

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

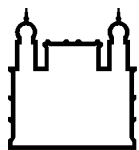
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ASSOCIAÇÃO GENÉTICA E FUNCIONAL DE MICRORNAS
NA HANSENÍASE**

Paula Fernandes Tavares Cezar de Mello

Rio de Janeiro

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Paula Fernandes Tavares Cezar de Mello

ASSOCIAÇÃO GENÉTICA E FUNCIONAL DE MICRORNAS NA HANSENÍASE

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

Coorientadora: Profa. Dra. Euzenir Nunes Sarno

RIO DE JANEIRO

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M527 Mello, Paula Fernandes Tavares Cezar de

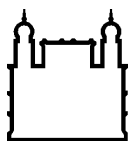
Associação genética e funcional de microRNAs na Hanseníase /
Paula Fernandes Tavares Cezar de Mello. – Rio de Janeiro, 2016.
xx, 134 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 112-125

1. Hanseníase. 2. MicroRNA. 3. Susceptibilidade genética. 4.
Expressão gênica. 5. Biomarcadores. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Autora: Paula Fernandes Tavares Cezar de Mello

ASSOCIAÇÃO GENÉTICA E FUNCIONAL DE MICRORNAs NA HANSENÍASE

ORIENTADOR: Prof. Dr. Milton Ozório Moraes

COORIENTADORA: Profa. Dra. Euzenir Nunes Sarno

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Ribeiro Alves – IPEC / Fundação Oswaldo Cruz - Titular

Profa. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani – IOC / Fundação Oswaldo Cruz - Titular

Prof. Dr. João Paulo de Biaso Viola – Instituto Nacional do Câncer - Titular

Prof. Dr. Alexandre Silva de Almeida – Universidade Federal do Rio de Janeiro - Suplente

Prof. Dr. Lucia Elena Alvarado Arnez – IOC / Fundação Oswaldo Cruz - Suplente

Rio de Janeiro, 17 de setembro de 2015

Dedico a minha mãe, Gilca Tavares Cezar de Mello que, por sempre acreditar nos meus sonhos, ensinou-me a acreditar neles também.

Dedico ao meu pai, Eurico Fernandes da Silva Filho, *in memoriam*.
“Naquela mesa ele sentava sempre e me dizia sempre o que é viver melhor...”

AGRADECIMENTOS

Quando se começa uma longa caminhada é imprevisível saber se aqueles que a iniciaram conosco escolherão – ou poderão – permanecer ao longo dela. Também é imprevisível saber quem chegará no meio do trajeto. Felizmente, pude contar com muitos. Aprendi com cada um deles e aqui deixo o meu reconhecimento.

Ao meu orientador, Dr. Milton Ozório Moraes. Agradeço pelo desafio aceito na minha orientação. Não posso dizer que o início tenha sido fácil, não foi. Mas o desafio constante e diário permitiu a construção de um solo mais firme para a elaboração deste trabalho. Aprendi diariamente com seu profissionalismo, otimismo e entusiasmo pela ciência.

À minha coorientadora, Dra. Euzenir Nunes Sarno, agradeço por estar sempre disponível para discutir os dados deste trabalho, pelo exemplo de dedicação à pesquisa em hanseníase e à frente do Laboratório.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro Alves, pela colaboração e contribuições neste trabalho, pela revisão desta tese e também pela amizade. Agradeço pelas lições de R e pela sua paciência e generosidade. À Dra Leandra Lacerda, por toda a auxílio dispensado na utilização do Bionalyzer e pelas discussões sempre produtivas sobre miRNAs.

Às minhas queridas amigas, Dra. Lucia Alvarado, Dra. Carolinne Marques e Dra. Cynthia Chester, pelas contribuições e discussões acerca das análises genéticas. Pela amizade além do laboratório e pela cumplicidade e convivência ao longo destes anos.

Às queridas amigas Alejandra Martinez e Anna “Xuxu” Beatriz, as primeiras a me receberem de braços abertos no laboratório. A vocês devo os primeiros ensinamentos práticos em biologia molecular e hanseníase. Sou grata e feliz em saber que não nos limitamos à amizade circunstancial de trabalho, vocês moram no meu coração.

Aos companheiros da “sala 19”, aos mais antigos: Flávia, Luana, Thiago, Carolz e Ohanna; e aos mais recentes: Leo, Ferdi, Elis, Fê Manta e Priscila. Cada um de vocês me ensinou algo diferente. Obrigada pela amizade e pela paciência. Em especial ao Alexandre, pelo apoio, suporte e por acreditar que vale a pena investir no mundinho dos microRNAs. Estendo os meus agradecimentos aos colegas da “sala 27”, sempre muito atenciosos e prestativos.

Aproveito para agradecer o trabalho desenvolvido por outros funcionários do núcleo de hanseníase, Augusto, Cristiane, Andrea e à equipe do Ambulatório Souza Araújo. Suas contribuições, diretas ou indiretas, foram imprescindíveis. Ao “Seu Salles”, sempre muito atencioso com todos e pelos lanchinhos noturnos.

Sou grata aos profissionais e amigos que encontrei no Colégio Pedro II. Agradeço ao apoio moral e por sempre compreenderem, viabilizarem e até priorizarem o meu papel de doutoranda. Foram muitas as situações em que precisei me ausentar, mas valeu a pena, o resultado está aqui. À equipe de Biologia, Natasha em especial, Gabriel, Leandro e Beth. Ao meu diretor Artur Nogueira e ao reitor Oscar Halac. Aos tantos outros amigos que fiz neste colégio maravilhoso, Marcelo, Adoracion e Letícia.

Ao Dr. Mark Boldin, da *City of Hope, Department of Molecular and Cellular Biology*; meu supervisor no estágio sanduíche. Concordou prontamente com o desafio de aceitar em seu laboratório uma completa desconhecida. Suas considerações, comentários e *expertise* foram muito valiosos. O seu “sim” me deu a oportunidade de crescer profissionalmente e, talvez ainda mais, no campo pessoal. O período em Los Angeles me proporcionou um dos momentos mais especiais da minha vida, não foi fácil, mas de alguma forma foi tudo o que eu precisei. Agradeço também ao Nathaniel Magilnick, sempre muito gentil e atencioso. Sua ajuda foi fundamental na execução da mutação sítio dirigida, no manejo com os camundongos nocaute e na contratação do AAA (☺). A Estefany Reyes, por todo o auxílio dispensado no trabalho com os animais, na cultura de células e por sua alegria latente em fazer ciência. Ao Matan Ofir, pela ajuda com o estabelecimento dos clones de THP-1 e dicas de biomol.

Aos queridos amigos que deixei em Cali, Marcela Salazar, que me ofereceu comida brazuca, recolheu-me da *curbside*, deixou-me muitos exemplos profissionais e de vida, e ajudou a despertar a “bitch” que precisei ser algumas vezes. Ao Dayson Moreira, a quem devo muitas caronas, conselhos e discussões de protocolos de biomol; e todos aqueles cafezinhos a tarde. Vocês me deram um inestimável suporte na *City of Hope* e me dão muito orgulho em saber que o Brasil está sendo muito bem representado.

Às Aida Torres e Ana Vigo, minhas *roomies* e minha pequena família peruana. Foi tudo muito incrível, a amizade de vocês foi uma agradável surpresa. “*California state of mind*”. Que saudade!

Ao Bruno Mira, em reconhecimento pelo seu apoio.

Last but not least, agradeço à minha família, minha mãe Gilca, minha irmã Camila e minha avó Porcina, por compreenderem as minhas ausências. Por me apoiarem em cada uma das minhas escolhas que me trouxeram até aqui, mesmo que nem sempre entendessem o porquê. Agradeço ao meu irmão Edson, ao meu sobrinho Rennan e à minha cunhada Beth (que apesar de não ser parente... rs). A família é muito grande, mas vocês não só representam como entendem bem onde esta história teve início, o caminho percorrido, e tudo mais que se desdobrou até aqui.

“There will come a time when you believe everything is finished; that will be the beginning.”

