Ct$  da pele normal (amostra calibradora). Todos os dados foram plotados em unidades de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) em relação ao grupo controle.

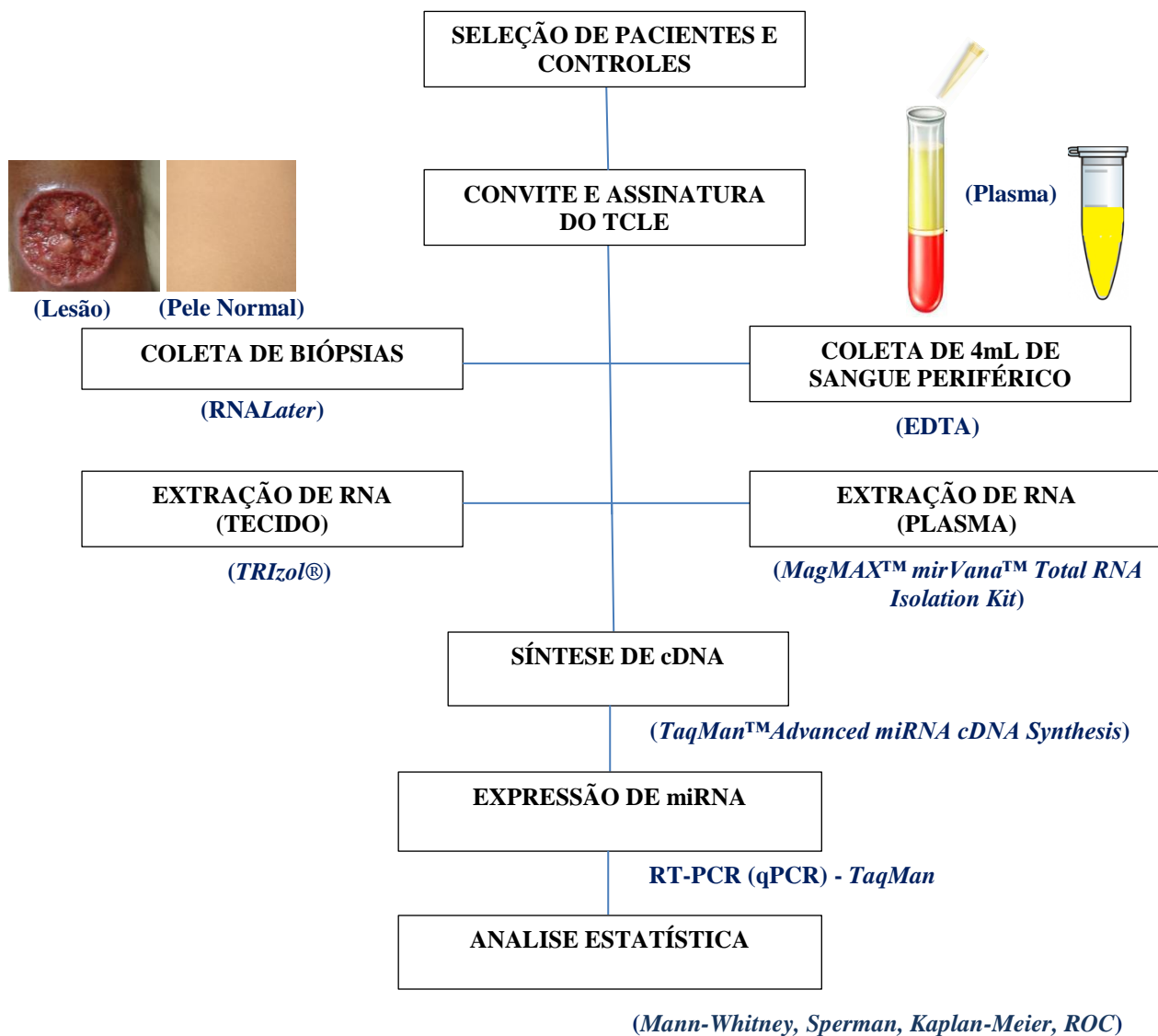
### **V.9. Delineamento do estudo**

A pesquisa constituiu-se em um estudo transversal, onde foram selecionados pacientes do posto de saúde de Corte de Pedra-Ba, área endêmica de LC. O estudo foi desenvolvido no Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos – UFBA. O Serviço de Imunologia possui estrutura adequada para a realização do trabalho.

### **V.10. Análise estatística**

Para avaliação da expressão dos miRNAs os dados foram representados em unidades de expressão relativa entre os grupos de comparação. A significância estatística foi avaliada pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney* para comparação entre dois grupos. A análise de correlação foi analisada pelo teste de *Spearman*. Em adição, análises de sobrevida foram estimadas pelo método de *Kaplan-Meier* com o objetivo de diferenciar o tempo de cura de acordo os valores de expressão dos miRNAs. Uma curva *ROC* foi feita com a finalidade de prever a sensibilidade e especificidade de quem vai curar ou falhar de acordo com os valores de expressão do miRNA. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significante, e, para todas estas análises o software *GraphPad Prism 5* foi utilizado.

### V.11. Fluxograma ilustrativo do estudo



## VI. RESULTADOS GERAIS

### VI.1. Características clínico-epidemiológicas da população estudada

Um total de vinte e cinco pacientes com LC foram recrutados para o estudo. No geral, a média de idade foi de 32 anos  $\pm$  9,7 e a proporção de homens:mulheres foi de 18:7. Em seguida, dividimos os pacientes em dois grupos de acordo com a resposta ao tratamento com antimonial pentavalente (Sbv). Definimos como “cura”, aqueles pacientes que tiveram a necessidade de apenas um curso de Sbv, com tempo de cura de até noventa dias; enquanto que o grupo “falha” eram aqueles que precisavam de dois ou mais cursos de Sbv ou outra droga alternativa, com tempo de cura superior a noventa dias para curar suas lesões. Essa estratificação foi utilizada para realizar análise de correlação quanto à resposta terapêutica e tempo de cicatrização. Os dados clínicos e demográficos dos pacientes estão detalhados na **Tabela 2**. Em adição, doze amostras de doadores de sangue provenientes da Fundação de Hematologia e Hemoterapia da Bahia (HEMOBA) foram obtidas para os estudos em plasma. Estes doadores não possuíam história presente ou pregressa de leishmaniose, assim como, outras doenças e comorbidades e não residiam em área endêmica.

**Tabela 2.** Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea que curaram ou falharam na terapia com antimonial pentavalente

ASPECTOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS	RESULTADO DO TRATAMENTO		
	Cura	Falha	Valor de p
Idade, média, (DP)	32 ± 9,7	22 ± 3,9	<b>0,037</b>
Sexo, %			
Masculino	15/20 (75)	3/5 (60)	0,596
Duração da doença, mediana, (IQ)	81,5 (65 -120)	160 (137,5 – 178)	<b>0,008</b>
Número de lesões, mediana, (IQ)	1,5 (1-2)	1 (1-2,5)	0,765
Área da maior lesão, mediana, mm <sup>2</sup> (IQ)	163,5 (84-537,5)	42 (25-301)	0,071
Área da IDRМ, mediana, mm <sup>2</sup> (IQ)	180 (25-440)	225 (144-240)	0,759
Lesões nos membros inferiores, %	50	40	1,000
Tempo de cura, mediana, (IQ)	50 (36,2-59)	120 (120-143)	<b>0,001</b>

DP= Desvio padrão; IQ = Intervalo interquartil; IDRМ= Intradermorreação de Montenegro.

**VII.2. Resultados do objetivo 1:** *Identificar miRNAs reguladores dos genes hiperexpressos em uma análise de transcriptoma realizada em pacientes provenientes da área endêmica de Corte de Pedra-Ba.*

Considerando os genes documentados na literatura e identificados a partir de um estudo de transcriptoma realizado em pacientes infectados provenientes da área endêmica de Corte de Pedra-Ba, foram selecionados os miRs: 361-3p, 103a-2-5p, 140-3p, 1265, 205-3p, 584-5p, 7161-3p, 3646, 1252-3p, 4313, 153-5p, 5011-5p, 6885-3p e 4753-3p. Nessa escolha foram utilizados os bancos de domínio público *TargetScanHuman 7.1* ([http://www.targetscan.org/vert\\_71/](http://www.targetscan.org/vert_71/)) e *miRBase* (<http://www.mirbase.org/>). Os genes-alvo para cada miRNA selecionado encontram-se na **Tabela 3** abaixo. Devido ao seu

efeito redundante, é possível observar que um único miRNA aparece regulando diferentes genes alvo.

**Tabela 3** – Lista dos miRNAs selecionados para análise por qPCR e seus respectivos genes alvo

miRNA	# DE ACESSO miRbase	GENES ALVO	SEQUÊNCIA DO miRNA MADURO
hsa-miR-361-3p	MIMAT0004682	TNF e GZMB	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU
hsa-miR-103a-2-5p	MIMAT0009196	CXCL9, FLI1, GBP5, GNLY	AGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUG
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	NKG7	UACCACAGGGUAGAACCACGG
hsa-miR-1265	MIMAT0005918	CXCL10,GBP5,CXCL9	CAGGAUGUGGUCAAGUGUUGUU
hsa-miR-205-3p	MIMAT0009197	FLI1, CXCL9, IL1- $\beta$ , IL6	GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC
hsa-miR-584-5p	MIMAT0003249	GBP5,CXCL9	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG
hsa-miR-7161-3p	MIMAT0028233	GBP5,CXCL9,MMP1	UAGAUCUUUGACUCUGGCAGUCUCCAGG
hsa-miR-3646	MIMAT0018065	GZMA	AAAAUGAAAUGAGCCCAGCCCA
hsa-miR-1252-3p	MIMAT0026744	GZMA	CAAAGAGCUUAAUUUCCUUUU
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	GZMB	AGCCCCUGGCCCAAACCC
hsa-miR-153-5p	MIMAT0026480	CXCL9,CXCL10,GBP5,IDO1	UCAUUUUUGUGAUGUUGCAGCU
hsa-miR-5011-5p	MIMAT0021045	CXCL9,CXCL10,GBP5,IDO1	UAUAUAUACAGCCAUGCACUC
hsa-miR-6885-3p	MIMAT0027671	FLI1,GZMB,CXCL9	CUUUGCUUCCUGCUCCCUAG
hsa-miR-4753-3p	MIMAT0019891	FLI1,MMP1,CCL8	UUCUCUUUCUUUAGCCUUGUGU

**miRNA**, *microRNA*; **hsa-miR**, *homo sapiens*

O desenho dessas moléculas foi disponibilizado pelo *software TargetScanHuman* que mostra a região de ligação do miRNA ao gene-alvo, conforme exemplos mostrados na **Tabela 4**.

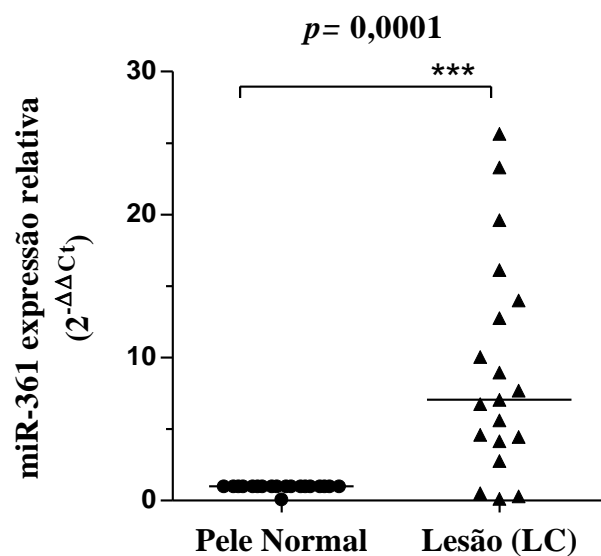


**VI. 3. Resultados do objetivo 2:** *Avaliar a expressão dos miRNAs em biópsias de pele de pacientes com Leishmaniose Cutânea Clássica (LC) e em amostras de pele normal.*

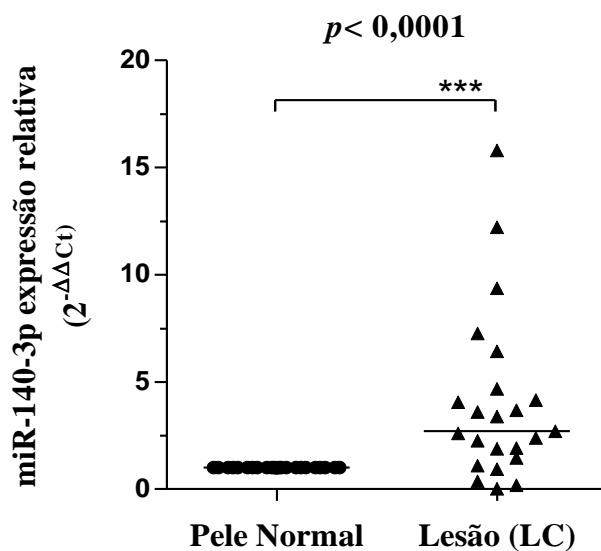
Para determinar se a patogênese da leishmaniose cutânea é acompanhada pela alteração da expressão de miRNAs que regulam genes nas lesões de LC, os níveis de expressão de miRNAs candidatos foram comparados entre biópsias de lesões de LC (N=25) e biópsias de pele normal distante da lesão (N=25). Dos quatorze miRNAs alvos avaliados, apenas quatro apresentaram expressão tecidual detectável: **miR-361-3p** (*TNF* e *GZMB*), **miR-103a-2-5p** (*CXCL9*, *FLII*, *GBP5*, *GNLY*), **miR-140-3p** (*NKG7*) e **miR-205-3p** (*FLII*, *CXCL9*, *IL1-β*, *IL-6*). Os miRNAs miR-361-3p e -140-3p foram significativamente mais expressos nas lesões de LC quando comparados a amostras de pele normal, ( $p=0,0001$  e  $p< 0,0001$ , respectivamente), conforme demonstrado na **Figura 6**. Os miR-103a-2-5p e -205-3p embora também estivessem mais expressos em lesões do que em pele normal, não alcançaram significância estatística, como mostrado na **Figura 7**.



A

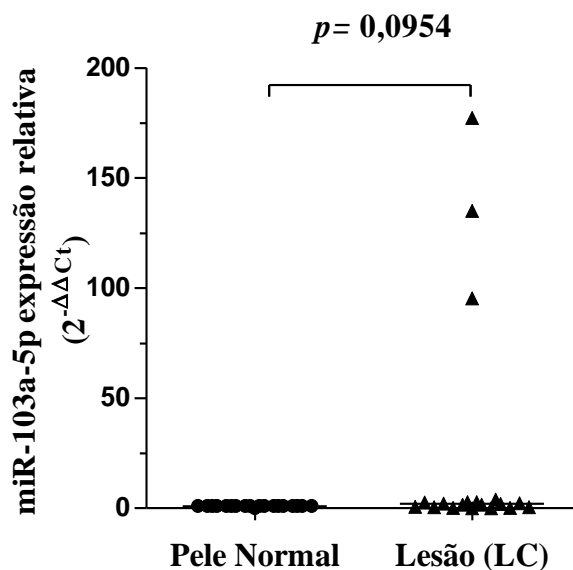


B

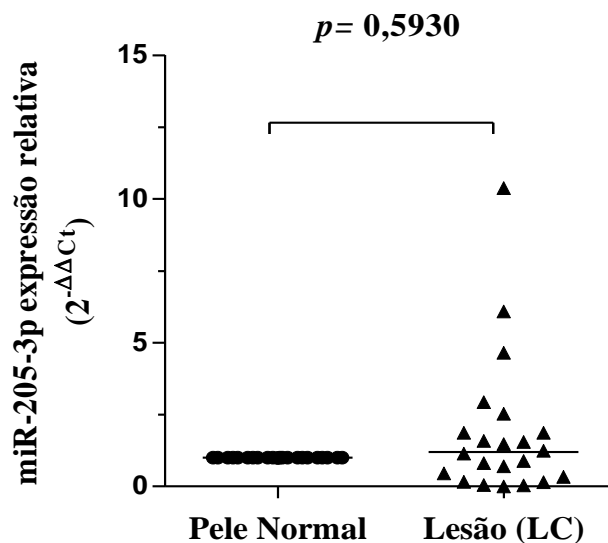


**Figura 6.** Comparação da expressão relativa dos miR-361-3p (A) e miR-140-3p (B) em amostras de pele lesionada e amostras de pele normal de pacientes de LC. Avaliação por qPCR. Todos os valores foram representados em unidades de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) da lesão em relação à pele normal de cada indivíduo. As barras representam a mediana dos grupos. Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de *Mann Whitney* pelo programa *GraphPad Prism*.

A



B



**Figura 7.** Comparação da expressão relativa dos miR-103a-2-5p (A) e miR-205-3p (B) em amostras de pele lesionada e amostras de pele normal de pacientes de LC. Avaliação por qPCR em tempo real. Todos os valores foram representados em unidades de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) da lesão em relação à pele normal de cada indivíduo. As barras representam a mediana dos grupos. Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* pelo programa *GraphPad Prism*.

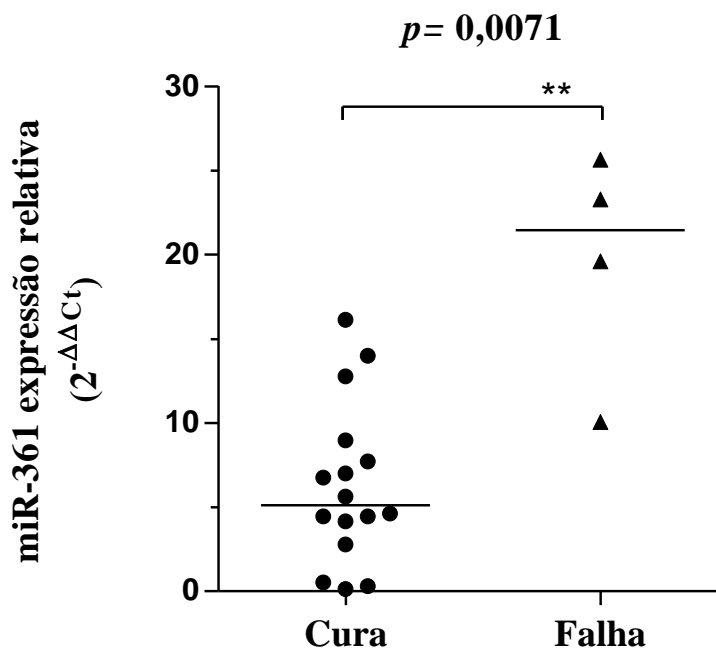
**VI. 4. Resultados do objetivo 3:** *Avaliar a expressão de miRNAs no plasma de pacientes com LC e doadores sadios.*

O método de qPCR também foi utilizado para avaliação do perfil de expressão de miRNAs no plasma de pacientes infectados por *L. braziliensis* e em indivíduos não residentes na área endêmica e provenientes de banco de sangue que serviram como controles. Não detectamos expressão dos miRNA testados nos plasmas avaliados tanto em pacientes, quanto em controles sadios.

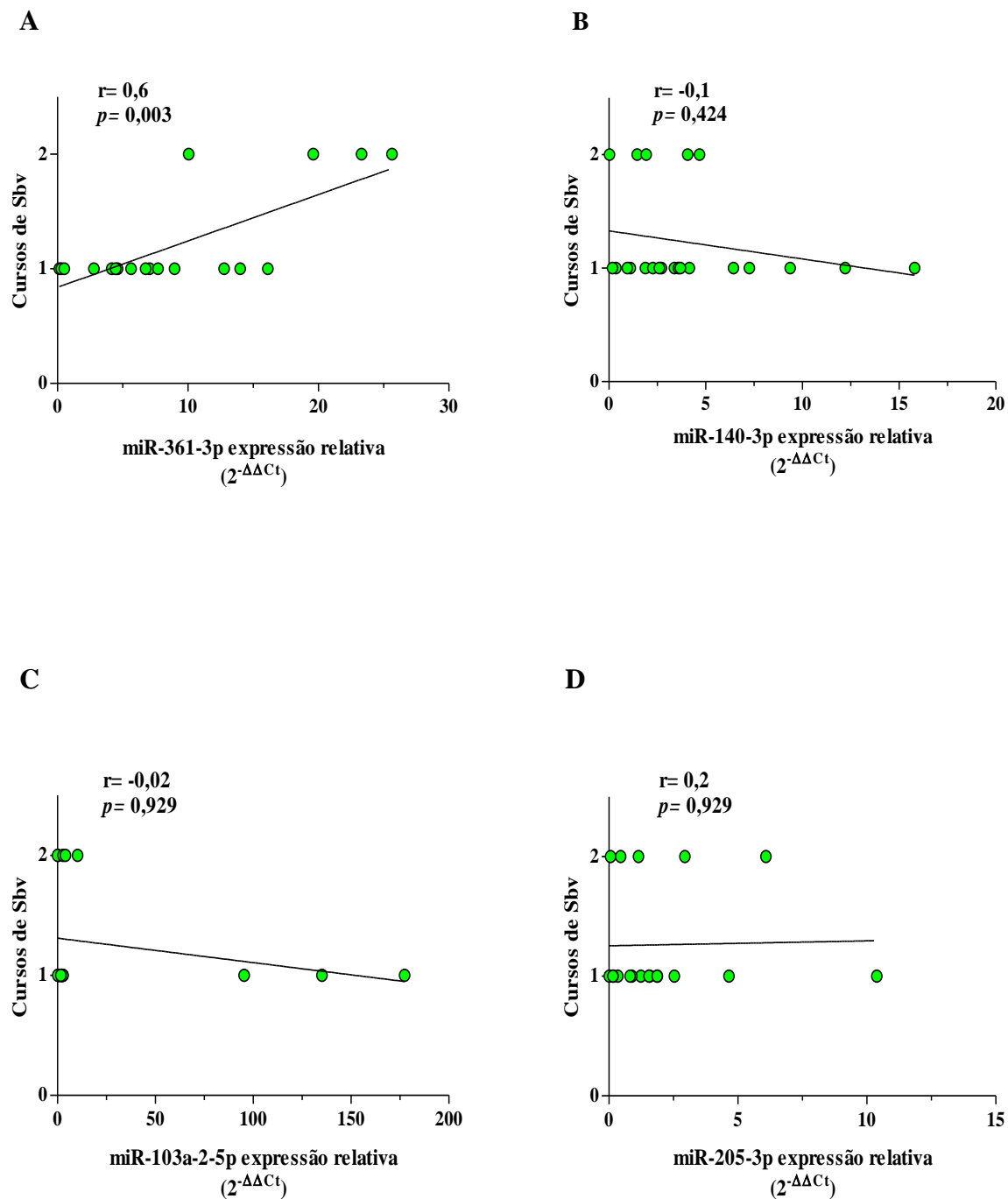
**VI. 5. Resultados do objetivo 4:** *Correlacionar a expressão dos miRNAs com os parâmetros clínicos de pacientes com LC (tratamento, área da lesão, área da intradermoreação de Montenegro (IDRM) e número de lesões ulceradas).*

Antes das análises de correlação propriamente ditas, iniciamos o manejo dos dados fazendo análises de associação. Neste ponto, observamos uma associação significativa entre o número de cursos de antimonial pentavalente e a expressão do miR-361-3p, com maior expressão em pacientes que tomaram dois ou mais cursos de tratamento em comparação àqueles que receberam apenas um curso, ( $p=0,0071$ ), conforme demonstrado na **Figura 8**. No entanto, não houve associação dos miR-140-3p, -103a-2-5p e -205-3p com falha terapêutica e demais parâmetros clínicos (área da lesão, área da IDRM e números de lesões ulceradas). Em relação às análises de correlação entre a expressão desses miRNAs com os mesmos parâmetros clínicos já descritos, nossos resultados mostram uma correlação positiva entre o número de cursos de Sbv e a expressão relativa do miR-361-3p, mostrando que a expressão deste miRNA foi maior em pacientes que não atingiram a cura com um curso de Sbv ( $r= 0,6$ ,  $p= 0,003$ ) **Figura 9**. Além disso, também encontramos uma correlação direta entre o mesmo miRNA e o tempo de cura das lesões ( $r= 0,5$ ,  $p= 0,007$ ), indicando que os indivíduos que expressam

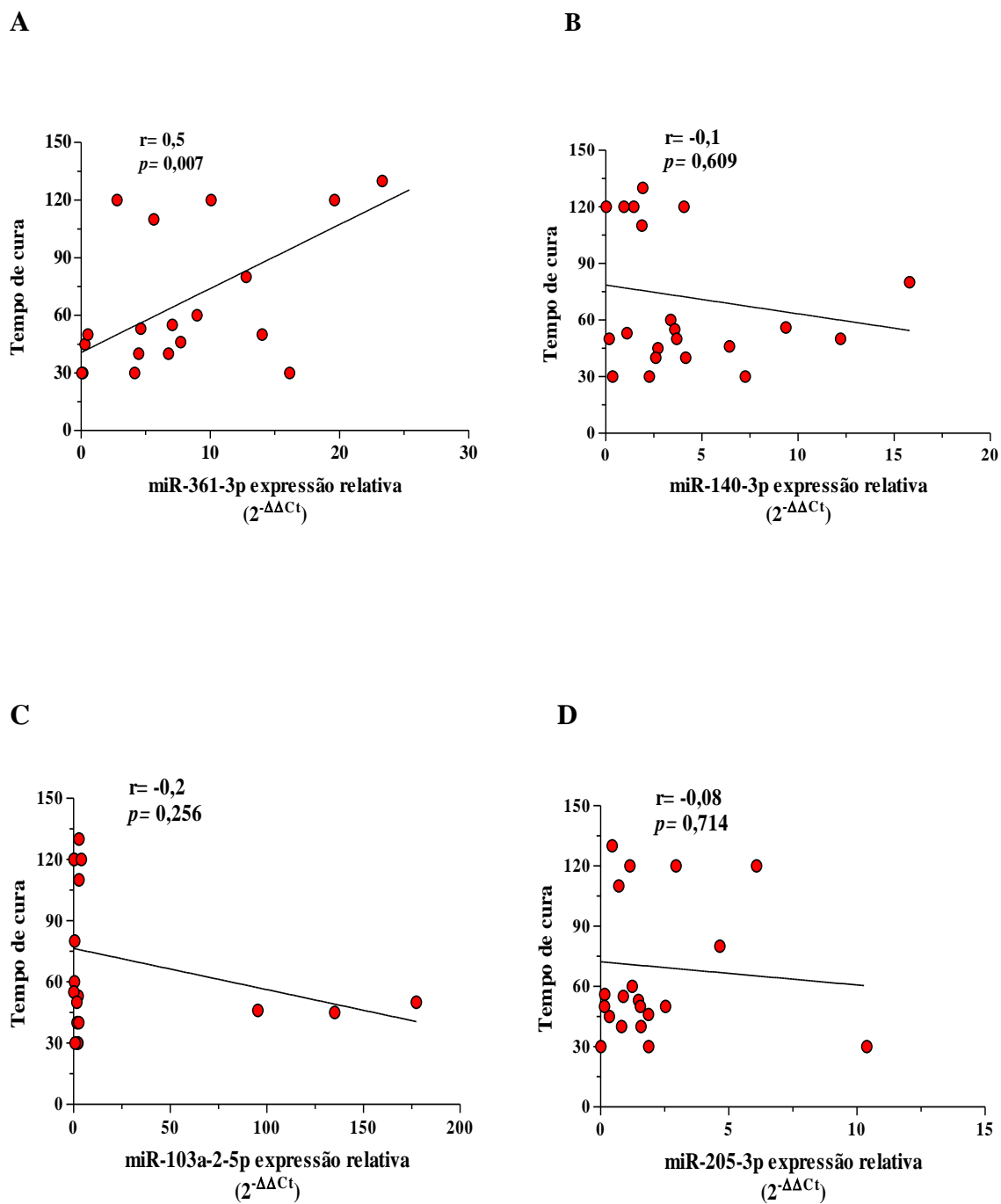
mais esse miRNA demandam um tempo maior de cura das suas lesões como mostrado na **Figura 10**. Novamente, esse foi o único miRNA que mostrou correlação significativa em relação a este parâmetro clínico. Os demais parâmetros avaliados não foram correlacionados com nenhum dos miRNAs, como mostrado nas **Figuras 11, 12 e 13**.



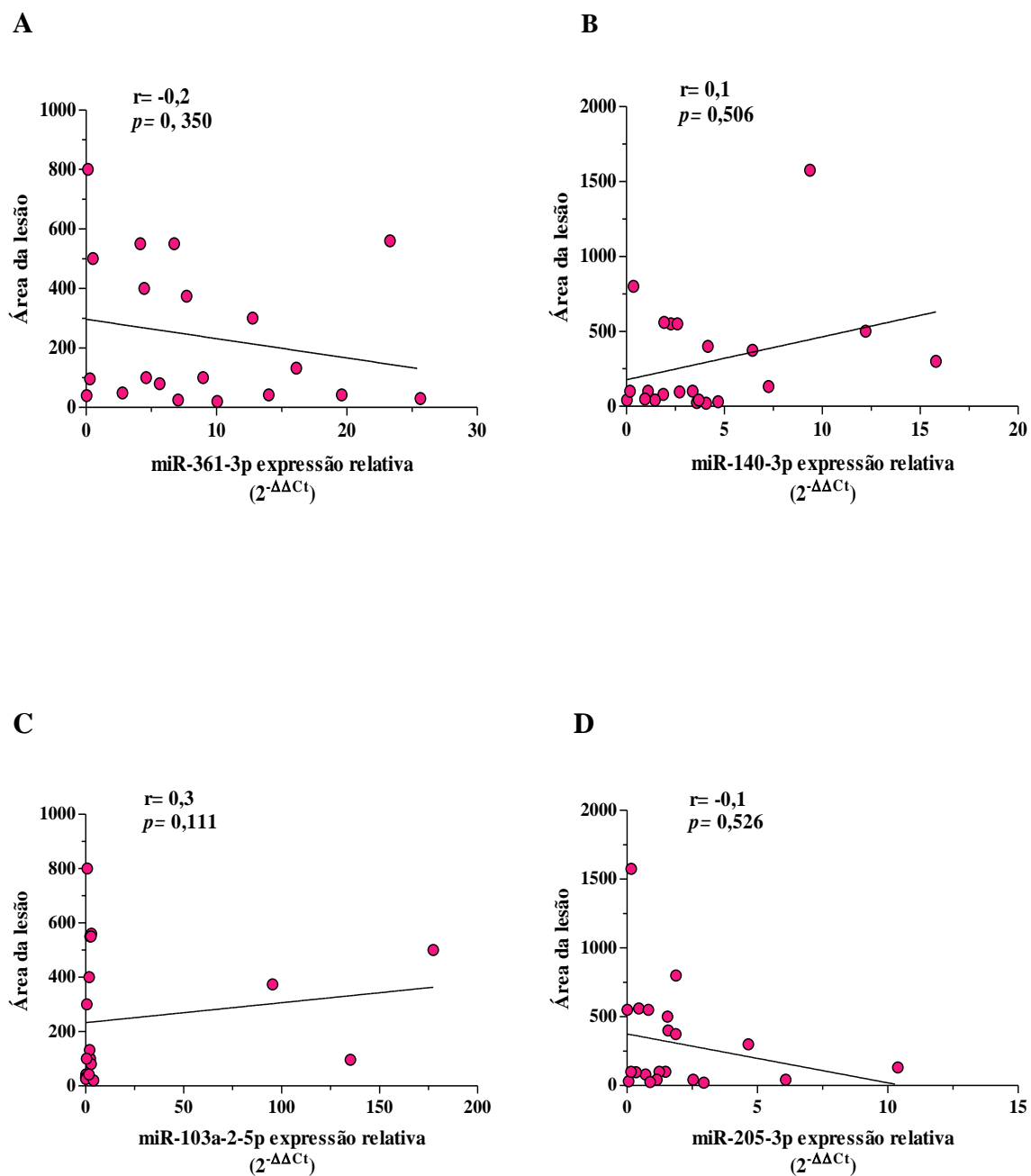
**Figura 8.** Associação entre o número de cursos de antimonial pentavalente e expressão do miR-361-3p. Os pacientes elencados no grupo “cura” são aqueles que tomaram apenas um curso de tratamento e cicatrizaram suas lesões em até 90 dias. Os pacientes do grupo “falha” precisaram de dois ou mais cursos de terapia com antimonial com processo de cicatrização superior a 90 dias. Avaliação por qPCR em tempo real. Todos os dados foram representados em unidades de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ). Os dados foram analisados utilizando o teste não paramétrico de *Mann Whitney* pelo programa *GraphPad Prism*.