— Louis L'Amour

LISTA DE ABREVIATURAS

3' UTR – região 3' não traduzida

Ago – argonauta

BAAR – bacilos álcool-ácido resistentes

BB – *borderline borderline*

BCG – Bacilo Calmete Guérin

BL – *borderline* lepromatoso

BMDM – macrófagos derivados de medula óssea, do inglês *bone marrow derived macrophages*

BSA – albumina de soro bovino

BT – *borderline* tuberculóide

CS - células de Schwann

DC-SIGN – molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intracelular 3 e específicas das células dendríticas, do inglês *dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin*

DGCR8 – proteína 8 da região cromossomal da síndrome DiGeorge do inglês, *DiGeorge syndrome Critical Region 8 protein*

EDTA – ácido etilenodioaminotetracético

ELISA – ensaio imunoenzimático

ENH – eritema nodoso hansênicos ou reação tipo II

eQTL – variantes genéticas que predizem na expressão dos genes, do inglês *expression of quantitative trait loci*

GO – ontologia gênica, do inglês *Gene Ontology*

HHC – contatos intradomiciliares, do inglês *household contacts*

IFN – interferon

IL – interleucina

LAM – lipoarabinomanana

LD – desequilíbrio de ligação

LL – lepromatoso

LM – lipomanana

LPS – lipopolissacarídeo

MB – multibacilar

miRNA – microRNA

miRNP – complexo ribonucleoproteico de silenciamento

miRSC – complexo de silenciamento induzido por miRNA, do inglês *miRNA-induced silencing complexes*

MOI – multiplicidade de infecção, do inglês *multiplicity of infection*

MRE – elementos de reconhecimento de miRNA

ncRNA – RNA não-codificante

NO – óxido nítrico, do inglês *nitric oxide*

OD – densidade óptica, do inglês *optical density*

OMS – organização mundial de saúde

OR – razão de chances, do inglês *odds ratio*

PAMP – padrões moleculares associados a patógenos

Pasha – um acrônimo para “*Partner of Drosha*”

PB – paucibacilar

PBMC – células mononucleares do sangue periférico, do inglês *peripheral blood mononuclear cell*

PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*

PGL-1 – glicolípido fenólico 1

piRNA – *piwi-interacting* RNA

PQT – poliquimioterapia

PRR – receptores de reconhecimento de padrões

RF – RNase *free*

RNAs – RNA dupla-fita

RNAfs – RNA fita simples

RR – reação reversa ou reação tipo I

RT – transcrição reversa

siRNA – RNA de interferência

SLE – lúpus eritematoso sistêmico

SLPB – paucibacilar de lesão única, do inglês *single lesion paucibacillary*

SNP – polimorfismo de base única, do inglês *single nucleotide polymorphism*

TDT – teste de desequilíbrio de transmissão

TLR – receptores do tipo toll

TNF – fator de necrose tumoral

TT – tuberculóide

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Resumo dos principais estudos de associação genética na hanseníase.	14
Tabela 2: Pequenos RNAs que atuam na regulação gênica.	20
Tabela 3: Resumo dos miRNAs envolvidos em infecções micobacterianas.	30
Tabela 4: Resumo das informações dos genes de miRNAs candidatos utilizados no estudo genético.	50
Tabela 5: Análise de associação entre o miRSNP-146a 8kb (rs2431099) e a hanseníase <i>per se</i>.	70
Tabela 6: Análise de associação haplotípica do gene miR-146a (rs2910164/rs2431099) com a hanseníase <i>per se</i>.	70
Tabela 7: Resumo dos miRNAs diferencialmente expressos no sangue de pacientes, contatos e indivíduos saudáveis	88
Tabela 8: Principais processos biológicos e RNAm-alvos potencialmente regulados pelo miR-15b	90
Tabela 9: Principais processos biológicos e RNAm-alvos potencialmente regulados pelo miR-206.	91

Figura 1: Taxa Global de Prevalência da Hanseníase. As taxas de prevalência correspondem aos dados reportados no início de 2012 e são expressos a cada 10.000 habitantes. O mapa destaca os países Sudão e Brasil como maiores índices (OMS, 2013).3

Figura 2: Distribuição espacial de clusters com maior risco relativo no Brasil. Análise de agrupamento da taxa de detecção geral de hanseníase no Brasil para o triênio 2011-2013. (OMS, 2014).4

Figura 3: Espectro de manifestações clínicas da hanseníase. Polo TT, caracterizado pelo predomínio da imunidade celular (Th1) e presença de poucos bacilos. Antagonicamente, no polo LL se observa predomínio da resposta imune humoral (Th2) e alta carga bacilar. Adaptado de Coates *et al.*, 2010.6

Figura 4: Modelo de 2 estágios no estudo de genes associados à susceptibilidade a hanseníase. 1º estágio: a exposição ao bacilo pode ter como consequência o adoecimento ou a resistência ao estabelecimento da infecção (*hanseníase per se*). 2º estágio: estabelecida a infecção, o indivíduo com infecção subclínica (assintomático) pode evoluir para a cura ou para um dos espectros clínicos da doença. Nesta etapa, um segundo conjunto de genes estaria relacionado à severidade da doença. Adaptado de Mira, 2006. 13

Figura 5: Localização genômica dos miRNAs. A – Localização no íntron de um transcrito não codificante; B – Localização no éxon de um transcrito não codificante. C – Localização

no íntron de um transcrito codificante; D – Localização em um éxon de um transcrito codificante. Adaptado de Kim *et al.*, 2009. 19

Figura 6: A fita pri-miRNA e sua clivagem pelo complexo microprocessador. (A) O esquema detalha a anatomia da fita pri-miRNA destacando a região de reconhecimento pela Drosha. Destaque para a localização da sequência do miRNA maduro (em vermelho) e da fita passageira (em azul). (B) Degradação do pri-miRNA gerando a fita pre-miRNA. Adaptado de (A) Ha & Kim, 2014 e (B) Liu, Fortin & Mourelatos, 2008. 21

Figura 7: A biogênese dos miRNAs: vias canônica e não-canônica. Os pre-miRNAs podem ser originados pela clivagem da fita pri-miRNA pelo complexo enzimático microprocessador (via canônica) ou através do *splicing* (via não-canônica). No citoplasma o pre-miRNA sofre clivagem gerando um pequeno RNA de dupla fita. A associação de proteínas da família argonauta a apenas uma das fitas deste RNAs forma o complexo ribonucleoproteico de silenciamento (miRNP) que atuará na regulação da expressão gênica. Adaptado de Filipowicz *et al.*, 2008. 22

Figura 8: Interação entre miRNA e RNAm-alvo. O esquema detalha a região 3'UTR de um RNAm hipotético, evidenciando o elemento de reconhecimento de miRNAs (MRE) que é complementar à região de semente de um miRNA. No detalhe, destaca-se a importância do 2º ao 8º nucleotídeo (8-mer). Adaptado de Filipowicz *et al.*, 2014. 24

Figura 9: Fluxograma de trabalho do estudo de associação genética e funcional dos miRNAs...... 49

Figura 10: Representação esquemática do gene miR-146a e a localização dos polimorfismos estudados. Os SNPs escolhidos estão localizados na região promotora putativa do gene e distam 8kb (rs2431099) e 15kb (rs2431697) à montante da região de início da transcrição (TSS). O gene é composto por dois éxons e o 2º éxon hospeda a fita pre-miR-146a. 67

Figura 11: Cinética de expressão do miR-146a em BMDM infectados com *M. leprae*. Os BMDM miR-146a^{+/+} (n = 3) foram infectados com *M. leprae* viável (MLv) por diferentes intervalos de tempo. A expressão do miR-146a foi avaliada por RT-PCRq e normalizada pelo gene Sno234. Para determinação do *fold-change*, o grupo experimental NI (não infectado) foi utilizado como base. Os dados representam a média ± erro padrão da média. Modelo *one-way* ANOVA (teste F), pós-teste Tukey, **p = 0,0034; *p < 0,05. 73

Figura 12: Viabilidade de BMDM infectados com *M. leprae* vivo e irradiado. Os BMDM miR-146a^{+/+} (n = 3) e miR-146a^{-/-} (n = 2) foram infectados com *M. leprae* vivo (MLv) ou irradiado (MLi) na MOI de 100:1, por 24 h. Após este período, foi adicionado MTS e a produção de formazan foi adquirida na densidade óptica de 490 nm. O experimento foi realizado com três replicatas técnicas e os dados representam a média ± erro padrão da média. Modelo *two-way* ANOVA (teste F). 74