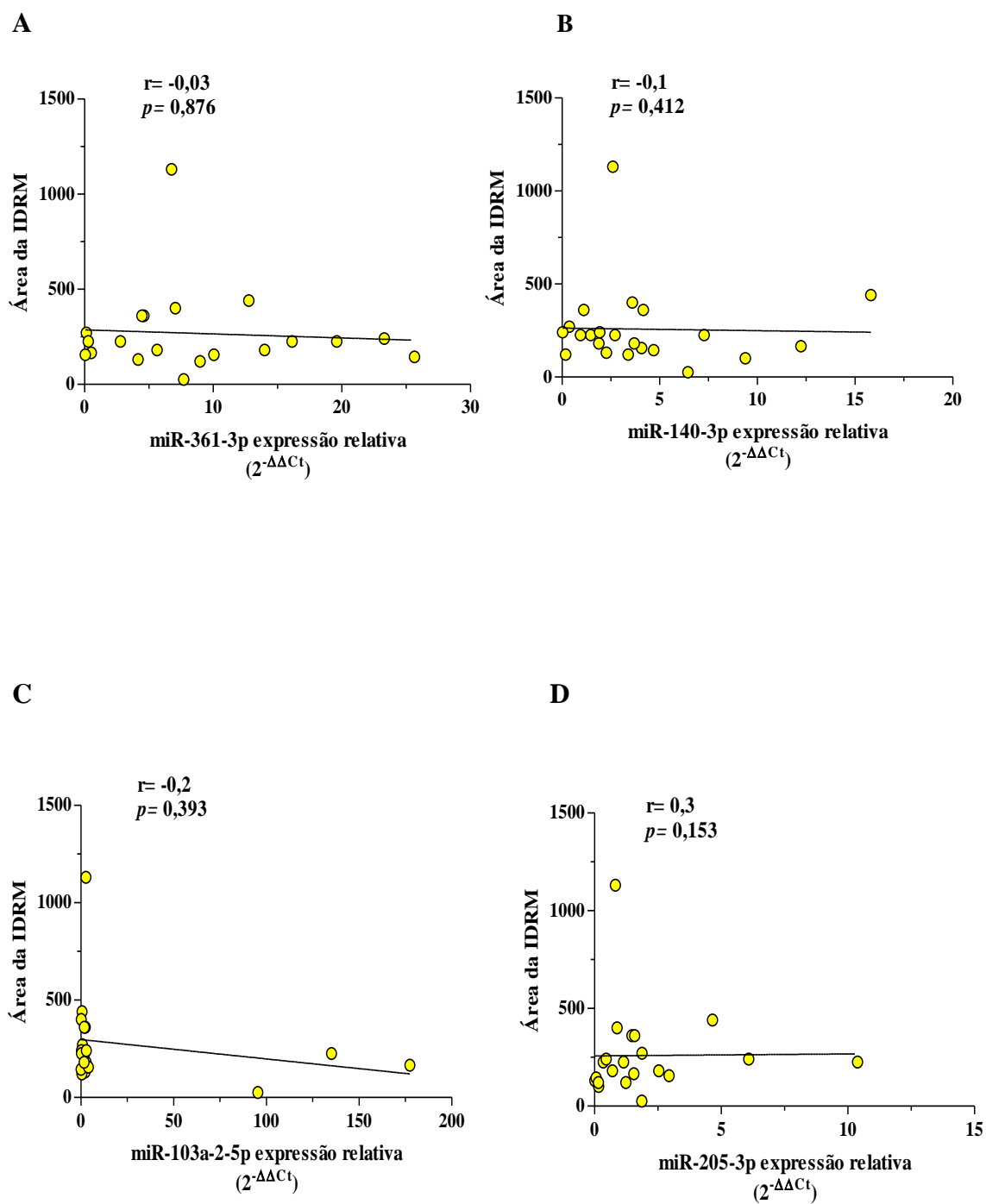
**Figura 9.** Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR -361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com o número de cursos de Sbv.



**Figura 10.** Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR -361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com o tempo de cura após o início do tratamento.

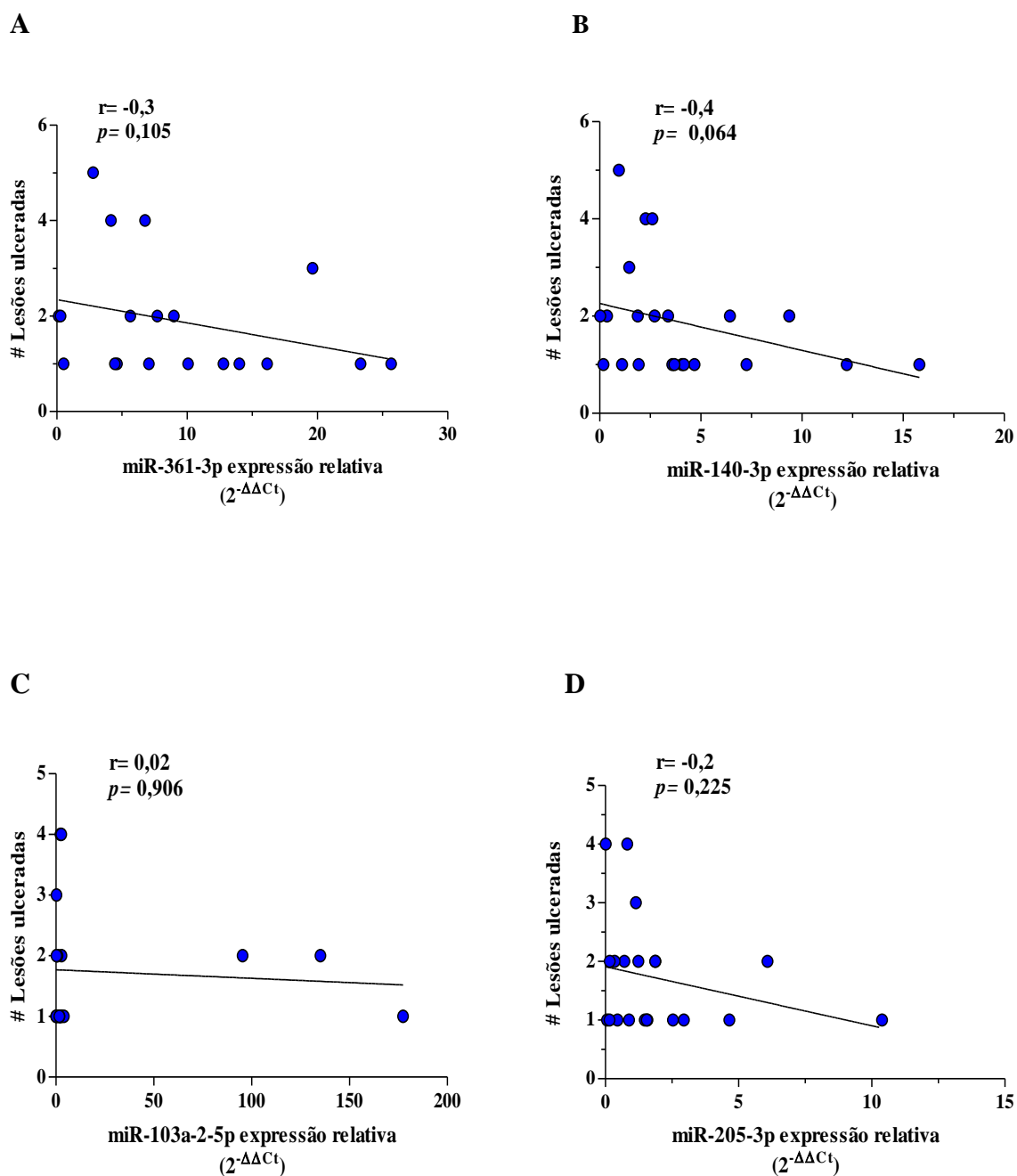


**Figura 11.** Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR -361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com a área da lesão.



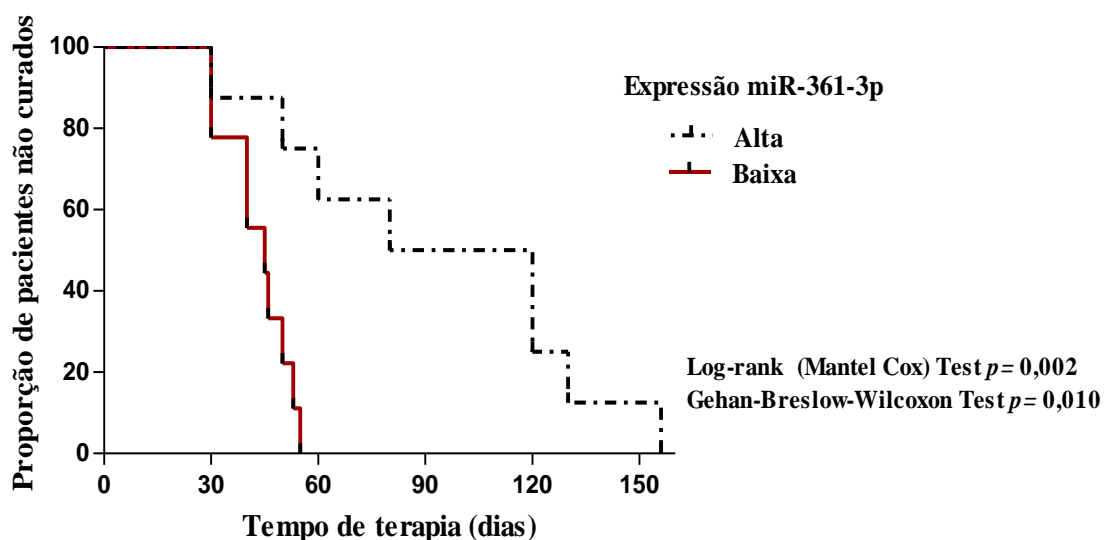
**Figura 12.** Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR -361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com a área da IDR.





**Figura 13.** Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR-361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com o número de lesões ulceradas.

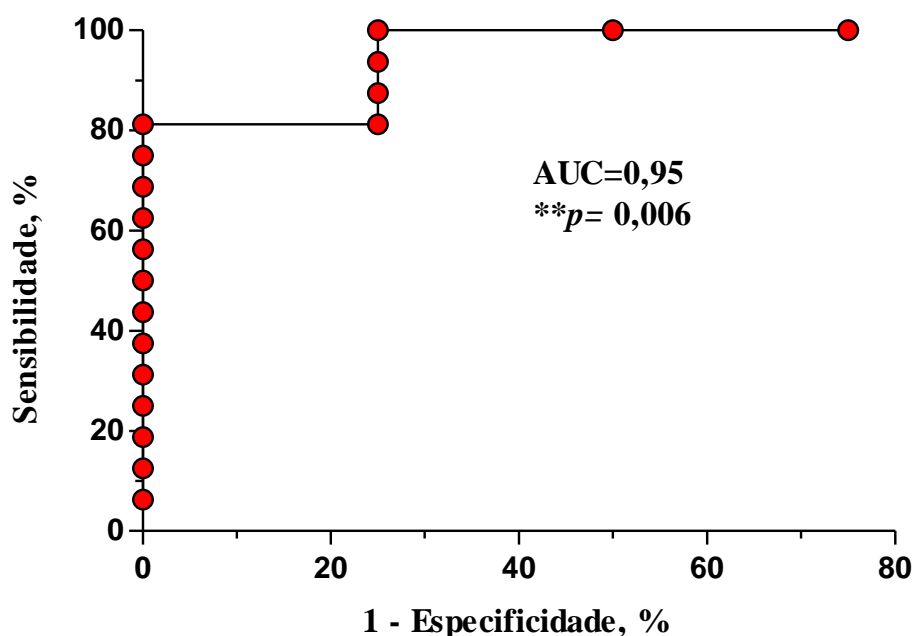
Como desdobramento das nossas análises iniciais, fizemos uma análise de sobrevida pelo método de *Kaplan-Meier* com o objetivo de diferenciar o tempo de cura de acordo aos valores de expressão dos miRNAs avaliados. Esta análise revelou que quanto maior a expressão do miR-361-3p, maior o tempo previsto para cicatrização da úlcera de LC ( $p= 0,002$  e  $p= 0.010$ ), conforme **Figura 14**.



**Figura 14.** Análise de sobrevida de *Kaplan-Meier* diferenciando o tempo de cicatrização de acordo com os valores de expressão do miR-361-3p.

Por fim, para avaliarmos se a expressão do miR-361-3p pode ser utilizada como um biomarcador de falha terapêutica, fizemos uma análise de curva ROC. Desse modo, a curva ROC mostrou que os valores da expressão do miR-361-3p são capazes de discriminar corretamente os indivíduos que não responderam ao tratamento ( $AUC=0.95$ ,  $p= 0,006$ ) com uma sensibilidade de 81,2% ( $IC=54,3-95,9$ ) e especificidade de 100% ( $IC=39,7-100$ ), utilizando o *cut off* de 9,5 (**Figura 15**). Estas mesmas análises foram

realizadas para os outros miRNAs, porém não foram alcançados valores com significância estatística. A **Tabela 5** mostra os valores obtidos na análise de curva ROC de todos os miRNAs (área sob a curva, sensibilidade, especificidade e valor de P).



**Figura 15.** Expressão relativa do miR-361-3p na lesão prediz falha terapêutica em pacientes com LC. Os valores de expressão do miR-361-3p discriminam significativamente os indivíduos que não responderam ao tratamento com um curso de Sbv e são refratários (área sob a curva ROC [0,95; p= 0,006]).

**Tabela 5.** Valores obtidos na análise de curva ROC

miRNA	Área sob a curva	Sensibilidade 95% IC	Especificidade 95% IC	Cut off	Valor de p
miR-361-3p	<b>0,95</b>	<b>81,20</b>	<b>100</b>	< <b>9,521</b>	<b>0,006</b>
miR-140-3p	0,62	55,96	100	> 5,563	0,410
miR-103a-2-5p	0,65	50,80	100	> 49,72	0,308
miR-205-3p	0,51	55,96	100	> 5,563	0,926

## VII. DISCUSSÃO

A LTA é considerada pela OMS uma das principais doenças negligenciadas e está entre as endemias com maior impacto em saúde pública, devido a sua ampla distribuição, ocorrência de formas clínicas debilitantes, além das limitações referentes ao diagnóstico, tratamento e controle. A patogênese e amplo espectro clínico dessa doença estão relacionados a diversos aspectos, incluindo a interação entre o parasita e a resposta imune e fatores genéticos e epigenéticos do hospedeiro. O número crescente de casos de leishmaniose, somando à refratariedade crescente dos tratamentos disponíveis e a ausência de métodos adequados de controle e profilaxia em grandes áreas de transmissão justificam a relevância da continuação em pesquisas que identifiquem alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas que garantam proteção a longo termo em populações expostas. Nesse contexto, estudos utilizando diferentes abordagens moleculares vêm esclarecendo vias e mecanismos que podem nortear a identificação de antígenos e fármacos com potencial de aplicação e que podem, no futuro, ser traduzidos em benefícios diretos para os pacientes, especialmente considerando áreas endêmicas onde a condição socioeconômica da população aumenta a dificuldade em lidar com as consequências da leishmaniose.

Hoje se sabe que os miRNAs são importantes reguladores de várias funções celulares, com capacidade de inibir e ativar a expressão gênica de diferentes formas em situações fisiológicas e patológicas. Assim, alterações identificadas na expressão de miRNAs do hospedeiro podem elucidar mecanismos relacionados à imunopatogênese de doenças infecciosas e parasitárias. Portanto, vários trabalhos tem sido realizados para melhor esclarecer a função dos miRNAs e o importante papel regulatório que estas moléculas desempenham em diversas doenças.

O papel dos miRNAs na leishmaniose tem sido pouco estudado, no entanto dados anteriores mostram que essa classe de reguladores pode controlar diversas vias celulares do hospedeiro, direcionando a infecção e regulando mecanismos que culminam no desenvolvimento da doença (Lemaire *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2013; Geraci *et al.*, 2015; Chamnanchanunt *et al.*, 2017). Em relação à LTA, há apenas um único trabalho, publicado muito recentemente destacando miRNAs envolvidos na resposta ao tratamento da doença (Nunes *et al.*, 2018). Na certeza de que é preciso adicionar conhecimento sobre o tema à literatura, o presente estudo teve a finalidade de identificar miRNAs reguladores de genes com expressão diferenciada no transcriptoma de indivíduos com LC, a fim de esclarecer o papel dessas moléculas na infecção causada por *L. braziliensis* e que leva ao desenvolvimento da lesão. Em adição, buscamos possíveis correlações com parâmetros clínicos relevantes dessa doença.

Nossos resultados mostram que os miRNAs miR-361-3p, -103a-2-5p, -140-3p e -205-3p possuem um perfil de expressão aumentada na lesão de indivíduos infectados com LC em relação à pele normal, evidenciando que a infecção por *L. braziliensis* altera a expressão dos miRNAs no ambiente tecidual. Com relação aos genes-alvo dos miRNAs miR-361-3p e miR-140-3p, os genes TNF, GZMB e NKG7 tiveram expressão aumentada nas lesões de indivíduos infectados por *L. braziliensis* (Novais *et al.*, 2014). De um modo geral é postulado que há uma relação inversa na expressão do miRNA em relação aos seus genes alvo, ou seja, à medida que a expressão do miRNA aumenta no microambiente, a expressão do gene tende a cair. Porém, ao contrário do esperado, observamos que o miR-361-3p e o miR-140-3p se mostraram significativamente mais expressos nas lesões de indivíduos infectados. Essa expressão elevada pode estar ocorrendo numa tentativa desses miRNAs de conterem a expressão também exacerbada dos seus genes-alvo no sítio da lesão. Alternativamente, uma outra abordagem que poderia explicar este resultado seria que esses miRNAs induzam a expressão desses

genes na região promotora. Desse modo, nossos resultados estariam de acordo com Zhang *et al.*, 2014, que, analisando a expressão do *let-7i* em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com HIV-1, constatou que este miRNA se associa com a RNA polimerase II (POL II) no núcleo celular, onde se liga especificamente ao elemento promotor TATA box de seu genes-alvo, elevando assim os níveis do mRNA e a produção de proteínas. Do mesmo modo, outros miRNAs celulares como o miR-138 e miR-92a, também aumentaram as atividades do promotor através da ligação aos motivos TATA-box. Adicionalmente, mais estudos demonstraram que diversos miRNAs podem induzir a expressão de genes se ligando a sequências complementares ao promotor (Place *et al.*, 2008; Li L-C *et al.*, 2006). Estes achados indicam um mecanismo regulador adicional da expressão gênica por miRNAs. Dessa forma, hipotetizamos que o aumento do miR-361-3p e miR-140-3p pode induzir a expressão de seus genes-alvos em lesões de pacientes infectados por *L. braziliensis*, colaborando para o aumento do dano tecidual observado. Porém, apenas estudos funcionais poderiam esclarecer o real mecanismo de ação que ocorreria na infecção *in vivo*.

A busca por correlações com parâmetros clínicos foi uma estratégia empregada neste trabalho com o intuito de explorar dados potencialmente relevantes no contexto da patogênese da LC. Desta forma, resposta ao tratamento, tempo de cura, área da lesão, área da IDR e números de lesões ulceradas foram os parâmetros selecionados para correlação com a expressão de miRNAs detectados. Nossos resultados mostram de forma pioneira uma correlação direta entre um miRNA e ambos, resposta ao tratamento e tempo de cura na LC. E demonstram de maneira consistente que um miRNA regulador de genes importantes na imunopatogênese da LC como TNF e GZMB pode influenciar a resposta inflamatória ao ponto de refletir-se em desfechos clínicos relevantes como a resposta terapêutica e o tempo de cura da doença. Esses resultados tem um impacto muito grande, pois indicam que o miR-361-3p poderia ter valor prognóstico na evolução da LC e torna

esse marcador importante de se investigar do ponto de vista funcional. Da mesma forma, o miR-140-3p, apesar de não correlacionado a parâmetros clínicos pode ter um papel importante na imunopatogênese pois está com sua expressão aumentada seja na tentativa de regular o NKG7 ou, opostamente, contribuindo para o seu aumento, com consequências diretas na formação da úlcera leishmaniótica.

Diversos estudos demonstraram o envolvimento dos miRNAs no desenvolvimento da resposta imunológica. Desta forma, miRNAs circulantes detectados no plasma são de interesse clínico, devido a sua possível aplicação como biomarcadores detectáveis de forma minimamente invasiva. A quantificação de miRNAs circulantes é um desafio pelos níveis proteicos elevados e pela baixa concentração de RNA no plasma e soro. Neste estudo, não detectamos expressão dos miRNAs selecionados no plasma de pacientes com LC e controles sadios. Isso pode ser explicado por dois motivos: (1) limitação na capacidade de detecção do kit; (2) a expressão dos miRNAs avaliados pode ter uma ação mais local do que sistêmica, tornando difícil a sua detecção no plasma.

Em relação aos genes regulados pelos miRNAs escolhidos para este estudo, mecanismos citotóxicos mediado pelo recrutamento de células T NK e CD8+ em resposta à infecção por *L. braziliensis*, induzem citocinas pró-inflamatórias como TNF e consequentemente desempenham diversas funções dentro do organismo. Geralmente está ligado à resposta pró-inflamatória, sendo produzido por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, linfócitos T e induz tanto a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais quanto à produção de quimiocinas por diversas células (Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998; Bacellar *et al.*, 2002; Carvalho *et al.*, 2012). A enzima GZMB, também é uma importante molécula efetora de citotoxicidade, pois liga-se à superfície da célula-alvo e entra no citoplasma, ativando a cascata das caspases e induzindo a apoptose (Novais *et al.*, 2013, 2014). Do mesmo modo, dados anteriores reportaram uma correlação positiva entre a quantidade de GZMB de células T CD8 + e o tamanho da lesão (Santos *et al.*

2013). A granzima B pode indiretamente promover a inflamação através da ativação de citocinas como IL-18, IL-1 $\beta$  e IL-1 $\alpha$  (Omoto et al. 2010, Afonina et al. 2011, Hiebert & Granville 2012). Um provável mecanismo de como as células citotóxicas medeiam a inflamação e a lesão tecidual na LC é que, após a desgranulação das células citotóxicas, a granzima B e a perforina são liberadas no espaço extracelular, induzindo a apoptose de macrófagos infectados e células residentes. Além disso, a granzima B pode contribuir indiretamente para a inflamação pela ativação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF, bem como a degradação dos substratos da matriz extracelular (MEC), contribuindo para o dano tecidual (Campos et al., 2017) Já a quimiocina CXCL9 participa no recrutamento de células inflamatórias, sendo que a expressão excessiva dessa quimiocina traz mais células T CD8+ para a pele, exacerbando assim a imunopatogênese. (Novais *et al.*, 2014). O gene FLI1, desempenha um papel importante no processo de cura de lesão e polimorfismos em FLI1 foram previamente associados à susceptibilidade a LTA em Corte de Pedra (Nakerakanti *et al.*, 2006; Castellucci *et al.*, 2011). O gene NKG7, o qual é regulado pelo miR-140-3p, ativa células NK que produzem IFN $\gamma$  ativando macrófagos para destruir microrganismos fagocitados. O gene IL1- $\beta$  está relacionado ao inflammasoma, e promove aumento da inflamação, estimulando a produção de quimiocinas, como a IL-8, e também as metaloproteinases de matriz, que degradam a matriz extracelular levando ao dano tecidual (Pirmez *et al.*, 1993; Novais *et al.*, 2017).

Nosso estudo mostrou que a regulação por miRNAs é importante na patogênese da LC, contribuindo não só para o dano tecidual mas também para a falha terapêutica e aumento do tempo de cura em indivíduos refratários ao antimonial pentavalente. Em última instância, nossos resultados abrem perspectivas para novos estudos exploratórios envolvendo os miRNAs, assim como a realização de estudos funcionais que podem agregar novas informações úteis para o desenvolvimento de novas terapias e alvos vacinais em LTA.



## VIII. CONCLUSÕES

- 1) Os miR-361-3p e miR-140-3p possuem um perfil de expressão elevado nas lesões de LC em relação à pele normal de pacientes infectados por *L. braziliensis*, mostrando que a regulação destes miRNAs é importante na patogênese da LC.
- 2) O miR-361-3p foi correlacionado com falha terapêutica e com maior tempo de cura da doença, evidenciando o seu potencial como biomarcador de prognóstico na LC causada por *L. braziliensis*.

## IX. SUMMARY

American Cutaneous Leishmaniasis (ATL) is a parasitic infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and it is between the endemics with the greatest impact on public health due to its globalized distribution and limitations regarding diagnosis, treatment and control in endemic areas. In recent years, studies of the ability of *Leishmania* spp. of altering the transcriptome of infected cells and tissues, has certainly added knowledge to the mechanisms of disease immunopathogenesis. **Objectives:** To evaluate in skin and plasma the expression of miRNAs that regulates genes highly expressed in lesions of cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *Leishmania braziliensis*; To correlate the miRNAs expression with relevant clinical parameters of participants (IDRM area, size of lesions, healing time and therapeutic response). **Methods:** Two skin biopsies from twenty five patients with CL infected by *L. braziliensis* (injured skin and healthy skin) and twelve plasma samples from individuals with CL and healthy controls were obtained. For the RNA extraction of skin and plasma we used the methods of TRIzol and the commercial kit MagMAX™ *mirVana*™ (Thermo Fisher), respectively. To obtain complementary DNA (cDNA) we used the commercially available TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher), following the manufacturer's guidelines. Expression levels of candidate miRNAs in cutaneous and plasma biopsies were detected by qPCR using pre-designed TaqMan® assays (Thermo Fisher). Data were analyzed using the non-parametric Mann-Whitney test for comparison of CL skin with normal skin data; Spearman correlation, Kaplan-Meier survival analysis, and ROC curve using GraphPad Prism 5 software were used for evaluations of the expression profile of the miRNAs and the clinical parameters evaluated. **Results:** Of the fourteen miRNAs tested, four showed expression in the tissues: miR-361-3p, -103a-2-5p, -140-3p and -205-3p. The miRNAs miR-361-3p and -140-3p were significantly more expressed in the CL lesions when compared to normal skin samples ( $p=0.0001$  and  $p<0.0001$ , respectively). In addition, we observed an association between the miR-361-3p expression and therapeutic failure ( $p = 0.0071$ ) and a direct correlation between the miR-361-3p expression and greater healing time ( $r=0.5$  and  $p=0.007$ ). Additionally, complementary analysis have shown that miR-361-3p is able to identify patients with good sensitivity (81.2%) and specificity (100%) who tend to fail initial treatment with antimonial (area under the ROC curve 0.95;  $p=0.006$ ). Finally, the survival curve taking the cure time as the endpoint showed that the greater the miR-361-3p expression, the longer the healing time of the CL ulcers. We did not observe expression of selected miRNAs in plasma. **Conclusion:** miR-361-3p and miR-140-3p have a differentiated expression profile in the lesions of CL in relation to the normal skin of patients infected by *L. braziliensis*, showing that miRNAs regulation is important in the pathogenesis of CL; The miR-361-3p was correlated with therapeutic failure and with healing time, evidencing its potential as a prognostic biomarker in CL caused by *L. braziliensis*.

**Keywords:** 1. miRNAs; 2. American Cutaneous Leishmaniasis; 3. Gene expression; 4. Tissue damage; 5. Immunopathogenesis

## X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonina, I. S., G. A. Tynan, et al. (2011). Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the pro-inflammatory activity of IL-1 $\alpha$ . Molecular cell **44**(2): 265-278.
- Almeida, M. A. O., E. E. V. Jesus, et al. (2005). Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. Vet Parasitol **127**(3): 227-232.
- Alvar J., I. D. Vélez, et al. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS One **7**(5): e35671.
- Ambros, V., B. Bartel, et al. (2003). A uniform system for microRNA annotation. RNA **9**(3): 277-279.
- Bacellar, O., H. LESSA, et al. (2002). Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. Infect Immun **70**(12): 6734-6740.
- Barral, A., M. Barral-Netto, et al. (1992). Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. Am J Trop Med Hyg **47**(5): 587-592.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs. Cell **116**(2): 281-297.
- Basano, S. D. A. and L. M. A. Camargo (2004). Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. Revista Brasileira de Epidemiologia **7**: 328-337.
- Baylin, S. B., M. Esteller, et al. (2001). Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. Hum Mol Genet **10**(7): 687-692.
- Besteiro, S., R. A. M. Williams, et al. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. Int J Parasitol **37**(10): 1063-1075.
- Blenkiron, C. and E. A. Miska (2007). miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy." Hum Mol Genet **16**(R1): R106-R113.
- Blum, J., P. Desjeux, et al. (2004). Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **53**(2): 158-166.
- Bogdan, C., R. Martin., D. Andreas (2000). The role of nitric oxide in innate immunity. Immunological reviews, **173**(1): 17-26.
- Bostjancic, E., Z. Nina., G. Damjan (2012). MicroRNAs and cardiac sarcoplasmic reticulum calcium ATPase-2 in human myocardial infarction: expression and bioinformatic analysis. BMC genomics, **13**(1): 552.
- Bottrel, R. L., Dutra, W. O.; Martins, F. A., et al. (2001). Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. Infection and Immunity, v. 69, n. 5, p. 3232–3239

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana: normas e manuais técnicos. Brasília, DF, 2007.

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Brasília-DF, 2017.

Brodskyn, C. I. *et al.* (1997). Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), v. 159, n. 9, p. 4467-73, 1 nov.

Cai, P., X. Piao, *et al.* (2013). MicroRNA-Gene Expression Network in Murine Liver during *Schistosoma japonicum* Infection. *PLoS One* **8**(6): e67037.

Calin, G. A., C. D. Dumitru, *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(24): 15524-15529.

Campos, T. M., R. Costa, *et al.* (2017). Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **112**(11): 733-740.

Castellucci, L., S. E. Jamieson, *et al.* (2011). FLI1 polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Genes and Immunity* **12**(7): 589-594.

Cao X.Y., J.M. Lu, *et al.* (2017). MicroRNA biomarkers of Parkinson's disease in serum exosome-like microvesicles. *Neurosci Lett* **644**(Supplement C): 94-99.

Carninci, Pea *et al.* (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science*, 309(5740): 1559-1563.

Carrington, J. C. and V. Ambros (2003). Role of MicroRNAs in Plant and Animal Development. *Science* **301**(5631): 336.

Carvalho, E. M., A. Barral, *et al.* (1994). Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* **56**(4): 315-325.

Carvalho, Edgar M. *et al.*(1995). Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 53(3): 273-277.

Carvalho, L. P., S. Passos, *et al.* (2012). Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* **3**: 301.

Chamnanchanunt, S., S. Fucharoen, *et al.* (2017). Circulating microRNAs in malaria infection: bench to bedside. *Malaria Journal* **16**: 334.

Chen, J., Z.P. Huang, *et al.* (2013). mir-17-92 Cluster is Required for and Sufficient to Induce Cardiomyocyte Proliferation in Postnatal and Adult Hearts. *Circ Res* **112**(12): 1557-1566.

Cheng, Y., P. Zhu, *et al.* (2010). Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. Cardiovascular Research **87**(3): 431-439.

Chowdhari, S., K. Sardana, *et al.* (2017). miR-4516, a microRNA downregulated in psoriasis inhibits keratinocyte motility by targeting fibronectin/integrin  $\alpha 9$  signaling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1863**(12): 3142-3152.

Copier, C. U., L. León, *et al.* (2017). Circulating miR-19b and miR-181b are potential biomarkers for diabetic cardiomyopathy. Sci Rep **7**: 13514.

Costa, J. M., P. D. Marsden, *et al.* (1986). Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. The Journal of tropical medicine and hygiene **89**(6): 319-323.

Cowland, J. B., C. Hother, *et al.* (2007). MicroRNAs and cancer. APMIS **115**(10): 1090-1106.

Cupolillo, Elisa *et al.* (2003). Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. Journal of clinical microbiology, **41**(7): 3126-3132.

D'Agostino, D. M., P. Zanovello, *et al.* (2012). The MicroRNA Regulatory Network in Normal- and HTLV-1-Transformed T Cells. Advances in Cancer Research. K. D. Tew and P. B. Fisher, Academic Press. **113**: 45-83.

Das, P. M. and R. Singal (2004). DNA Methylation and Cancer. Journal of Clinical Oncology **22**(22): 4632-4642.

Desjeux, P. (1996). Leishmaniasis: Public health aspects and control." Clinics in Dermatology **14**(5): 417-423.

Etheridge, Alton *et al.* (2011) Extracellular microRNA: a new source of biomarkers. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, **717**(1): 85-90.

Faria, D. R. *et al.* (2009). Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. Parasite immunology, v. 31, n. 8, p. 432-9, ago

Fenoglio, C., C. Cantoni, *et al.* (2011). Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4+ cell activation in patients with multiple sclerosis. Neurosci Lett **504**(1): 9-12.

Ferreira, L. R. P., A. F. Frade, *et al.* (2014). MicroRNAs dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy. International Journal of Cardiology **175**(3): 409-417.