Figura 13: Efeito da viabilidade do *M. leprae* na expressão do miR-146a em BMDM infectados. Os BMDM miR-146a^{+/+} (n= 4) foram infectados com *M. leprae* viável (MLv) e irradiado (MLi) com diferentes MOI por 24 h. A expressão do miR-146a foi avaliada por RT-PCRq e normalizada pelo gene sno234. Para determinação do *fold-change*, o grupo

experimental NI (não infectado) foi utilizado como base. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Modelo *one-way* ANOVA (teste F), pós-teste Tukey, * $p < 0,05$ 75

Figura 14: Cinética da expressão de TNF- α em BMDM infectados com *M. leprae*. Cinética de infecção dos BMDM miR-146a^{+/+} (n = 3) e miR-146a^{-/-} (n = 4) com *M. leprae* viável (MLv) com a MOI 100:1. A expressão de TNF- α foi avaliada por RT-PCRq e seus valores de expressão foram normalizados pelo gene Rn18. Para a determinação *fold-change* (unidades arbitrárias), o grupo experimental NI (não infectado) miR-146a^{+/+} foi utilizado como base. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Foram ajustados dois modelos *one-way* ANOVA (teste F), de acordo com cada genótipo, e seguidos do pós-teste Tukey. Para todas as comparações, o grupo de 6 h foi significativamente diferente dos demais. 77

Figura 15: Expressão de TNF- α em BMDM infectados com *M. leprae*. Infecção de BMDM miR-146a^{+/+} (n = 4) e miR-146a^{-/-} (n = 4) com (A) MLv utilizando as MOI de 10:1 e 100:1 e (B) *M. leprae* irradiado (MLi) na MOI de 100:1, por 6 h. A expressão de TNF- α foi avaliada por RT-PCRq e seus valores de expressão foram normalizados pelo gene Rn18. Para a determinação do *fold-change* (unidades arbitrárias), o grupo experimental NI (não infectado) miR-146a^{+/+} foi utilizado como base. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Foi ajustado o modelo *two-way* ANOVA (teste F), um para cada análise. Ambos seguidos de pós-teste de Bonferroni. Ef. Infec = efeito da infecção, Ef. Genot.= efeito do genótipo, Ef. Inter.= efeito da interação entre infecção e genótipo. 78

Figura 16: Viabilidade molecular do *M. leprae* em macrófagos murinos. Os BMDM miR-146a^{+/+} (n = 5) e miR-146a^{-/-} (n = 6) foram infectados com *M. leprae* (100:1) por 24 h. Em seguida a viabilidade molecular do *M. leprae* foi determinada por RT-PCRq através da razão entre o cDNA 16S RNAr e o DNA 16S RNAr. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Teste Mann Whitney, * $p = 0,035$ 79

Figura 17: Produção de óxido nítrico em BMDM estimulados com LPS e *M. Leprae*. Os BMDM miR-146a^{+/+} e miR-146a^{-/-} foram estimulados com LPS (10 ng/mL) e *M. leprae* viável (100:1) por 24 h. A produção de NO foi avaliada através da quantificação de nitrito presente no sobrenadante pelo método de Griess. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. Teste Mann Whitney, ns = diferença de médias não significativa. 80

Figura 18: Expressão de LC3-b em BMDM infectados pelo *M. leprae*. Os BMDM miR-146a^{+/+} e miR-146a^{-/-} foram infectados com *M. leprae* viável (100:1) por 6 h. Após este período, as células foram lisadas, e 24 μ g de proteínas foi submetido à eletroforese. A membrana foi imunomarcada com anticorpo anti-LC3b, seguido de *strip* e imunomarcção com anticorpo anti-actina. A densitometria das bandas foi analisada no *software* Image J. Os resultados expressam a relação LC3b-I/ β -actina e LC3-II/ β -Actina. Os dados são representativos de 2 experimentos similares e independentes. 81

Figura 19: Expressão de miRNAs de sangue periférico de pacientes paucibacilares e multibacilares. O RNA total foi extraído com o *kit* específico para sangue coletado em tubos *PaxGene*. Após análise de qualidade e quantificação dos miRNAs no Bioanalyzer, foi realizada a RT multiplex seguido de qPCR Biomark (Fluidigm). O gráfico mostra os valores de expressão normalizados do miR-15b para os grupos PB (n = 9) e MB (n = 11) e do miR-

30e-5p para os grupos PB (n = 3) MB (n = 7). As barras representam média ± erro padrão da média; **p-valor ≤ 0,01 (altamente significativa); *p-valor ≤ 0,05 (significantes). 84

Figura 20: Expressão de miRNAs de sangue periférico de pacientes multibacilares e contatos intradomiciliares. O RNA total foi extraído com o *kit* específico para sangue coletado em tubos *PaxGene*. Após análise de qualidade e quantificação dos miRNAs no Bioanalyzer, foi realizada a RT multiplex seguido de qPCR Biomark (Fluidigm). O gráfico mostra os valores de expressão normalizados do miR-15b para os grupos HHC (n = 37) e MB (n = 11); do miR-30e-5p para os grupos HHC (n = 16) e MB (n = 7) e do miR-196a para os grupos HHC (n = 13) e MB (n = 4). As barras representam média ± erro padrão da média; **p-valor ≤ 0,01 (altamente significativa); *p-valor ≤ 0,05 (significantes). 85

Figura 21: Expressão de miRNAs de sangue periférico de contatos, paciente paucibacilares e multibacilares. O RNA total foi extraído com o *kit* específico para sangue coletado em tubos *PaxGene*. Após análise de qualidade e quantificação dos miRNAs no Bioanalyzer, foi realizada a RT multiplex seguido de qPCR Biomark (Fluidigm). O gráfico mostra os valores de expressão normalizados do miR-15b para os grupos HHC (n = 37), PB (n = 9) e MB (n = 11) e do miR-30e-5p para HHC (n = 16), PB (n = 3) e MB (n = 7) As barras representam média ± erro padrão da média; **p-valor ≤ 0,01 (altamente significativa); *p-valor ≤ 0,05 (significantes). 86

Figura 22: Expressão de miRNAs de sangue periférico de pacientes hansênicos e controles saudáveis. O RNA total foi extraído com o *kit* específico para sangue coletado em tubos *PaxGene*. Após análise de qualidade e quantificação dos miRNAs no Bioanalyzer, foi realizada a RT multiplex seguido de qPCR Biomark (Fluidigm). O gráfico mostra os valores de expressão normalizados de controles (Cont) (n = 8) e doentes (Lep = MB, n = 10 + PB, n = 10). As barras representam média ± erro padrão da média; **p-valor ≤ 0,01 (altamente significativa); *p-valor ≤ 0,05 (significantes). 87

Figura 23: Pareamento entre a região 3'UTR do gene BIRC6 com o miR-30e-5p e miR-196. A sequência superior representa a região 3' UTR e a inferior representa o miRNA. Observa-se um pareamento perfeito entre com os nucleotídeos 2-8 (região de semente) dos miRNAs maduros. Fonte: TargetScan. 92

Figura 24: Modelo que representa o possível papel do miR-146a e suas variantes genéticas na infecção de macrófagos pelo *M. leprae*. As variantes genéticas do miR-146a podem influenciar o balanço de TNF-α, tendo como consequência diferentes fenótipos celulares de resistência ao *M. leprae*. O modelo ainda sugere o envolvimento do processo autofágico, e destaca a possível participação da via IFN-γ. Ao longo do espectro miR-146a vs. TNF-α, sugerimos a localização mais provável dos polos hansênicos. 105

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa e crônica que tem o *Mycobacterium leprae* como agente etiológico. A doença se apresenta através de um espectro clínico onde as variações genéticas do hospedeiro contribuem para os fenótipos de resistência ou susceptibilidade à doença, associados ao balanço da resposta imune entre os polos Th1 x Th2, respectivamente. O objetivo deste estudo foi investigar o papel de miRNAs na imunopatogênese da hanseníase. Os MicroRNAs são pequenos RNAs não-codificantes que atuam no silenciamento da expressão gênica. Para isso, foram utilizadas abordagens genéticas e funcionais. Através de um estudo do tipo caso-controle, investigamos a associação de seis polimorfismos de base única (SNP) em genes de miRNAs. Dentre eles, dois estão ausentes na população estudada, o miR-125a (rs12975333 G>T) e miR-223 (rs34952329 *>T). O miR-196a-2 (rs11614913 C>T) não foi associado à hanseníase. Em contrapartida, dos três SNPs do miR-146a estudados (rs2431099, rs2431697 e rs2910164), apenas a variante rs2910164 (G>C) foi associada à susceptibilidade a hanseníase *per se* (GC OR=1,44, p=0,04; CC OR=2,18, p=0,0091), dado corroborado através de um estudo de famílias (p= 0,003). Além disso, o miR-146a apresenta níveis elevados em biópsias de nervo (p= 0,01), e a estratificação por genótipo revelou que portadores do alelo-C (alelo de risco) apresentaram maior expressão do miR-146a (p=0,04). *In vitro*, sua expressão foi induzida pela exposição de macrófagos ao bacilo viável (p<0,05). Sabe-se que o miR-146a suprime a produção de TNF- α . Assim, mostramos que indivíduos carregadores do alelo-C, tanto em nervos (p= 0,0453) quanto em PBMC estimulados com BCG (p= 0,0352), apresentam baixos níveis de TNF- α . Em conjunto, fica clara a correlação entre o genótipo de susceptibilidade e modulação dos níveis de TNF- α . Na segunda parte deste trabalho, foi realizado um estudo com macrófagos derivados de medula óssea-(BMDM) provenientes de camundongos selvagens ou nocautes para o miR-146a. A infecção dos BMDM selvagens com a bactéria viável resultou em aumento da expressão do miR-146a (p< 0,05), corroborando o que foi previamente observado. BMDM nocautes infectados com *M. leprae* apresentaram uma maior expressão de TNF- α comparado às células selvagens. Ainda, observou-se uma queda de 66,5% na viabilidade intracelular do *M. leprae* nestas células. Contudo, não foi possível correlacionar este achado com mecanismos de *killing*, tais como a produção de NO e a ativação da via autofágica. O diagnóstico precoce de indivíduos com a doença latente é ainda um dos grandes desafios no controle da hanseníase. Assim, analisou-se os níveis de miRNAs do sangue periférico como potenciais biomarcadores, usando-se um painel de 93 miRNAs candidatos. A comparação entre pacientes paucibacilares-(PB) e multibacilares-(MB) mostrou que o miR-15b estava induzido e o miR-30e-5p estava reprimido em pacientes MB. Ao passo que a comparação entre contatos e pacientes-MB identificou, além dos miRNAs citados anteriormente, que o miR-196a estava reprimido em MB. Por fim, o miR-484 estava induzido em pacientes quando comparados a contatos e o miR-206 estava reprimido em pacientes quando comparados aos indivíduos saudáveis. A ontologia gênica dos RNAm-alvos dos miRNAs diferencialmente expressos indicou o envolvimento das vias de ubiquitinação/autofagia.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious and chronic disease caused by *Mycobacterium leprae*. The disease presents itself through a clinical spectrum where the host's genetic variations contribute to the resistance or susceptibility phenotypes, associated with the balance of the immune response between the Th1 x Th2 poles, respectively. The aim of this study was to investigate the role of miRNAs in the immunopathogenesis of leprosy. MicroRNAs are small non-coding RNAs that silence the gene expression. For this, genetic and functional approaches were used. Through a case-control study, we investigated the association of six single nucleotide polymorphisms (SNPs) in miRNA genes. Among them, two are absent in the population studied, miR-125a (rs12975333 G>T) and miR-223 (rs34952329 *>T). MiR-196a-2 (rs11614913 C>T) was not associated with leprosy. In contrast, out of the three miR-146a SNPs studied (rs2431099, rs2431697 and rs2910164), only the variant rs2910164 (G> C) was associated with leprosy susceptibility *per se* (GC OR = 1.44, p = 0.04; CC OR = 2.18, p = 0.0091), corroborated by a family-based study (p = 0.003). In addition, nerve biopsies had high levels of miR-146a (p=0.01), and genotype stratification revealed that subjects carrying the C-allele (risk allele) had higher miR-146a expression (p= 0.04). *In vitro*, its expression was induced by the exposure of macrophages to the viable bacillus (p <0.05). MiR-146a is known to suppress TNF- α production. Thus, we showed that individuals carrying the C-allele, both in nerves (p = 0.0453) and in BCG-stimulated PBMC (p = 0.0352), present low levels of TNF- α . Together, the correlation between the susceptibility genotype and the modulation of TNF- α level is evident. In the second part of this work, we conducted an investigation using bone marrow derived macrophages (BMDM) from mice lacking the miR-146a gene and wild-type. Infection of wild-type BMDM with viable bacteria resulted in increased expression of miR-146a (p <0.05), corroborating what was previously observed. BMDM knockouts infected with *M. leprae* had a higher expression of TNF- α compared to wild-type cells. Furthermore, a decrease of 66.5% in the intracellular viability of *M. leprae* was observed in these cells. However, it was not possible to correlate this finding with killing mechanisms, such as NO production and autophagy activation. Early diagnosis of individuals with latent disease is still one of the major challenges in controlling leprosy. Thus, miRNAs levels from peripheral blood were analyzed as potential biomarkers, using a panel of 93 candidate miRNAs. The comparison between paucibacillary-(PB) and multibacillary-(MB) patients showed that miR-15b was induced and miR-30e-5p was repressed in MB patients. Whereas, in addition to the miRNAs mentioned above, the comparison between contacts and MB-patients identified that miR-196a was repressed in MB. Finally, miR-484 was upregulated in patients when compared to contacts and miR-206 was downregulated in patients when compared to healthy subjects. The gene ontology analysis of predicted mRNA-targets for differentially expressed miRNAs indicated the involvement of ubiquitination/autophagy pathways.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xi
RESUMO.....	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E METODOLOGIA.....	1
1. Hanseníase.....	1
1.1 Perspectiva histórica	1
1.2 Epidemiologia	2
1.3 Formas clínicas	4
1.4 Transmissão	7
1.5 Diagnóstico.....	8
2. <i>Mycobacterium leprae</i>	9
3. Susceptibilidade genética à Hanseníase.....	10
4. Aspectos da interação parasita-hospedeiro.....	15
5. MicroRNAs.....	17
5.1 Histórico	17
5.2 Biogênese de miRNAs	19
5.3 Mecanismo de ação e predição de alvos	23
5.4 Polimorfismos de base única (SNPs) em microRNAs	25
5.5 MicroRNAs e infecções micobacterianas	27
5.6 MicroRNAs como biomarcadores.....	31
6. Justificativa	33
7. Objetivos.....	34
7.1 Objetivo geral	34
7.2 Objetivos Específicos	34
7.2.1 Estudo genético	34
7.2.2 Estudo funcional do miR-146a.....	34
7.2.3 Assinatura molecular de miRNAs.....	34

8. Apresentação aos métodos e resultados.....	35
9. Metodologia.....	36
9.1 Linhagens de camundongos	36
9.2 Obtenção e cultivo de macrófagos murinos derivados de medula óssea.....	36
9.3 Obtenção do <i>M. leprae</i>	37
9.4 Infecções de macrófagos murinos com <i>M. leprae</i>	38
9.5 Extração de ácidos nucleicos	38
9.6 Transcrição reversa e PCR quantitativo.....	39
9.7 Viabilidade molecular do <i>M. leprae</i>	40
9.8 ELISA.....	41
9.9 Detecção de nitrito.....	41
9.10 Obtenção do lisado total de macrófagos.....	42
9.11 Eletroforese e imunomarcção.....	42
9.12 Avaliação da viabilidade de macrófagos	43
9.13 Análise estatística para o estudo funcional do miR-146a	44
9.14 Obtenção das amostras de sangue total.....	44
9.15 Seleção de miRNAs.....	44
9.16 Extração de RNA a partir do sangue total.....	45
9.17 Quantificação e análise da integridade de miRNAs.....	45
9.18 Transcrição reversa e pré-amplificação	46
9.19 PCR quantitativo (Biomark Fluidigm).....	46
9.20 Análise de expressão dos dados de PCRq (Biomark Fluidigm) e estatística	47
9.21 Análise de enriquecimento dos alvos de miRNAs	48