Follador, I.; Araujo, C.; Bacellar, O.; *et al.*(2002). Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. Clinical Infectious Diseases, v. 34, n. 11, p. E54-8

- Franke, E. D., F. Wignall, *et al.* (1990). Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. Annals of Internal Medicine **113**(12): 934-940.
- Friedman, R. C., K. K.H. Farh, *et al.* (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome Res **19**(1): 92-105.
- Frigerio, Carlo Sala *et al.* (2013). Reduced expression of hsa-miR-27a-3p in CSF of patients with Alzheimer disease. Neurology, 81(24): 2103-2106.
- Geraci, N. S., J. C. Tan, *et al.* (2015). Characterization of microRNA Expression Profiles in Leishmania Infected Human Phagocytes. Parasite Immunol **37**(1): 43-51.
- Ghisi, M., A. Corradin, *et al.* (2011). Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. Blood **117**(26): 7053.
- Ghosh, J., M. Bose, *et al.* (2013). Leishmania donovani Targets Dicer1 to Downregulate miR-122, Lower Serum Cholesterol, and Facilitate Murine Liver Infection. Cell Host & Microbe **13**(3): 277-288.
- Gontijo, B.(2003). Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. Medicina Tropical, v. 36, n. 13, p. 71–80
- Guan, X., Y. YI, *et al.* (2015). Revealing potential molecular targets bridging colitis and colorectal cancer based on multidimensional integration strategy. Oncotarget **6**(35): 37600-37612.
- Guimarães, L. H., P. R. L. Machado, *et al.* (2009). Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of Leishmania braziliensis in the state of Bahia, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg **103**(7): 712-715.
- Guttman, M., I. Amit, *et al.* (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. Nature **458**: 223.
- Ha, M. and V. N. Kim (2014). Regulation of microRNA biogenesis. Nature Reviews Molecular Cell Biology **15**: 509.
- He, X., X. Sai, *et al.* (2013). Host serum miR-223 is a potential new biomarker for Schistosoma japonicum infection and the response to chemotherapy. Parasit Vectors **6**: 272-272.
- Hiebert, P. R. and D. J. Granville (2012). Granzyme B in injury, inflammation, and repair. Trends in Molecular Medicine **18**(12): 732-741.
- Honda, N., M. Jinnin, *et al.* (2013). miR-150 Down-Regulation Contributes to the Constitutive Type I Collagen Overexpression in Scleroderma Dermal Fibroblasts via the Induction of integrin  $\beta 3$ . The American Journal of Pathology **182**(1): 206-216.

Hu, Z., X. Chen, *et al.* (2010). Serum MicroRNA Signatures Identified in a Genome-Wide Serum MicroRNA Expression Profiling Predict Survival of Non-Small-Cell Lung Cancer. Journal of Clinical Oncology **28**(10): 1721-1726.

Huang, W., S.S. Tian, *et al.* (2016). Combination of microRNA-21 and microRNA-146a Attenuates Cardiac Dysfunction and Apoptosis During Acute Myocardial Infarction in Mice. Molecular Therapy. Nucleic Acids **5**(3): e296.

Hui, J. and A. Bindereif (2005). Alternative pre-mRNA splicing in the human system: unexpected role of repetitive sequences as regulatory elements. Biological Chemistry. **386**: 1265.

<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>

Iorio, M. V. and C. M. Croce (2012). microRNA involvement in human cancer. Carcinogenesis **33**(6): 1126-1133.

Jangra, R. K., M. Yi, *et al.* (2010). Regulation of Hepatitis C Virus Translation and Infectious Virus Production by the MicroRNA miR-122. Journal of Virology **84**(13): 6615-6625.

Jinnin, M. (2014). Various applications of microRNAs in skin diseases. Journal of Dermatological Science **74**(1): 3-8.

Jopling, C. L., M. Yi, *et al.* (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. Science **309**(5740): 1577.

Joyce, C. E., X. Zhou, *et al.* (2011). Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. Hum Mol Genet **20**(20): 4025-4040.

Kapranov, Philipp; Willingham, Aaron T.; Gingeras, Thomas R.(2007). Genome-wide transcription and the implications for genomic organization. Nature Reviews Genetics, **8**(6): 413.

Kawashita, Y., M. Jinnin, *et al.* (2011). Circulating miR-29a levels in patients with scleroderma spectrum disorder. Journal of Dermatological Science **61**(1): 67-69.

Kaye, P.; Scott, P.(2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol, v. 9, n. 8, p. 604–615

Keller, A., P. Leidinger, *et al.* (2009). Multiple Sclerosis: MicroRNA Expression Profiles Accurately Differentiate Patients with Relapsing-Remitting Disease from Healthy Controls. PLoS One **4**(10): e7440.

Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nature Reviews Molecular Cell Biology **6**: 376.

Kozaki, K.I., I. Imoto, *et al.* (2008). Exploration of Tumor-Suppressive MicroRNAs Silenced by DNA Hypermethylation in Oral Cancer. Cancer Res **68**(7): 2094.

- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, *et al.* (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell **75**(5): 843-854.
- Lemaire, J., G. Mkannez, *et al.* (2013). MicroRNA Expression Profile in Human Macrophages in Response to *Leishmania major* Infection. PLoS Negl Trop Dis **7**(10): e2478.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, *et al.* (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. Cell **115**(7): 787-798.
- Lewis, B. P., C. B. Burge, *et al.* (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. Cell **120**(1): 15-20.
- Li, L.-C., S. T. Okino, *et al.* (2006). Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(46): 17337-17342.
- Lim, L. P., N. C. Lau, *et al.* (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature **433**: 769.
- Lindberg, R. L. P., F. Hoffmann, *et al.* (2010). Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing–remitting multiple sclerosis patients. Eur J Immunol **40**(3): 888-898.
- Linhares-Lacerda, L., C. C. Palu, *et al.* (2015). Differential Expression of microRNAs in Thymic Epithelial Cells from *Trypanosoma cruzi* Acutely Infected Mice: Putative Role in Thymic Atrophy. Frontiers in Immunology **6**: 428.
- Linhares-Lacerda, L. and A. Morrot (2016). Role of Small RNAs in Trypanosomatid Infections. Frontiers in Microbiology **7**: 367.
- Liu, P. T., M. Wheelwright, *et al.* (2012). MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. Nature medicine **18**(2): 267-273.
- Londin, E., P. Loher, *et al.* (2015). Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. Proc Natl Acad Sci U S A **112**(10): E1106-E1115.
- Lorenzi, J. C. C., D. G. Brum, *et al.* (2012). miR-15a and 16-1 Are Downregulated in CD4+ T Cells of Multiple Sclerosis Relapsing Patients. International Journal of Neuroscience **122**(8): 466-471.
- Machado-Coelho, G. L. L., W. T. Caiaffa, *et al.* (2005). Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg **99**(1): 55-61.
- Machado, P. R. L., H. Lessa, *et al.* (2007). Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases **44**(6): 788-793.



Machado, P. R., J. Ampuero, *et al.* (2010). Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. PLoS Negl Trop Dis **4**(12): e912.

Machado, P. R. *et al.* (2011). Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 105, n. 8, p. 438-44

Marsden, P. D. (1985). Clinical presentations of *Leishmania braziliensis* braziliensis. Parasitology Today **1**(5): 129-133.

Mattick, J. S. and M. J. Gagen (2001). The Evolution of Controlled Multitasked Gene Networks: The Role of Introns and Other Noncoding RNAs in the Development of Complex Organisms. Molecular Biology and Evolution **18**(9): 1611-1630.

Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2005). Small regulatory RNAs in mammals. Hum Mol Genet **14**(suppl\_1): R121-R132.

Mattick, J. S. (2005). The Functional Genomics of Noncoding RNA. Science **309**(5740): 1527.

Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2006). Non-coding RNA. Hum Mol Genet **15**(suppl\_1): R17-R29.

Mattick, J. S., P. P. Amaral, *et al.* (2009). RNA regulation of epigenetic processes. BioEssays **31**(1): 51-59.

Medeiros, A. C. R. and A. M. F. Roselino (1999). Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje Cutaneous American Leishmaniasis: from the beginning until nowadays.

Meisgen, F., N. Xu, *et al.* (2012). MiR-21 is up-regulated in psoriasis and suppresses T cell apoptosis. Experimental Dermatology **21**(4): 312-314.

Min, M., L. Peng, *et al.* (2014). MicroRNA-155 Is Involved in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis by Targeting FOXO3a.

Miranda, K. C., T. Huynh, *et al.* (2006). A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. Cell **126**(6): 1203-1217.

Morgan, D. J., L. H. Guimaraes, *et al.* (2007). Cutaneous Leishmaniasis during Pregnancy: Exuberant Lesions and Potential Fetal Complications. Clinical Infectious Diseases **45**(4): 478-482.

Morris, K. V (2005). siRNA-mediated transcriptional gene silencing: the potential mechanism and a possible role in the histone code. Cellular and Molecular Life Sciences. **62**(24): 3057–3066.

Mukherjee, A., A. M. Di Bisceglie, *et al.* (2015). Hepatitis C Virus-Mediated Enhancement of MicroRNA miR-373 Impairs the JAK/STAT Signaling Pathway. Journal of Virology **89**(6): 3356-3365.

Mukherjee, B., J. Paul, *et al.* (2015). Antimony-Resistant *Leishmania donovani*; Exploits miR-466i To Deactivate Host MyD88 for Regulating IL-10/IL-12 Levels during Early Hours of Infection. The Journal of Immunology **195**(6): 2731.

Murchison, E. P. and G. J. Hannon (2004). miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. Current Opinion in Cell Biology **16**(3): 223-229.

Murray, H. W., B. Y. Rubin, *et al.* (1983). Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. Journal of Clinical Investigation **72**(4): 1506-1510.

Nagalakshmi, U., Z. Wang, *et al.* (2008). The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. Science (New York, N.Y.) **320**(5881): 1344-1349.

Nakerakanti, S. S., Kapanadze, B., Yamasaki, M., Markiewicz, M., Trojanowska, M (2006). Fli1 and Ets1 have distinct roles in connective tissue growth factor/CCN2 gene regulation and induction of the profibrotic gene program. The Journal of Biological Chemistry **281**(35): 25259-69.

Navarro, I. C., F. M. Ferreira, *et al.* (2015). MicroRNA Transcriptome Profiling in Heart of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice: Parasitological and Cardiological Outcomes. PLoS Negl Trop Dis **9**(6): e0003828.

Negrão, GP. *et al.* (2009). American Tegumentary Leishmaniasis: geographical aspects intervening at the fact from the disease at Maringá municipality, Paraná. HYGEIA, **5**(8): 115-124.

Nicolete, L. D. D. F., R. Nicolete, *et al.* (2012). Upregulation of hsa-miR-125b in HTLV-1 asymptomatic carriers and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. Mem Inst Oswaldo Cruz **107**: 824-827.

Novais, F. O., Carvalho, L. P.; Graff, J. W.; *et al.*(2013). Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. PLoS Pathology, v. 9, n. 7, p. e1003504

Novais, F. O., L. P. Carvalho, *et al.* (2014). Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. The Journal of investigative dermatology **135**(1): 94-101

Novais, Fernanda O. *et al.* (2017). CD8+ T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 $\beta$  production. PLoS pathogens, **13**(2): e1006196.

Nunes, S., I. B. Silva, *et al.* (2018). Integrated Analysis Reveals That miR-193b, miR-671, and TREM-1 Correlate With a Good Response to Treatment of Human Localized

Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. Frontiers in Immunology **9**(640).

O'Connell, R. M., K. D. Taganov, *et al.* (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. Proc Natl Acad Sci U S A **104**(5): 1604-1609.

Omoto, Y., K. Yamanaka, *et al.* (2010). Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. Journal of Dermatological Science **59**(2): 129-135.

Ono, C., T. Fukuhara, *et al.* (2017). Characterization of miR-122-independent propagation of HCV. PLoS Pathog **13**(5): e1006374.

Otaegui, D., S. E. Baranzini, *et al.* (2009). Differential Micro RNA Expression in PBMC from Multiple Sclerosis Patients. PLoS One **4**(7): e6309.

Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, *et al.* (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature **408**: 86.

Pathak, S., A. R. Grillo, *et al.* (2015). MiR-155 modulates the inflammatory phenotype of intestinal myofibroblasts by targeting SOCS1 in ulcerative colitis. Experimental & Molecular Medicine **47**(5): e164.

Pearson, R. D. and S. Anastacio De Queiroz (1995). Clinical Spectrum of Leishmaniasis. Clinical Infectious Diseases **22**(1): 1-11.

Pichler, K., G. Schneider, *et al.* (2008). MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. Retrovirology **5**: 100-100.

Pirmez, C., M. Yamamura, *et al.* (1993). Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. Journal of Clinical Investigation **91**(4): 1390-1395.

Place, R. F., L.-C. Li, *et al.* (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **105**(5): 1608-1613.

Qi, Liwang *et al.* (2006). Genetic regulation by non-coding RNAs. Science in China Series C, **49**(3): 201-217.

Rahman, S., K. Quann, *et al.* (2012). HTLV-1 Tax Mediated Downregulation of miRNAs Associated with Chromatin Remodeling Factors in T Cells with Stably Integrated Viral Promoter. PLoS One **7**(4): e34490.

Rajewsky, N. (2006). microRNA target predictions in animals. Nat Genet **38**: S8.

Reinhart, B. J., F. J. Slack, *et al.* (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature **403**: 901.

Reithinger, R. *et al.* (2007). Cutaneous Leishmaniasis. The Lancet Infectious Diseases, **7**: 581-596.

- Reveiz, L., A. N. S. Maia-Elkhoury, *et al.* (2013). Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. PLoS One **8**(4): e61843.
- Ribeiro, J. M. C.(1987). Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. Annual Review of Entomology, v. 32, n. 1, p. 463–478
- Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, *et al.* (1998). Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research **31**: 143-148.
- Roth, C., B. Rack, *et al.* (2010). Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. Breast Cancer Res **12**(6): R90-R90.
- Rothhammer, T. and A. K. Bosserhoff (2007). Epigenetic events in malignant melanoma. Pigment Cell Research **20**(2): 92-111.
- Ruggero, K., A. Guffanti, *et al.* (2014). Small Noncoding RNAs in Cells Transformed by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: a Role for a tRNA Fragment as a Primer for Reverse Transcriptase. Journal of Virology **88**(7): 3612-3622.
- Santos, C. da S., Boaventura, V., Ribeiro Cardoso, C., *et al.* (2013). CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN $\gamma$ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. The Journal of investigative dermatology, v. 133, n. 6, p. 1533–40
- Schriefer, A., L. H. Guimarães, *et al.* (2009). Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil. Emerg Infect Dis **15**(6): 871-876.
- Singh, A. K., R. K. Pandey, *et al.* (2016). MicroRNA expression profiling of Leishmania donovani-infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy. Autophagy **12**(10): 1817-1831.
- Singh, U. P., A. E. Murphy, *et al.* (2014). miR-155 deficiency protects mice from experimental colitis by reducing T helper type 1/type 17 responses. Immunology **143**(3): 478-489.
- Singh, Y., V. Kaul, *et al.* (2013). Mycobacterium tuberculosis Controls MicroRNA-99b (miR-99b) Expression in Infected Murine Dendritic Cells to Modulate Host Immunity. J Biol Chem **288**(7): 5056-5061.
- Schmittgen, T.D., & Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature Protocols, **3**: 1101-1108.
- Soares, C. T., A. P. F. Trombone, *et al.* (2017). Differential Expression of MicroRNAs in Leprosy Skin Lesions. Frontiers in Immunology **8**: 1035.
- Sun, Yu *et al.* (2012). Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. PloS one, **7**(10): e47003.

- Svrcek, Magali *et al.* (2013). Overexpression of microRNAs-155 and 21 targeting mismatch repair proteins in inflammatory bowel diseases. Carcinogenesis, **34**(4) 828-834.
- Tan, L., J.T. Yu, *et al.* (2014). Genome-Wide Serum microRNA Expression Profiling Identifies Serum Biomarkers for Alzheimer's Disease.
- Titus, R. G.; Ribeiro, J. M. C.(1990). The role of vector saliva in transmission of vectorborne disease. Parasitol.Today, v. 6, n. 5, p. 157–160
- Tomita, M., Y. Tanaka, *et al.* (2012). MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells. Int J Cancer **130**(10): 2300-2309.
- Turetz, M. L., P. R. Machado, *et al.* (2002). Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. J Infect Dis **186**(12): 1829-1834.
- Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, *et al.* (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes & Development **20**(5): 515-524.
- Van Rooij, E., A. L. Purcell, *et al.* (2012). Developing MicroRNA Therapeutics. Circ Res **110**(3): 496.
- Vargas-Inchaustegui, D. A., A. E. Hogg, *et al.* (2010). CXCL10 Production by Human Monocytes in Response to Leishmania braziliensis Infection. Infect Immun **78**(1): 301-308.
- Wang, H.J., Y.Q. Guo, *et al.* (2013). miR-125b regulates side population in breast cancer and confers a chemoresistant phenotype. J Cell Biochem **114**(10): 2248-2257.
- Wang, J., J.T. Yu, *et al.* (2015). Genome-wide circulating microRNA expression profiling indicates biomarkers for epilepsy. Sci Rep **5**: 9522.
- Weigle, K. and N. G. Saravia (1996). Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. Clinics in Dermatology **14**(5): 433-450.
- World Health Organization. Control of the leishmaniasis. WHO, 1990.
- World Health Organization. Epidemiological situation. WHO, 2015
- Wu, Z., H. Lu, *et al.* (2012). Inductive microRNA-21 impairs anti-mycobacterial responses by targeting IL-12 and Bcl-2. FEBS Lett **586**(16): 2459-2467.
- Xia, J. and W. Zhang (2014). MicroRNAs in normal and psoriatic skin. Physiological Genomics **46**(4): 113-122.
- Xu, G., Z. Zhang, *et al.* (2013). microR-142-3p down-regulates IRAK-1 in response to Mycobacterium bovis BCG infection in macrophages. Tuberculosis **93**(6): 606-611.
- Yan, S., Z. Xu, *et al.* (2015). NF-κB-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. Nat Commun **6**: 7652.