Capítulo II – RESULTADOS: ESTUDO GENÉTICO E FUNCIONAL DE MICRORNAS CANDIDATOS NA HANSENÍASE 49

1. Artigo: O polimorfismo de base única do pre-miR-146a (rs2910164 G>C) está geneticamente e funcionalmente associado a hanseníase.....	50
1.1 Informações suplementares.....	59
Figure S1: The impact of “age-at-diagnosis” in miRSNP-146a association with leprosy per se susceptibility using age as a categorical variable.....	59

Table S1.Characteristics of the population included in the case-control study.	60
Table S2.Characteristics of the population included in the TDT study.....	61
Table S3. Genotype counts for miRSNP-146a in the Rio de Janeiro case-control group stratified according to age at leprosy.	62
Table S4. Genetic association of the miRSNP-196a-2 and miRSNP-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy outcomes (MB and PB).....	63
Table S5. Family Based Association test of leprosy outcome (PB and MB) from Duque de Caxias city population.	64
Table S6. Genetic association of miRSNP-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy reaction <i>per se</i>	65
Table S7. Genetic association of miRSNP-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy reactions as outcomes (RR and ENL).	66
2. Análise genética de associação entre SNPs da região promotora do miR-146a e a Hanseníase.....	67
3. Estudo funcional do gene miR-146a durante na infecção de macrófagos murinos pelo <i>Mycobacterium leprae</i>	71
3.1 O <i>M. leprae</i> induz a expressão do miR-146a em macrófagos murinos.....	72
3.2 A viabilidade dos macrófagos murinos não é alterada pela infecção com <i>M. leprae</i>	74
3.3 A expressão do miR-146a depende da viabilidade do <i>M. leprae</i>	75
3.4 Macrófagos miR-146a ^{-/-} expressam maiores níveis de TNF- α após infecção pelo <i>M. leprae</i>	76
3.5 A viabilidade do <i>M. leprae</i> é dependente da expressão do miR-146a	79
3.6 O <i>M. leprae</i> não induz a expressão de NO em macrófagos murinos.....	80
3.7 Macrófagos nocaute apresentam maior expressão de LC-3b quando infectados	81
Capítulo III – EXPRESSÃO DE MICRORNAS NO SANGUE DE PACIENTES E CONTATOS: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS VIAS REGULATÓRIAS	82
1. MiRNAs diferencialmente expressos no sangue de pacientes e contatos intradomiciliares.....	84
2. MiRNAs diferencialmente expressos no sangue de pacientes e indivíduos saudáveis	87
3. Predição de RNAm-alvos e processos biológicos dos miRNAs diferencialmente expressos.....	88

4. Identificação de processos biológicos compartilhados pelo miR-196a e miR-30e-5p 92

Capítulo IV – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES..... 93

1. Discussão 93

1.1 Estudo de associação genética funcional de miRNAs candidatos à hanseníase: o miR-146a 94

1.2 Estudo da expressão de miRNAs no sangue periférico de pacientes e contatos 106

2. Conclusões 111

3. Referências Bibliográficas 112

4. Anexos..... 126

4.1 miRNAs candidatos para o estudo do perfil de expressão em sangue periférico 126

4.2 Processos Biológicos sobre representados no GO relacionados com o miR-15b 128

4.3 Processos Biológicos sobre representados no GO relacionados com o miR-30e-p .. 129

4.4 Processos Biológicos sobre representados no GO relacionados com o miR-196a.... 130

4.5 Processos Biológicos sobre representados no GO relacionados com o miR-206..... 131

4.6 Processos Biológicos sobre representados no GO decorrentes da interação entre miR-30e-5p e miR-196a 132

4.7 Parecer de Aprovação do Comitê de Biossegurança e Risco Biológico do *Beckman Research Institute of the City of Hope* 133

4.8 Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ 134

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E METODOLOGIA

1. Hanseníase

A hanseníase se configura entre uma das mais antigas doenças que assolam a humanidade, acompanhada de muito estigma em virtude das incapacidades e deformidades geradas. Apresenta progressão lenta e crônica, podendo levar mais de uma década até que ocorra os primeiros sinais de manifestações clínicas. Seu agente etiológico, o *Mycobacterium leprae*, foi descrito em 1874, pelo médico e botânico norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen. O *Mycobacterium leprae* apresenta natureza fastidiosa sendo incultivável *in vitro*. Contudo, é um patógeno bem adaptado ao modo de vida intracelular, apresentando predileção por macrófagos na pele e a propriedade única de infectar células dos nervos periféricos (1). Surpreendentemente, em 2008, uma nova espécie foi descrita como a causadora da forma lepromatosa difusa eventualmente acompanhada do fenômeno de Lúcio; isolada no México, foi batizada de *Mycobacterium lepromatosis*. Estudos de genômica evolutiva baseados no gene 16S RNAr (2) e posteriormente dados de sequenciamento apontam que a separação entre estes dois grupos teve sua origem há, aproximadamente, 10 milhões de anos (3). Esta quebra de paradigma ainda encontra-se em debate por parte da comunidade científica (4), e pouco ou nada se sabe sobre a relevância e impacto desta nova espécie na epidemiologia e no manejo da hanseníase. Assim, ao longo desta tese serão abordados aspectos relativos à biologia e infecção pelo *Mycobacterium leprae*, quando não indicados de outra forma.

1.1 Perspectiva histórica

Embora não seja possível precisar o local de origem da hanseníase, acredita-se que seu surgimento esteja ligado ao Egito, Índia e China. Registros do antigo Egito, datados de 1500 a.c., já mencionavam uma doença cujos sintomas remetem à hanseníase. Na Índia, os registros datam de 600 a.c, enquanto na China uma coletânea de textos médicos lista sintomas como perda de sobrancelhas aliadas a presença de nódulos e ulcerações na pele (5). Também são encontrados relatos no livro de Levítico. Entretanto, argumenta-se que o termo hebreu *tsaraath* ou *saraath* denota afecções impuras e manchas brancas na pele, não sendo possível

estabelecer uma relação clara entre ambas. A hipótese mais atual localiza o surgimento da doença no leste da África sendo posteriormente levada para Índia, Ásia e Europa através de rotas migratórias e de comércio (6). Na Europa, acredita-se que a doença tenha sido introduzida pelos soldados de Alexandre, O Grande; ou os soldados de Pompeu. A chegada da doença nas Américas está diretamente ligada a história de colonização do Continente, por volta dos séculos XVI-XVII (7)

No Brasil, a hanseníase teria sido introduzida principalmente pelos portugueses e escravos africanos. O primeiro caso oficial de hanseníase na cidade do Rio de Janeiro, e no Brasil, datam de 1600. Um pouco mais de 140 anos depois, ocorre a construção do primeiro leprosário na cidade, o Lazareto, no bairro de São Cristóvão (1741). Como política pública no controle da doença, os indivíduos eram internados de forma compulsória nos leprosários espalhados pelo país. A partir de 1954, o isolamento compulsório é abolido e o tratamento dos doentes passa a ser ambulatorial (7,8). Em 1995, uma lei federal (Nº 9.010) modifica toda a terminologia utilizada; a nomenclatura lepra e todos os seus derivativos passam a ser proibidos e em substituição a palavra hanseníase passa a ser adotada como referencial.

1.2 Epidemiologia

A hanseníase é uma das principais micobacterioses de grande interesse e impacto nos sistemas de saúde. A doença faz parte do grupo de doenças negligenciadas e vem recebendo especial atenção com o programa de eliminação lançado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Com a introdução da poliquimioterapia (PQT) em 1981, a taxa de prevalência global sofreu uma redução maior que 45% (OMS). Os últimos dados epidemiológicos, referentes ao período de janeiro à março de 2014, registraram a prevalência global de 180.618 casos, representando uma taxa de 0,32 casos para cada 10.000 indivíduos. Em 2013, um total de 103 países reportaram a detecção de 215.656 novos casos, com a taxa global de 3,81 por 100.000 habitantes. Em comparação aos dados anteriores, foi observada a redução em números absolutos de 8.554 e 17.201 casos para a prevalência e incidência global, respectivamente (9).

A primeira meta global de eliminação da hanseníase preconizada pela OMS teve como objetivo atingir a prevalência de 1 por 10.000 habitantes (OMS), meta ainda não atingida pelo Brasil (figura 1) que apresenta prevalência de 1,42 por 10.000 habitantes (SINAM, 2013). A

nova meta global visa reduzir o número de indivíduos com grau II de incapacidade em 35% e promover a detecção ativa e precoce através do acompanhamento dos contatos intradomiciliares dos casos recém detectados. No Brasil, as estratégias também estão direcionadas para o diagnóstico precoce e tratamento dos doentes. Desta forma, procura-se o êxito na eliminação de fontes de infecção e a redução de incapacidades físicas devido ao diagnóstico tardio. Os principais indicadores são: o coeficiente de detecção geral e a detecção em menores de 15 anos, que reflete a transmissão recente e a tendência da endemia (DATASUS).

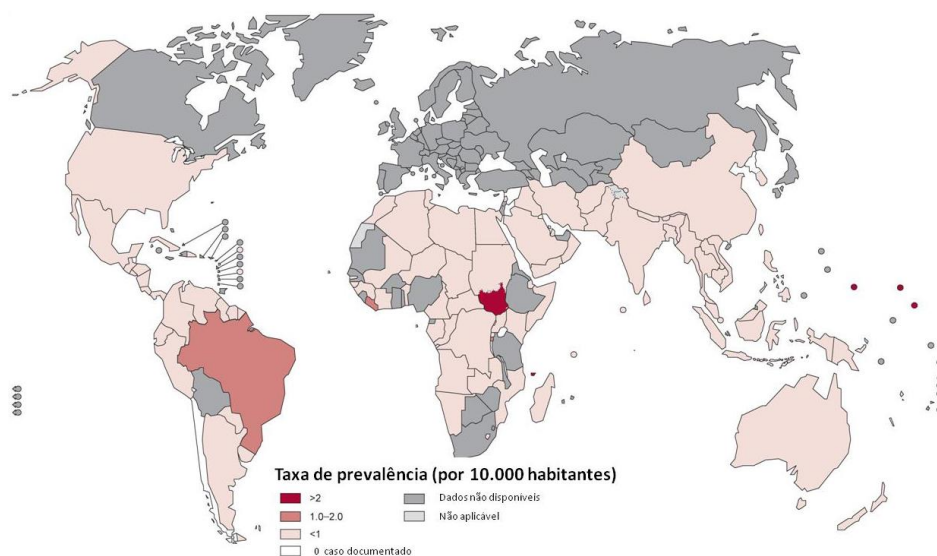


Figura 1: Taxa Global de Prevalência da Hanseníase. As taxas de prevalência correspondem aos dados reportados no início de 2012 e são expressos a cada 10.000 habitantes. O mapa destaca os países Sudão e Brasil como maiores índices (OMS, 2013).

Embora a primeira meta global ainda não tenha sido alcançada pelo Brasil, alguns Estados da federação estão de acordo com esta meta ($< 1/10.000$ habitantes), dentre eles estão: Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Norte, Distrito Federal, Alagoas e todos os Estados da Região Sul (SINAM, 2013). No Brasil, as áreas com maior risco de desenvolver a doença podem ser identificadas pela análise espacial de *clusters*, conforme reportado no período entre 2011-2013. Estes *clusters* foram estimados a partir das taxas de detecção global, como um parâmetro substitutivo da incidência. Como pode ser verificado no mapa (figura 2), os *clusters* de maior risco relativo estão predominantemente localizados nas regiões Norte e Centro-Oeste do país. Dentre eles, destacam-se os *clusters* 1 e 2 que correspondem aos Estados do Mato Grosso e Pará (risco relativo de 5,5–8,0). Dos novos casos detectados em

2013, 44% (13,597 / 31,044) correspondem às regiões localizadas nos Estados de maior risco relativo. No período de 2014 foram notificados 34.511 novos casos no Brasil (9).

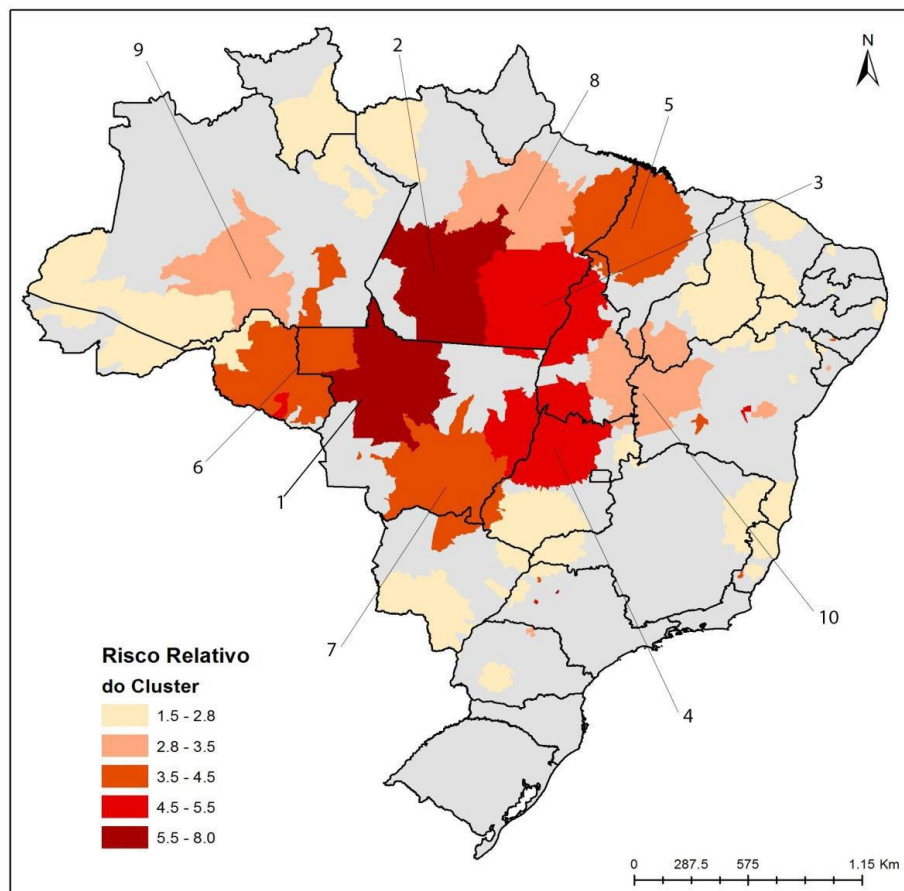


Figura 2: Distribuição espacial de clusters com maior risco relativo no Brasil. Análise de agrupamento da taxa de detecção geral de hanseníase no Brasil para o triênio 2011-2013. (OMS, 2014).

1.3 Formas clínicas

A Hanseníase pode ser entendida como uma doença infecciosa, espectral, de progressão lenta, e multifatorial, onde componentes ambientais e genéticos contribuem, em conjunto, para seus diferentes desfechos. O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular que apresenta tropismo por dois tipos celulares específicos: (a) as células de Schwann (CS) nos nervos periféricos, provocando morbidade e danos neurais irreversíveis que são decorrentes da perda da bainha de mielina e inflamação neural ou neurite; e (b) macrófagos da pele, causando um espectro de inflamação crônica, cujas manifestações clínicas são influenciadas pelo

desenvolvimento diferencial da resposta imune do hospedeiro (1). Reconhecem-se cinco formas clínicas com dois polos definidos pelo predomínio de citocinas Th2, forma lepromatosa/disseminada (LL); e Th1, forma tuberculóide/resistente (TT) (figura 3). As formas intermediárias são denominadas *borderlines* segundo a proximidade de cada polo: *borderline* lepromatoso (BL) e *borderline* tuberculóide (BT). Finalmente, a forma *borderline* *borderline* (BB) situa-se de maneira central as manifestações citadas anteriormente (10). Devido a dicotomia entre os eixos Th1/Th2, a hanseníase também tem sido utilizada como um modelo para a melhor compreensão da ativação diferencial das respostas imune celular e humoral polarizadas, respectivamente.

Ao longo da evolução da doença ou até mesmo após a sua cura, entre 15-50% dos pacientes podem desenvolver os chamados episódios reacionais. Estes são marcados por uma intensa resposta imune contra o bacilo, ocorrendo de forma repentina durante a progressão da doença e, muito frequentemente, após o início do tratamento PQT. Pacientes classificados como *borderlines* (BT, BB e BL) tem maior chance de desenvolver reação reversa (RR ou reação tipo I), caracterizada por uma súbita reativação da resposta imune celular (Th1). Com frequência, durante a RR os pacientes podem sofrer comprometimento neural (neurites), causando danos irreversíveis. Pacientes classificados como LL e BL são mais propensos a manifestar o eritema nodoso hansênico (ENH ou reação tipo II), um estado caracterizado pela intensificação tanto da resposta imune celular quanto humoral e produção sistêmica de IL-4 e TNF (11,12). A etiologia das reações hansênicas ainda é desconhecida, não se sabe exatamente se a intensa liberação de citocinas pode ser a causa ou a consequência deste fenômeno, embora fatores de risco, tais como: forma clínica, índice baciloscópico, idade, gravidez, fatores ambientais e genéticos, contribuam com o desfecho (11). Por terem consequências tão danosas aos pacientes, a identificação de marcadores preditivos destas manifestações é altamente desejada.