Yani LV, *et al.* (2014). Profiling of serum and urinary microRNAs in children with atopic dermatitis. PloS one, **9**(12):e115448.

Zeng, H., Fang, C., Nam, S., Cai, Q., & Long, X. (2014). The Clinicopathological Significance of MicroRNA155 in Breast Cancer : A Meta-Analysis.

Zhang, Y., M. Fan, *et al.* (2014). A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. Retrovirology 11: 23-23.

Zheng, Shu-Rong *et al.* (2012). Clinical significance of miR-155 expression in breast cancer and effects of miR-155 ASO on cell viability and apoptosis. Oncology reports, **27**(4): 1149-1155.

Zhu, D., X. He, *et al.* (2014). Expression of microRNA-454 in TGF- $\beta$ 1-stimulated hepatic stellate cells and in mouse livers infected with *Schistosoma japonicum*. Parasit Vectors **7**: 148-148.

Zuo J, Yu Y, Zhu M, Jing W, Yu M, Chai H, Liang C, Tu J. (2018). Inhibition of miR-155, a therapeutic target for breast cancer, prevented in cancer stem cell formation. Cancer Biomark. **2**: 383-392.

## **XI. ANEXOS**

### **XI.1. PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

1. The miRNA 361-3p, a regulator of GZMB and TNF is associated with therapeutic failure and longer time healing of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (Viannia) braziliensis*.

## THE miRNA 361-3p, A REGULATOR OF GZMB AND TNF IS ASSOCIATED WITH THERAPEUTIC FAILURE AND LONGER TIME HEALING OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY L. (VIANNIA) BRAZILIENSIS.

Tainã S. Lago<sup>1,2</sup>, Juliana A. Silva<sup>1</sup>, Ednaldo L. Lago<sup>1</sup>, Edgar M. Carvalho<sup>1,3,4,2</sup>, Dalila L. Zanette<sup>5</sup>, Léa Cristina De C. Castellucci<sup>1,3,2\*</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Brazil, <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Brazil, <sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT), Brazil, <sup>4</sup>Laboratório de Pesquisa Clínica (LAPEC), Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fiocruz Bahia, Brazil, <sup>5</sup>Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional, Instituto Gonçalo Moniz (IGM), Fiocruz Bahia, Brazil

*Submitted to Journal:*  
Frontiers in Immunology

*Specialty Section:*  
Microbial Immunology

*Article type:*  
Original Research Article

*Manuscript ID:*  
400525

*Received on:*  
24 May 2018

*Frontiers website link:*  
[www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

---



### Conflict of Interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

### Author contribution statement

TL conducted molecular biology experiments and analyzed and interpreted data. JS supported the sample collection. EL assisted in the recruitment and segment of patients. EC enrolled the study participants and helped to analyze data and draft the manuscript. DZ participated in the study design and helped with quality control and data analysis. LC conceived the study and participated in its design, helped to analyze and interpret the data, and drafted the manuscript.

### Keywords

miRNAs, American cutaneous leishmaniasis, Gene Expression, Tissue damage, Immunopathogenesis

### Abstract

Word count: 261

*L. (Viannia) braziliensis* infection causes American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), with prolonged time to healing lesions. The potent inflammatory response developed by the host is important to control the parasite burden and infection however an unbalanced immunity may cooperate to the tissue damage observed. The mechanisms underlying the pathological responses associated with ATL remain to be better understood. That includes epigenetic regulation by non-coding MicroRNAs (miRNAs), sequences around 22 nucleotides that act as post-transcriptional regulators of RNAs encoding proteins. The miRNAs have been associated with parasitic diseases, including leishmaniasis. Here we evaluated miRNAs that targeted genes expressed in cutaneous leishmaniasis lesions (CL) by comparing its expression in both CL and normal skin obtained from the same individual. In addition, we evaluated if the miRNAs expression would be correlated with clinical parameters such as therapeutic failure, healing time as well as lesion size. The miR-361-3p and miR-140-3p were significantly more expressed in CL lesions compared to normal skin samples ( $p = 0.0001$  and  $p = 0.0001$ , respectively). In addition, the miR-361-3p was correlated with both, therapeutic failure and healing time of disease ( $r = 0.6$ ,  $p = 0.003$  and  $r = 0.5$ ,  $p = 0.007$ , respectively). In addition, complementary analysis shown that miR-361-3p is able to identify with good sensitivity (81.2%) and specificity (100%) patients who tend to fail initial treatment with pentavalent antimonial (5bv). Finally, the survival analysis considering "cure" as the endpoint showed that the higher the expression of miR-361-3p, the longer the healing time of CL. Overall, our data suggest the potential of miR-361-3p as a prognostic biomarker in CL caused by *L. braziliensis*.

### Funding statement

This work was sponsored by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT N° 573839/2008-5) and National Institutes of Health (Grant AI 30639). EC is senior investigator of the National Council for Research (CNPq). TL was fellow from CAPES.

### Ethics statements

(Authors are required to state the ethical considerations of their study in the manuscript, including for cases where the study was exempt from ethical approval procedures)

Does the study presented in the manuscript involve human or animal subjects: Yes

Please provide the complete ethics statement for your manuscript. Note that the statement will be directly added to the manuscript file for peer-review, and should include the following information:

- Full name of the ethics committee that approved the study
- Consent procedure used for human participants or for animal owners
- Any additional considerations of the study in cases where vulnerable populations were involved, for example minors, persons with disabilities or endangered animal species

As per the Frontiers authors guidelines, you are required to use the following format for statements involving human subjects:

*This study was carried out in accordance with the recommendations of [name of guidelines], [name of committee]. The protocol was approved by the [name of committee]. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.*

*For statements involving animal subjects, please use:*

*This study was carried out in accordance with the recommendations of 'name of guidelines, name of committee'. The protocol was approved by the 'name of committee'.*

*If the study was exempt from one or more of the above requirements, please provide a statement with the reason for the exemption(s).*

*Ensure that your statement is phrased in a complete way, with clear and concise sentences.*

*This study adhered to the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital Universitário Professor Edgard Santos Ethics Committee at Universidade Federal da Bahia (CEP 22/2012) and the Brazilian National Ethical Committee (CONEP: 1258513.1.000.5537). A written informed consent was obtained from every individual who accepted to participate in this study.*

In review

*Original Article*

Running head: *miRNAs expression and cutaneous leishmaniasis*

**THE miRNA 361-3p, A REGULATOR OF GZMB AND TNF IS ASSOCIATED WITH THERAPEUTIC FAILURE AND LONGER TIME HEALING OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *L. (VIANNIA) BRAZILIENSIS*.**

Tainã S. Lago<sup>1,4</sup>, Juliana Almeida Silva<sup>1</sup>, Ednaldo L. Lago<sup>1</sup>, Edgar M. Carvalho<sup>1,2,3,5</sup>, Dalila L. Zanette<sup>4</sup> and Léa Cristina Castellucci<sup>4,1,3,5</sup>

<sup>1</sup> Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa Clínica (LAPEC) do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz-Ba, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz-Ba, Salvador, Bahia, Brasil

<sup>5</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

Email addresses:

TSL: [tataylago@gmail.com](mailto:tataylago@gmail.com)

JAS: [july\\_meida@yahoo.com.br](mailto:july_meida@yahoo.com.br)

ELL: [ednaldo-lago@ig.com.br](mailto:ednaldo-lago@ig.com.br)

EMC: [edgar@ufba.br](mailto:edgar@ufba.br)

DLZ: [zanettedl@gmail.com](mailto:zanettedl@gmail.com)

LCC: [leacastel@hotmail.com](mailto:leacastel@hotmail.com)

## ABSTRACT

*L. (Viannia) braziliensis* infection causes American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), with prolonged time to healing lesions. The potent inflammatory response developed by the host is important to control the parasite burden and infection however an unbalanced immunity may cooperate to the tissue damage observed. The mechanisms underlying the pathological responses associated with ATL remain to be better understood. That includes epigenetic regulation by non-coding MicroRNAs (miRNAs), sequences around 22 nucleotides that act as post-transcriptional regulators of RNAs encoding proteins. The miRNAs have been associated with parasitic diseases, including leishmaniasis. Here we evaluated miRNAs that targeted genes expressed in cutaneous leishmaniasis lesions (CL) by comparing its expression in both CL and normal skin obtained from the same individual. In addition, we evaluated if the miRNAs expression would be correlated with clinical parameters such as therapeutic failure, healing time as well as lesion size. The miR-361-3p and miR-140-3p were significantly more expressed in CL lesions compared to normal skin samples ( $p = 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively). In addition, the miR-361-3p was correlated with both, therapeutic failure and healing time of disease ( $r = 0.6$ ,  $p = 0.003$  and  $r = 0.5$ ,  $p = 0.007$ , respectively). In addition, complementary analysis shown that miR-361-3p is able to identify with good sensitivity (81.2%) and specificity (100%) patients who tend to fail initial treatment with pentavalent antimonial (Sbv). Finally, the survival analysis considering "cure" as the endpoint showed that the higher the expression of miR-361-3p, the longer the healing time of CL. Overall, our data suggest the potential of miR-361-3p as a prognostic biomarker in CL caused by *L. braziliensis*.

**Key words:** miRNAs, American Cutaneous Leishmaniasis, Gene expression, Tissue damage, Immunopathogenesis

## INTRODUCTION

American tegumentar leishmaniasis (ATL) is a complex, multifactorial disease that results from environmental factors such as parasite polymorphisms, phlebotomine sand fly components, as well as the host's immune and genetic background (1). This disease extends from Mexico to Argentina (2), and is caused by various species of the *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana* complexes of parasites (3). *Leishmania (Viannia) braziliensis* is responsible for the majority of ATL cases in South America, causing localized cutaneous (CL) and mucosal leishmaniasis (ML) (4). This species has also been implicated in the emergence of new syndromes like disseminated leishmaniasis (DL) and atypical cutaneous leishmaniasis (ACL) in Northeast Brazil. The CL is the most common clinical form and is characterized by one or more granulomatous ulcers often located in the upper and lower limbs, but also in the head, face and trunk (5). This is a disease where the outcome of the infection depends on both the extent of parasite elimination and the relative induction of potentially immunopathologic responses (6). In this context, we believe that host-parasite interaction hides key mechanisms of disease outcome and this interface is finely regulated by epigenetic mechanisms. Broadly speaking, epigenetics refers to stimuli-triggered changes in gene expression due to processes that arise independent of changes in the underlying DNA sequence. Some of these processes have been elucidated and include DNA methylation (7), histone modifications and chromatin-remodeling proteins (8), and DNA silencing by noncoding RNAs, including miRNAs (9). The microRNAs are non-coding RNAs consisting of a sequence of about 22 nucleotides, which act as post-transcriptional regulators by interfering in processing and stability of RNA coding proteins. Since their identification, miRNAs have been associated to numerous biological and pathological processes, including several inflammatory and infectious diseases (10-14). Regarding leishmaniasis although there is now an increasing body of evidence underpinning alterations of these small RNAs in different models (15-18), there is a paucity of studies performed with human samples. As examples, data showed changes in the expression of miRNAs in human macrophages infected by *L.major*, with some of these miRNAs involved in the activation of monocytes through TLR signaling (19). In addition, there was a species-specific global downregulation in miRNA expression among host cells following infection with *L.major* and *L.donovani*, which showed enrichment of MAP kinase, JAK-STAT and TGF- $\beta$  signaling pathways after *in silico*-predicted targets analysis (20). Finally, in a recent study, the miR-193b, miR-671, and *TREMI* were correlated with faster wound healing in patients infected by *L.braziliensis* (21). All together these data support the idea that the host cell undergoes selection and specific miRNA regulation after infection with *Leishmania* parasites. However, it is necessary to add to the literature data on how these molecules are expressed in specimens of patients. In this study we used a previously published transcriptional analysis comparing CL lesion samples and normal skin of patients infected *L. braziliensis* (GEO accession number GSE55664), which showed that genes associated with inflammatory cell recruitment (*CXCL9*, *CXCL10* and *CCL8*) and cytotoxicity (*GZMA*, *GZMB*, and *GLYN*) were highly expressed in *L.braziliensis* lesions. In contrast, the most down-regulated genes were associated with maintenance of the epidermal barrier function (22). Based on this previous study, we aimed to identify the miRNAs that could act as regulators of differentially genes found in CL lesions and thus, be potential markers of immune response and tissue damage, as well as modifiers of clinical parameters such as disease severity, response to treatment and healing time.

---

## MATERIAL AND METHODS

### The Endemic Site

The study was conducted in the rural area of Corte de Pedra, Bahia, Brazil, where ATL caused by *L. braziliensis* is endemic. The area of Corte de Pedra is characterized by isolated sites of Atlantic forest with agricultural activities providing the main source of income for the majority of its inhabitants (23). The occupational and domestic habits of these individuals, which involve work on farms and homes built in clearings in the woods, have increased the population exposure to *L. braziliensis* infection. Between the years 2012 and 2017, 6,597 cases of ATL were reported in the region of Corte de Pedra. As other endemic foci, the cure rates of antimonial pentavalent (Sbv) declined from 90% to 50% in the last 30 years (24-26).

### Patient Recruitment and Clinical Data

Twenty five patients with CL, enrolled after diagnosis and prior treatment, of both sexes and aged between 18 and 60 years, were recruited at the health clinic of Corte de Pedra-BA. Patients who had other clinical forms of the disease, pregnant and carriers of systemic diseases were excluded. CL was defined by the presence of one or a few ulcerative cutaneous lesions with raised borders and no evidence of mucosal involvement. All patients had clinical diagnosis confirmed by DNA detection of the parasite by PCR in biopsy specimens. Demographic features, illness duration, number of lesions, location and size of the ulcers were recorded. All patients were treated with antimoniate of meglumine (Glucantime, Sanofi/Avetis), as recommended by the Brazilian Minister of Health. The Glucantime (Sanofi/Aventis) was administration by intravenous route daily in a concentration of 20mg/Kg/day for 20 days. Cure was defined as a complete healing of ulcers in the absence of raised borders on day 90 and failure by persistence of active ulcer or healing of the lesion but with raised edges. All these data were taken into account in our analysis, in an attempt to identify a correlation between these data and the miRNA expression. Finally, we classified the patients in two groups according to treatment response to Sbv. We defined as “responders”, those who cured their lesion with a single course of Sbv on day 90; while “refractories” were those who needed two or more courses of Sbv or other alternative drug and took more than 90 days to heal their lesions. This stratification was used to perform correlation analysis regarding therapy failure and healing time.

### Sample Collection and RNA Extraction

Two tissue specimens were obtained from each patient: a normal skin biopsy was took from a distant site of the CL lesion, whereas a CL biopsy was collected from the border of the lesion. These biopsies were collected by a physician, using a 4mm punch and immediately preserved in RNA Later Solution (Ambion), until further RNA isolation. The tissue was intensely macerated using the TissueRuptor (Qiagen) followed by TRIzol RNA isolation, according to manufacturer's instructions. The isolated RNA was resuspended in 20 µl of RNase-free water and concentration determined by optical density measurements (260nm and 280nm) using Nanodrop®. Samples were stored at -70°C until use.

### cDNA Synthesis and Evaluation of miRNA Expression by Quantitative RT-PCR (qPCR)

By filtering information from the public databases TargetScan Human Prediction Tool version 7.0 and miRBase (release 22) we choose candidate miRNAs that were indicated as regulators of the differentially expressed genes described by Novais *et al.*, 2014 (22). Reverse transcription and complementary DNA (cDNA) synthesis were performed using the commercially available TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's instructions. The expression of candidate miRNAs in skin biopsies of patients with CL was evaluated by the real-time quantitative PCR (qPCR) technique using TaqMan® Advanced miRNA assays (Thermo Fisher Scientific) through the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®), according to the protocol provided by the company. All reactions were performed in duplicates and levels of miRNA target expression were normalized to the corresponding endogenous hsa-miR-24-3p (27). The amplification cycling consisted of two consecutive holds of 5 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C. The expression values were obtained by the comparative delta ( $\Delta$ ) Ct method, where  $\Delta$ Ct corresponds to the Ct value of the target gene subtracted from the Ct value of the endogenous gene, and  $\Delta\Delta$ Ct corresponds to the  $\Delta$ Ct value of each target in lesion subtracted from the  $\Delta$ Ct of normal skin (calibrator sample). All data were plotted in units of relative expression ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) relative to the control group.

### Statistical Analysis

The miRNAs data were represented in units of relative expression between comparison groups. Association tests were performed using the non-parametric Mann-Whitney. Correlation analysis between the miRNAs and clinical parameters was made by the Spearman correlation test. In addition, survival analysis was estimated by the Kaplan-meier method with the aim of differentiating the healing time according to the miRNAs expression values. A ROC curve was made to predict who might cure or fail the Sbv treatment according to the miRNAs expression values. A p value <0.05 was considered statistically significant. For all analysis we used the GraphPad Prism 5 software.

### Ethical Statement

This study adhered to the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital Universitário Professor Edgard Santos Ethics Committee at Universidade Federal da Bahia (CEP 22/2012) and the Brazilian National Ethical Committee (CONEP: 1258513.1.000.5537). A written informed consent was obtained from every individual who accepted to participate in this study.

## RESULTS

### Clinical and Epidemiological Characteristics of the Sample

Twenty-five patients with CL were recruited at the diagnosis in the Health Center of Corte de Pedra, Brazil. The clinical and demographic of these patients who cure or failure to antimony therapy are detailed on Table 1. Patients who failed were younger than those who cured. There was no difference between the groups regarding the gender, duration of the illness, number of lesions, size of the greater lesion and percentage of ulcers in the inferior limb. As expected the healing time in those who cured were shorter than in those who failed.

### **Evaluation of the miRNAs Expression in Normal and CL Skin Biopsies of Patients Infected by *L.braziliensis*.**

The miRNAs 361-3p, 103a-2-5p, 140-3p, 1265, 205-3p, 584-5p, 7161-3p, 3646, 1252-3p, 4313, 153-5p, 5011-5p, 6885-3p and 4753-3p were evaluated in this study, according to their association with the differentially expressed target genes found in GSE55664 (Table 2). It is important to note that some of these miRNAs also target the *FLII* gene that was previously associated to increased susceptibility to CL in families from Corte de Pedra (28). We compared the biopsies of CL lesions and normal skin from the same patient (N = 25) in order to determine if the pathogenesis of CL caused by *L.braziliensis* is accompanied by an altered expression of miRNAs that regulate genes expressed in CL lesions. Of the fourteen target miRNA evaluated, only four showed expression in the tissues: miR-361-3p, -103a-2-5p, -140-3p, and -205-3p. Interestingly, the miR-361-3p and miR-140-3p were significantly more expressed in the CL lesions when compared to normal skin samples ( $p=0.0001$  and  $p <0.0001$ , respectively), as shown in Figure 1A, B. The miR-103a-2-5p and -205-3p although also more expressed in lesions than in normal skin, did not reach statistical significance, as shown in Figure 1C, D.

### **Correlation of the miRNA Expression with the Clinical Parameters of Patients with LC (Lesion Size, Treatment Response and Healing Time)**

We performed correlation analysis between the expression of the miRNAs and clinical parameters, lesion size, # of courses of antimony therapy and healing time. There was a positive correlation between the number of courses of antimonial pentavalent treatment and the expression of miR-361-3p, showing that the miRNA expression was higher in patients that fail to one therapy course of SbV ( $r= 0.6$ ,  $p= 0.003$ ), Figure 2A. Moreover, we also found a positive correlation between the same miRNA and the healing time of CL ( $r= 0.5$ ,  $p= 0.007$ ), indicating that the higher individuals express the miR-361-3p, the longer is the time required to heal lesions, as shown in Figure 2B. The parameter of lesion size was not correlated with this miRNA (Figure 2C). There were no significant correlations between the other miRNAs and any of these clinical variables (data not shown).

### **A ROC Curve and Survival Analysis Show that the Expression of miR 361-3p can Predict with Good Specificity and Sensitivity the Therapeutic Failure and Healing Time in CL.**

To evaluate whether the expression of miR-361-3p can be used as a biomarker of therapeutic failure, we performed a ROC curve analysis, for which we have established a sensitivity of 81.2% (CI = 54.3-95.9) and specificity of 100% (CI = 39.7-100), using the cut off 9.5. This result shows that miR-361-3p expression values are able to correctly discriminate individuals who did not respond to treatment with one course of SbV and are refractories (AUC = 0.95,  $p= 0.006$ ), as shown on Figure 3. The same analysis was performed for the other miRNAs, but it was not significant (data not shown). In addition, we performed a Kaplan-Meier survival analysis considering cure as the outcome, with the objective of differentiating the healing time according to the expression values of miRNA 361-3p. The data revealed that the higher the expression of this miRNA, the longer the time required to heal lesions ( $p = 0.002$  and  $p= 0.010$ ), according to Figure 4.



## DISCUSSION

Epigenetic modifications may provide an accessory source of fast-acting, reversible, and readily available phenotypic variation that can be directly shaped by both host and pathogen selection pressures (29-30). In this sense, while molecular biologists will focus on identifying and characterizing circumstances where miRNAs are acting as gene regulatory switches, bioinformaticians will have to deal with the prospect that a substantial fraction of all animal mRNAs could have their level of expression influenced by miRNA regulation (31). The miRNAs has been widely described in various pathological conditions caused by parasites. In leishmaniasis, there is now a body of evidence showing that the host's miRNAs repertoire is affected upon *Leishmania* infection and that might interfere with immunity pathways (19-20,32-33). Nevertheless, regarding LTA, the only documentation associating miRNAs with *L. braziliensis* infection was recently published by Nunes *et al* 2018 (21). The present study shows that miR-361-3p and -140-3p were significantly more expressed in CL lesions as compared to the normal skin. Moreover we document that the miR-361-3p expression was associated with failed to antimony therapy and consequently with a high healing time of the cutaneous ulcers.

As one of the aims of the present study was to evaluate if miRNA expression was a biomarker of severity of the disease and response to therapy we evaluated monthly the clinical evolution and response to therapy of 25 patients with CL. While there was no difference in the majority of the demographic and clinical manifestations in the two groups the mean age was lower in those who failed in comparison with the responders to antimony. Additionally the cure rate was higher than our more recent studies. The percentage of failure to therapy was lower than we have usually observed that similar to previous studies. We believe that the limited number of participants of the study was responsible for these differences (24-26).

The observation that the miR-361-3p and 140-3p were more expressed in CL lesions evidences that *L. braziliensis* parasites presence alters the expression of miRNAs in the tissue environment. Genes targeted by the miRNA miR-361-3p (*TNF*, *GZMB*) and miR-140-3p (*NKG7*) also had increased expression in the lesions of individuals infected by *L. braziliensis* (22). It is generally postulated that there is an inverse correlation between the miRNA expressions in relation to its target genes, that is, as miRNA expression increases in the microenvironment, the gene expression tends to go down. However, unlikely expected, we observed that both miR-361-3p and miR-140-3p were up regulated in the CL lesions. Thus we hypothesized two possible explanations for this data: (1) This higher expression may be occurring as an attempt of these miRNAs to contain the also exacerbated expression of their target genes at the lesion site; or (2) Alternatively, these miRNAs could be inducing the expression of these genes at the promoter region. In the latter case, our results would be in agreement with the report of Zhang *et al.*, 2014 (34), which showed that the miRNA let-7i associated to the RNA polymerase II in the cell nucleus, binds to the TATA box motif of interleukin-2 (*IL-2*) gene and elevates both *IL-2* mRNA and protein in peripheral CD4+ T-lymphocytes of HIV-1 subjects. Likewise, other cellular miRNAs such as miR-138 and miR-92a also increase promoter activities by binding to TATA-box motifs (34). Additionally, further studies have demonstrated that several miRNAs can induce gene expression by binding to complementary sequences in the promoter (35-36). All together, these findings indicate an additional regulatory mechanism for gene expression by miRNAs. Thus, we postulate that increased expression of miR-361-3p and miR-140-3p can up regulate its

target genes in lesions of patients infected by *L.braziliensis*, collaborating to the worsening of tissue damage. However, we cannot ignore that these miRNAs could be up-regulated as a way to modulate other target genes in the lesions. As an example, the miR 361-3p also targets the Filaggrin-2 (*FLG2*) gene, associated with maintenance of the epidermal barrier function.

Alternatively this miRNA may be implicated with a pathological response as its expression could be part of the cytotoxic mechanism mediated by the recruitment of NK and CD8+T cells in response to *L.braziliensis* infection. These cell types induce the pro-inflammatory cytokine TNF increasing cellular adhesion, necrosis and cytotoxicity (37-39). Moreover, previous data documented a positive correlation between the frequency of CD8+ T cell expressing granzyme B+ and lesion size (40). Granzyme B can indirectly promote inflammation through the activation of cytokines such as IL-18, IL-1 $\beta$ , and IL-1 $\alpha$  (41-43). One probable mechanism of how cytotoxic cells mediate inflammation and tissue injury in CL is that, after degranulation of cytotoxic cells, granzyme B and perforin are released into the extracellular space, inducing apoptosis of infected macrophages and bystander cells. In addition, extracellular granzyme B may indirectly contribute to inflammation by activating pro-inflammatory cytokines such as TNF, as well as degradation of ECM substrates, resulting in tissue injury (44).

The search for correlations with clinical parameters was a strategy employed in this study in order to explore potentially relevant data in the context of CL pathogenesis. Thus, illness duration, response to treatment and healing time were parameters selected for correlations with the expression of detected miRNAs. Our results show, in a pioneering way, a direct correlation between the expression levels of a miRNA with both therapeutic failure and healing time in CL. Furthermore, additional analysis showed that the expression levels of miR-361-3p can predict with high sensitivity and specificity patients that will not respond to the treatment with one course of SbV and are potential refractories. Likewise, survival analysis having the cure as the outcome showed that the higher the miR-361-3p expression, the longer the healing time of CL lesions. These results have an outstanding impact because it indicates that miR-361-3p could have a prognostic value in the evolution of CL as a biomarker of failure to therapy. The healing time of a CL ulcer is slow and a second course of SbV or use of an alternative drug is only initiated after 90 days of the initiation of therapy. Our data indicate that a high expression of 361-3p before therapy may indicate a patients who have a high rate to failure to antimony therapy. In such case alternative drugs may be used rather than antimony. Moreover our results open perspectives for new exploratory studies involving miRNAs, as well as functional studies that may aggregate new information useful for the development of new therapeutic targets in LTA.

## REFERENCES

1. Castellucci LC, Almeida LF, Jamieson SE, Fakiola M, Carvalho EM, Blackwell JM. Host genetic factors in American Cutaneous Leishmaniasis: a critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2014) 109:279–88. doi:10.1590/0074-0276140028
2. PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas. Report Leishmaniasis. (2015). Available from: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34112>

3. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Ann Parasitol Hum Comp* (1993) 68: 104-6.
4. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* (2009) 22: 491-502. doi:10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x
5. Barral-Netto M, Machado P, Bittencourt AL, Barral A. Recent Advances In pathophysiology and treatment of human cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Dermatology* (1997) 4:51-8.
6. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* (2013) 9:e1003504. doi:10.1371/journal.ppat.1003504
7. Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* (2008) 9: 465-76. doi:10.1038/nrg2341.
8. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* (2011) 21: 381-95. doi:10.1038/cr.2011.22.
9. Storz G. An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* (2002) 296: 1260-3. doi:10.1126/science.1072249
10. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* (2007) 115:1090-106. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_775.xml.x
11. Jinnin, M. Various applications of microRNAs in skin diseases. *J Dermatol Sci* (2014) 74:3-8. doi:10.1016/j.jdermsci.2014.01.004
12. Zhu D, He X, Duan Y, Chen J, Wang J, Sun X, et al. Expression of microRNA-454 in TGF- $\beta$ 1-stimulated hepatic stellate cells and in mouse livers infected with *Schistosoma japonicum*. *Parasit Vectors* (2014) 7:148. doi:10.1186/1756-3305-7-148
13. Chowdhari S, Sardana K, Saini N. miR-4516, a microRNA downregulated in psoriasis inhibits keratinocyte motility by targeting fibronectin/integrin  $\alpha$ 9 signaling. *Biochim Biophys Acta* (2017) 1863:3142-52. doi: 10.1016/j.bbadis.2017.08.014
14. Ono C, Fukuhara T, Motooka D, Nakamura S, Okuzaki D, Yamamoto S, et al. Characterization of miR-122-independent propagation of HCV. *PLoS Pathog* (2017) 13:e1006374. doi:10.1371/journal.ppat.1006374
15. Mukherjee B, Paul J, Mukherjee S, Mukhopadhyay R, Das S, Naskar K, et al. Antimony-resistant *Leishmania donovani* exploits miR-466i to deactivate host MyD88 for regulating IL-10/IL-12 levels during early hours of infection. *J Immunol* (2015) 195:2731-42. doi:10.4049/jimmunol.1402585
16. Pandey RK, Sundar S, Prajapati VK. Differential expression of miRNA regulates T cell differentiation and plasticity during visceral leishmaniasis infection. *Front Microbiol* (2016) 7:206. doi:10.3389/fmicb.2016.00206
17. Singh AK, Pandey RK, Shaha C, Madhubala R. MicroRNA expression profiling of *Leishmania donovani*- infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy. *Autophagy* (2016) 12:1817-31. doi:10.1080/15548627.2016.1203500
18. Muxel SM, Silva MFL, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Sci Rep* (2017) 7:44141. doi:10.1038/srep44141
19. Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM, et al. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania*

- major infection. *PLoS Negl Trop Dis* (2013) 7:e2478. doi: 10.1371/journal.pntd.0002478
20. Geraci NS, Tan JC, McDowell MA. Characterization of microRNA expression profiles in Leishmania infected human phagocytes. *Parasite Immunol* (2015) 37: 43-51. doi: 10.1111/pim.12156
  21. Nunes S, Silva IB, Ampuero MR, Noronha ALL, Souza LCL, Correia TC, et al. Integrated analysis reveals that miR-193b, miR-671, and TREM-1 correlate with a good response to treatment of human localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Front Immunol* (2018) 9:640. doi:10.3389/fimmu.2018.00640
  22. Novais FO, Carvalho LP, Passos S, Ross DS, Carvalho EM, Scott P, et al. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol* (2014) 135:94-101. doi:10.1038/jid.2014.305
  23. Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, et al. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *J Clin Microbiol* (2012) 50:4028-34. doi:10.1128/JCM.02064-12
  24. Costa RS, Carvalho LP, Campos TM, Magalhães AS, Passos ST, Schriefer A, et al. Early cutaneous leishmaniasis patients infected with *Leishmania braziliensis* express increased inflammatory responses after antimony therapy. *J Infect Dis* (2018) 217:840-850. doi:10.1093/infdis/jix627
  25. Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* (2010) 4:e912. doi:10.1371/journal.pntd.0000912
  26. Prates FV, Dourado ME, Silva SC, Schriefer A, Guimarães LH, Brito MD, et al. Fluconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*: A Randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* (2017) 64:67-71. doi: 10.1093/cid/ciw662
  27. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* (2007) 8:166. doi:10.1186/1471-2164-8-166
  28. Castellucci L, Jamieson SE, Miller EN, Almeida LF, Oliveira J, Magalhães A, et al. FLII polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Genes Immun* (2011) 12:589-94. doi:10.1038/gene.2011.37
  29. Bonduriansky R, Day T. Nongenetic inheritance and its evolutionary implications. *Annual review of ecology, evolution and systematics* (2009) 40:103-25. doi:10.1146/annurev.ecolsys.39.110707.173441
  30. Rando OJ, Verstrepen KJ. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell* (2007) 128:655-68. doi:10.1016/j.cell.2007.01.023
  31. Baroni D, Arrigo P. MicroRNA target and gene validation in viruses and bacteria. *Methods Mol Biol* (2014) 1107:223-31. doi:10.1007/978-1-62703-748-8-13
  32. Ghosh J, Bose M, Roy S, Bhattacharyya SN. *Leishmania donovani* targets dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell Host Microbe* (2013) 13:277-88. doi:10.1016/j.chom.2013.02.005
  33. Chamnanchanunt S, Fucharoen S, Umemura T. Circulating microRNAs in malaria infection: bench to bedside. *Malar J* (2017) 16:334. doi:10.1186/s12936-017-1990-x

34. Zhang Y, Fan M, Geng G, Liu B, Huang Z, Luo H, et al. A novel HIV-1-encoded microRNA enhances its viral replication by targeting the TATA box region. *Retrovirology* (2014) 11:23. doi:10.1186/1742-4690-11-23
35. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) 105: 1608–13. doi:10.1073/pnas.0707594105
36. Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103:17337–42. doi:10.1073/pnas.0607015103
37. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* (1998) 31:143–48. doi:10.1590/S0100-879X1998000100020
38. Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-Regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* (2002) 70:6734–40. doi:10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002
39. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T-Cell-Mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* (2002) 9:251–56. doi:10.1128/CDLI9.2.251-256.2002
40. Santos CS, Boaventura V, Cardoso CR, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN $\gamma$ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* (2013) 133:1533–40. doi:10.1038/jid.2013.4
41. Omoto Y, Yamanaka K, Tokime K, Kitano S, Kakeda M, Akeda T, et al. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *J Dermatol Sci* (2010) 59:129–35. doi:10.1016/j.jdermsci.2010.05.004
42. Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Luthi AU, et al. Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the pro-inflammatory activity of IL-1 $\alpha$ . *Mol cell* (2011) 44:265–78. doi:10.1016/j.molcel.2011.07.037
43. Hiebert PR, Granville DJ. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med* (2012) 18:732–41. doi:10.1016/j.molmed.2012.09.009.
44. Campos TM, Costa R, Passos S, Carvalho LP. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (2017) 112:733–40. doi:10.1590/0074-02760170109

## FUNDING

This work was sponsored by the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT N° 573839/2008-5) and National Institutes of Health (Grant AI 30639). EC is senior investigator of the National Council for Research (CNPq). TL was fellow from CAPES.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the physicians and staff of the Health Post of Corte de Pedra for their support in recruiting patients and collecting biopsies for this study.