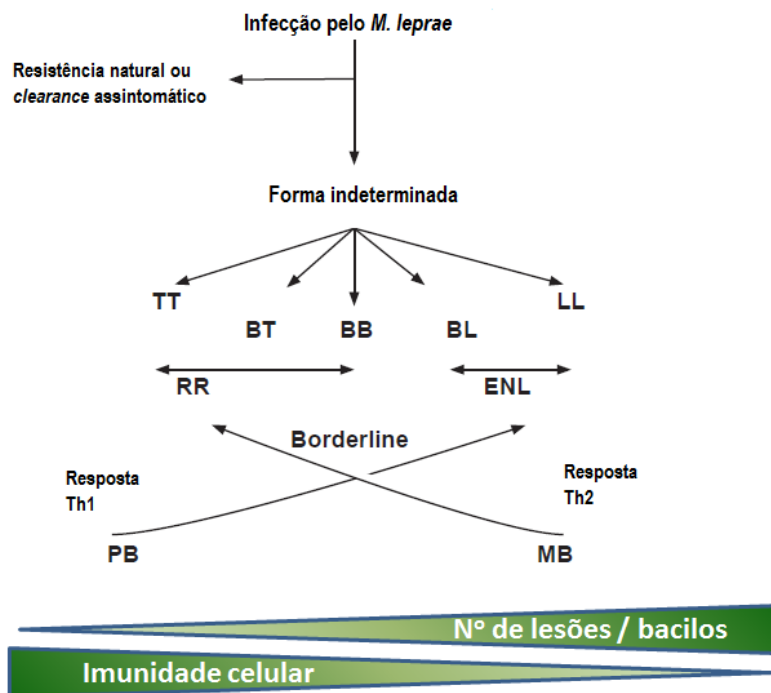


Figura 3: Espectro de manifestações clínicas da hanseníase. Polo TT, caracterizado pelo predomínio da imunidade celular (Th1) e presença de poucos bacilos. Antagonicamente, no polo LL se observa predomínio da resposta imune humoral (Th2) e alta carga bacilar. Adaptado de Coates *et al.*, 2010.

Visando uma melhor estratégia para tratamento, a OMS criou uma classificação operacional baseada, principalmente, no número de lesões. Indivíduos que apresentem número igual ou acima de seis lesões são classificados como multibacilares (MB) e geralmente apresentam baciloscopia positiva. Por outro lado, a baciloscopia negativa está mais frequentemente associada a pacientes que apresentam de duas a cinco lesões, que os definem como paucibacilares (PB). A presença de apenas uma lesão os classificam como paucibacilares de lesão única ou SLPB (do inglês, *single lesion PB*) (13). Neste trabalho, utilizaremos a denominação multibacilar para englobar as formas clínicas LL, BL e BB, e a terminologia paucibacilar para nos referirmos às formas TT e BT.

1.4 Transmissão

O mecanismo de transmissão da doença ainda não é completamente compreendido. Entretanto, a transmissão através das vias aéreas entre um indivíduo doente e outro sadio é aceita como a forma mais provável de transmissão. Um outro fator a ser considerado é o tempo de exposição ao bacilo e a carga bacilar do transmissor (caso índice). Assim, os indivíduos comunicantes, ou seja, familiares ou não que vivem no mesmo domicílio de indivíduos doentes, compõem a parcela da população com maior probabilidade de desenvolver a doença, e por isso recebem acompanhamento por parte das equipes de saúde (14). A estratégia de monitoramento de contatos tem sido utilizada no sentido de realizar um diagnóstico precoce destes indivíduos, com testes clínicos complementares. Dentre eles, a detecção de anticorpos IgM anti-glicolípido fenólico-1 (PGL-1), um antígeno específico do *M. leprae*. O teste de Mitsuda negativo, que consiste na inoculação intradérmica de antígenos, também pode ser considerado um parâmetro de risco. Estes dois testes aliados representam uma prova de infecção do contato, mas não predizem o adoecimento (15). Somado a isso, os baixos índices de condições socioeconômicas da população exposta também são indicados como fatores de risco.

A ideia de que a transmissão possa ocorrer pelo trato respiratório, através das secreções nasais e saliva, é suportada por estudos que evidenciam a presença do DNA de *M. leprae* nestas amostras (16,17). Em concordância com esta hipótese, camundongos infectados experimentalmente por instilação nasal apresentaram infecção pelo bacilo em macrófagos e células epiteliais (18). Além disso, a detecção do bacilo em amostras de solo e água sugerem que o ambiente poderia ser uma fonte potencial de contágio (19)

Tatus selvagens (*Dasypus novemcinctus*) da região centro-sul dos Estados Unidos da América apresentam infecção pelo *M. leprae* e, interessantemente, desenvolvem manifestações clínicas com comprometimento de pele e nervos, à semelhança do que ocorre com os seres humanos. Nestas regiões, o contato com tatus é um fator de risco no contágio com a bactéria. Relatos de tatus infectados surgiram no México, Argentina e Brasil (19,20). Historicamente, discutia-se se estes animais seriam apenas reservatórios silvestres do bacilo ou se teriam papel na

transmissão. Entretanto, Truman e colaboradores (2011) comprovaram a partir do sequenciamento de genomas completos que a mesma cepa de *M. leprae* pode ser encontrada em tatus e indivíduos infectados da região sul dos Estados Unidos. A cepa é endêmica e detectada em casos autóctones, não tendo sido reportada em nenhuma outra região do globo, sugerindo que a hanseníase também pode ser uma zoonose (21).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase pode ser essencialmente clínico através da observação dos sintomas clássicos que incluem lesões na pele com alteração de sensibilidade e espessamento de nervos periféricos. Em casos de diagnóstico inconclusivo, exames laboratoriais são utilizados de forma complementar. Neste caso, podem ser empregadas as técnicas de baciloscopia e histopatologia. A primeira consiste na busca pelo bacilo em amostras de linfa provenientes das lesões, através do método de Ziehl–Neelsen, específico para evidenciar micobactérias. A segunda inclui a análise e caracterização das alterações histológicas e morfológicas encontradas nas biópsias de pele e/ou nervo (1) .

Além das técnicas descritas, outros métodos podem ser empregados. Dentre eles, a detecção sorológica de anticorpos contra um antígeno específico do *M. leprae*, o PGL-1, o glicolípido fenólico I (22,23). Um grande avanço no diagnóstico diferencial da doença foi conseguido com o emprego da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A partir da extração de ácidos nucleicos de amostras clínicas é possível não só detectar o DNA do bacilo, como também testar a sua viabilidade e enumerar bactérias (24–26). A PCR tem sido uma ferramenta valiosa no diagnóstico da forma neural pura (PNL), onde há comprometimento dos nervos sem sintomas aparentes na pele (27).

De acordo com a OMS, os indivíduos que apresentam pelo menos um dos sinais clínicos e/ou baciloscopia positiva devem receber o tratamento de PQT. Este consiste na administração combinada de 3 antibióticos: rifampicina, dapsona e clofazimina. A posologia e tempo de tratamento irá depender da classificação clínica do paciente e se este apresenta algum dos episódios reacionais da doença. Em linhas gerais, pacientes PB recebem tratamento por 6

meses, e os MB por 12 meses. As reações hansênicas são tratadas com anti-inflamatórios esteroidais e/ou talidomida.