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

TL conducted molecular biology experiments and analyzed and interpreted data. JS supported the sample collection. EL assisted in the recruitment and segment of patients. EC enrolled the study participants and helped to analyze data and draft the manuscript. DZ participated in the study design and helped with quality control and data analysis. LC conceived the study and participated in its design, helped to analyze and interpret the data, and drafted the manuscript.

### **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no commercial or financial relationships that could perceive a potential conflict of interest.

In review

**TABLE1. Clinical and demographical characteristics of the CL patients.**

Demographic and Clinical Features	Treatment Outcome		
	Cure N=20	Fail N=5	P value
Age, mean, (SD)	32 ± 9,7	22 ± 3,9	0,037
Gender, % Male	15/20 (75)	3/5 (60)	0,596
Illness duration, median, (IQR)	81,5 (65 -120)	160 (137,5 – 178)	0,008
Number of lesions, median, (IQR)	1,5 (1-2)	1 (1-2,5)	0,765
Size of the major lesion, median, mm <sup>2</sup> (IQR)	163,5 (84-537,5)	42 (25-301)	0,071
Percentage of lesions in the inferior limbs	50	50	1,000
Healing time, median (IQR)	50 (36,2-59)	120 (120-143)	0,001

*SD= Standard deviation; IQR= Interquartile Range*

In review

**TABLE 2. The miRNAs and their target genes.**

miRNA	# OF ACCESS miRBase	REGULATED GENES	MATURE miRNA SEQUENCE
hsa-miR-361-3p	MIMAT0004682	TNF e GZMB	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU
hsa-miR-103a-2-5f	MIMAT0009196	CXCL9, FLI1, GBP5, GNLY	AGCUUCUUACAGUGCUGCCUUG
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	NKG7	UACCACAGGGUAGAACCACGG
hsa-miR-1265	MIMAT0005918	CXCL10,GBP5,CXCL9	CAGGAUGUGGUAAGUGUUGUU
hsa-miR-205-3p	MIMAT0009197	FLI1, CXCL9, IL1- $\beta$ , IL6	GAUUUCAGUGGAGUGAAGUUC
hsa-miR-584-5p	MIMAT0003249	GBP5,CXCL9	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG
hsa-miR-7161-3p	MIMAT0028233	GBP5,CXCL9,MMP1	UAGAUCUUUGACUCUGGCAGUCUCCAGG
hsa-miR-3646	MIMAT0018065	GZMA	AAAAUGAAAUGAGCCCAGCCCA
hsa-miR-1252-3p	MIMAT0026744	GZMA	CAAUUGAGCUAAAUUCCUUUU
hsa-miR-4313	MIMAT0016865	GZMB	AGCCCCCUGGCCCAAACCC
hsa-miR-153-5p	MIMAT0026480	CXCL9,CXCL10,GBP5,IDO1	UCAUUUUUGUGAUGUUGCAGCU
hsa-miR-5011-5p	MIMAT0021045	CXCL9,CXCL10,GBP5,IDO1	UAUUAUACAGCCAUGCACUC
hsa-miR-6885-3p	MIMAT0027671	FLI1,GZMB,CXCL9	CUUUGCUUCCUGCUCCCUAG
hsa-miR-4753-3p	MIMAT0019891	FLI1,MMP1,CCL8	UUCUCUUUCUUAGCCUUGUGU

In review



**FIGURE 1.** Relative gene expression of miR-361-3p (A), miR-140-3p (B), miR-103a-2-5p (C) and miR-205-3p (D) between CL skin and normal skin samples from the same patient. All values were represented by the equation  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  of the lesion in relation to the normal skin of each individual. The bars represent the median of the groups. Data were analyzed using the non-parametric Mann Whitney test as implemented by the GraphPad Prism program. The miR-361-3p and miR-140-3p were significantly more expressed in LC lesions compared to normal skin samples ( $p = 0.0001$  and  $p < 0.0001$ , respectively).

**FIGURE 2.** Spearman correlation analysis of the miR-361-3p in relation to healing time (A), therapeutic failure (B) and lesion area (C). There was a positive correlation between this miRNA and the clinical parameters of therapeutic failure ( $r = 0.6$ ,  $p = 0.003$ ) and longer healing time ( $r = 0.5$ ,  $p = 0.007$ ).

**FIGURE 3.** A ROC curve constructed using the relative expression values of miR-361-3p from refractory ( $n = 4$ ) and responders patients ( $n = 16$ ) after antimonial therapy. The miR-361-3p is able to identify with a sensitivity of 81.2% (IC=54,3-95,9) and specificity of 100% (IC=39,7-100) patients who tend to fail initial treatment with Sb<sub>v</sub>.

**FIGURE 4.** Kaplan-Meier survival analysis built considering "high" and "low" expression values of the miR-361-3p and "cure" as the outcome. Data showed the higher the expression of miR-361-3p, the longer the healing time of CL lesions (days).

Figure 1.TIF

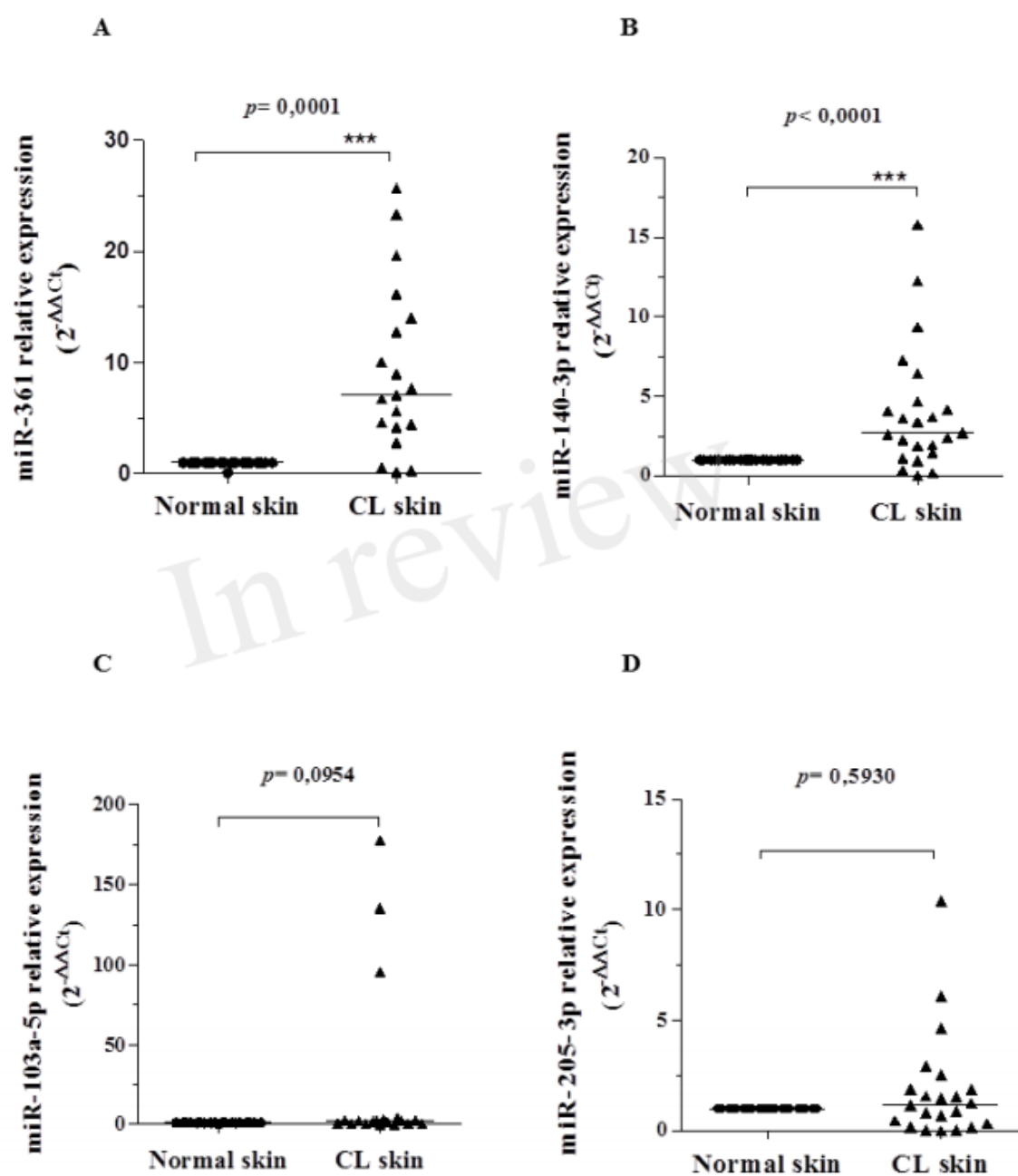


Figure 2.TIF

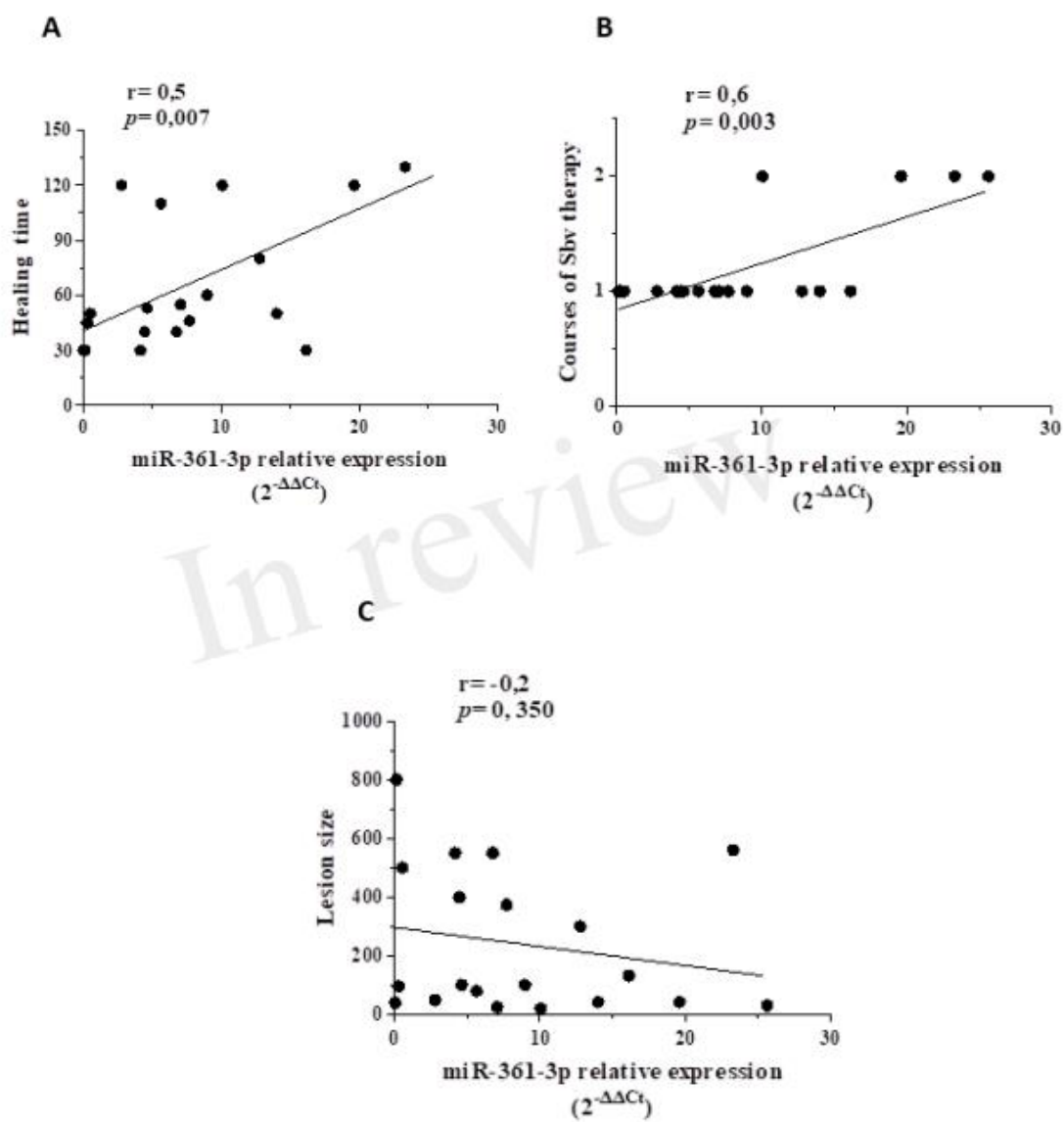


Figure 3.TIF

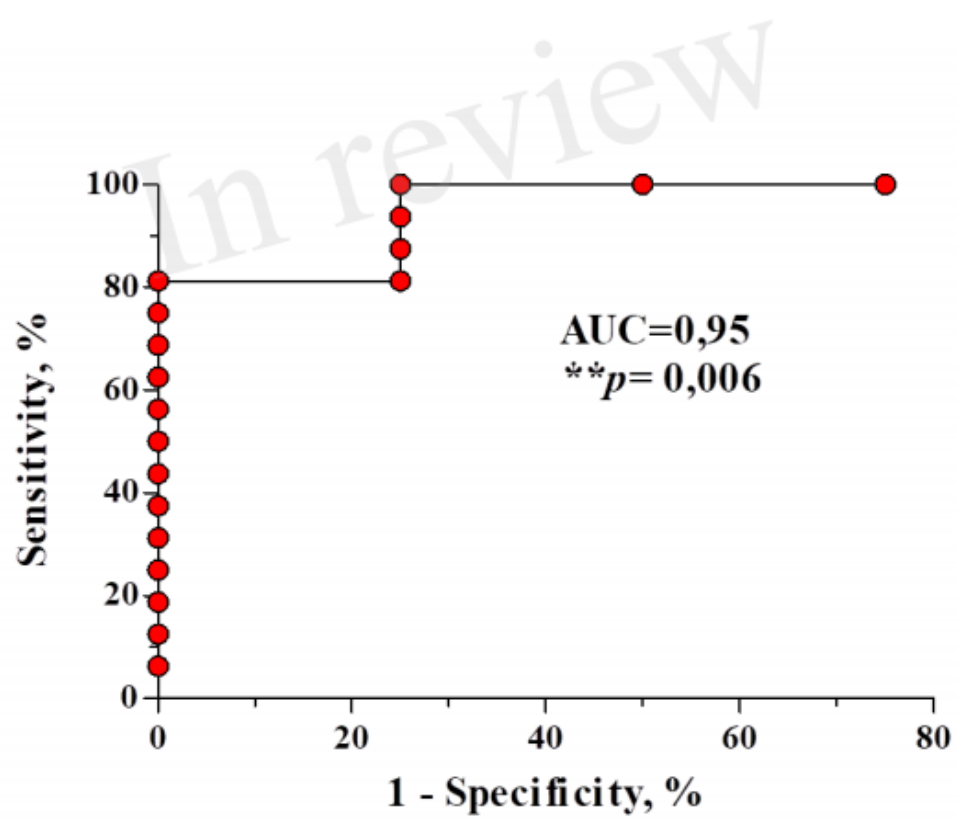


Figure 4.TIF