2. *Mycobacterium leprae*

O gênero *Mycobacterium* faz parte da família *Mycobacteriaceae* e tem como principais representantes as bactérias patogênicas *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tb*) e *M. leprae*. Este grupo compartilha similaridades genéticas com bactérias do grupo gram-positivo. Contudo, sua parede celular apresenta abundância de ácido micólico (60%), cujas propriedades físico-químicas não permitem que a coloração de Gram fique retida. Assim, emprega-se o uso de outro corante, a fucsina, que sob aquecimento adequado é capaz de se impregnar à parede celular micobacteriana, não sendo descorada após a lavagem com soluções de álcool-ácido. Esta característica denomina este grupo de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR). O ácido micólico é o principal responsável pela alta impermeabilidade observada na parede celular das micobactérias devido a sua grande hidrofobicidade, esta característica confere grande resistência, em parte, à ação de fármacos representando um desafio no tratamento (28).

A estrutura geral da parede celular do *M. leprae* consiste em duas camadas, interna e externa, que envolvem a membrana plasmática. O revestimento mais externo, ou cápsula, é constituído basicamente de lipopolissacarídeos – lipoarabinomanana (LAM) e lipomanana (LM). É nesta camada também onde está presente o PGL-1. A camada mais interna e em contato com a membrana plasmática é constituída por peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos unidos de forma covalente formando um complexo insolúvel (28). O *M. leprae* apresenta natureza fastidiosa, com crescimento lento estimado em 14 dias e incultivável *in vitro*. Estas características trazem desafios no estudo da doença bem como no desenvolvimento de modelos experimentais. Este problema foi parcialmente superado com o desenvolvimento de técnicas de cultivo *in vivo* desenvolvida em tatus ou coxim plantar de camundongos suscetíveis, como o Balb/C, e posteriormente em camundongos *nude* atímicos (29).

Com o sequenciamento do genoma do *M. leprae*, concluído em 2001, foi possível realizar uma comparação entre seu genoma e o do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Os resultados desta análise revelaram características muito peculiares. Dentro do gênero *Mycobacterium*, o *M. leprae* apresenta o menor genoma (com tamanho de 3,31 Mb *versus* 4,4 Mb de *Mtb*), e

menor conteúdo G+C (57,79% comparado a 65,61% de *Mtb*). Menos da metade do seu genoma (49,5%) codifica proteínas, contendo um total de 1.133 genes inativos dentre pseudogenes ou genes degenerados, enquanto que o *Mtb* apresenta apenas 6 pseudogenes (30). A presença de um número elevado de pseudogenes pode ser consequência de uma evolução reductiva com perda maciça de genes, refletindo uma adaptação ao modo de vida intracelular, como já observado em outros patógenos também restritos ao nicho intracelular, tais como: *Mycoplasma*, *Chlamydia*, *Rickettsia* spp. e *Mycobacterium ulcerans* (31).

Uma análise comparativa entre diferentes cepas de *M. leprae* isoladas de 4 localidades – Brasil, Tailândia, Índia e Estados Unidos – mostrou que o conteúdo genético é essencialmente idêntico (99,995% de similaridade) em termos de sequência, número de genes e organização. A fonte de variação entre as cepas é basicamente devido a presença de polimorfismos de base única (SNPs), com um total de 215 sítios polimórficos; mas também pela presença de 5 pseudogenes que são exclusivos para algumas cepas (6).

Assim como o *M. leprae*, a nova espécie identificada como causadora do fenômeno de Lúcio, *M. lepromatosis*, também apresenta genoma reduzido (~3,27 Mb), compartilhando com esse 93% da sequência relativa a genes codificantes e 82% da sequência de pseudogenes. Neste estudo o *M. lepromatosis* foi isolado a partir de uma biópsia de pele de um indivíduo mexicano que veio a óbito apresentando o fenômeno de Lúcio. A comparação funcional entre os dois genomas mostra que *M. lepromatosis* perdeu enzimas relativas à metabolização de aminoácidos, enquanto o *M. leprae* apresenta uma via defeituosa no metabolismo de heme (32).

3. Susceptibilidade genética à Hanseníase

Como explicado na seção anterior, a variabilidade genética do *M. leprae* é extremamente baixa, ao passo que as manifestações clínicas associadas à doença se apresentam de forma bastante diversa. Esse inicial paradoxo pode ser melhor compreendido quando levamos em consideração a contribuição do repertório genético do hospedeiro desde os estágios iniciais da doença até a sua progressão. De fato, a observação da influência do componente genético foi primeiramente relatada no século XIII pelo monge franciscano Bartholomeu Angelicus, que propôs a transmissão da doença dos pais para os filhos (33). Neste sentido, a hipótese da

influência do componente genético já foi corroborada por diferentes estratégias e métodos de estudo observacionais e experimentais. Resumidamente, os dados apontam para maior concordância entre gêmeos monozigóticos quando comparados aos dizigóticos e maior incidência em pacientes de família com casamentos consanguíneos (34) não apenas para hanseníase como também para tuberculose. Para exemplificar, um acidente ocorrido entre neonatos, decorrido na cidade de Lübeck na Alemanha em 1930, ilustra bem esta questão. Durante a vacinação, 251 neonatos receberam uma vacina contaminada com *Mtb*, como resultado 72 crianças desenvolveram a tuberculose e morreram, 61 apresentaram uma forma severa, 95 tiveram uma forma branda enquanto que 17 se mantiveram assintomáticos; as 6 crianças restantes morreram de causas não relacionadas à tuberculose (34).

Estudos genéticos com a abordagem de genes candidatos tem se mostrado uma ferramenta valiosa na identificação de genes associados à hanseníase. Estes genes podem ser selecionados pela sua relevância funcional previamente reconhecida; pela sua proximidade a regiões genômicas anteriormente implicadas com a doença ou por ambas as estratégias (35). Neste caso, os desenhos experimentais utilizados envolvem estudos do tipo caso-controle e/ou estudos de famílias. O primeiro consiste no recrutamento de indivíduos de uma determinada população, desta forma, espera-se que estes tenham o mesmo nível de exposição ao patógeno. Estes indivíduos são divididos em dois grupos: os casos (afetados) e controles (saudáveis ou não afetados). Ampliando esta definição, por exemplo, o grupo controle pode ser composto por pacientes que não desenvolveram nenhum tipo de reação hansênica; enquanto o grupo de casos pode ser formado por pacientes que tenham passado por algum tipo de episódio reacional. Em ambos os casos, posteriormente é realizada a comparação das frequências genotípicas e fenotípicas de um determinado marcador genético. A heterogeneidade das frequências entre estes dois grupos poder ser um indicativo de associação. Resumidamente, a maior frequência de um determinado marcador no grupo de casos reflete sua associação à susceptibilidade; ao passo que, se este aumento for observado no grupo de controles irá refletir seu efeito associado à proteção. A estimativa de associação é dada através da razão entre as probabilidades de um indivíduo que possui o marcador de risco estar ou não doente, a esta razão chamamos *odds ratio* (OR). Deste modo, se a razão for igual a 1, podemos concluir que não há associação entre o marcador e a doença; se a razão for maior que 1 o marcador é considerado um fator de risco para a doença; ao passo que uma OR menor que 1 indica um efeito protetor deste marcador. Em conclusão, estudos genéticos do tipo caso-controle buscam

indicar uma relação de causalidade entre um marcador genético de escolha e um determinado desfecho (35). Considerando que a hanseníase apresenta diversas manifestações clínicas, este tipo de estudo pode ser realizado para identificar a associação genética a diferentes desfechos, isto é, hanseníase *per se*, formas clínicas, episódios reacionais e recidivas.

De forma a complementar os dados obtidos por um estudo do tipo caso-controle, podemos também utilizar um desenho experimental que conta com amostragens familiares. O recrutamento dos indivíduos consiste na seleção dos pais biológicos e seu(s) filho(s) afetado(s). Este desenho tem por objetivo avaliar o padrão de transmissão do alelo de risco herdado pelos filhos afetados a partir de seus pais heterozigotos, através de uma análise de desequilíbrio de transmissão; sendo o alelo não transmitido utilizado como controle. A vantagem de utilizar esta abordagem reside no fato dela não ser influenciada por padrões e características genéticas intrínsecas de uma determinada população (36).

A combinação destas estratégias tem favorecido a caracterização de uma série de genes e vias confirmadas posteriormente. A influência da genética do hospedeiro vem sendo caracterizada em associação a diferentes tipos de doenças infecciosas como por exemplo leishmaniose, dengue e tuberculose (37). A relação entre os genes de imunidade inata e adaptativa nas diferentes manifestações clínicas da Hanseníase oferece uma lista de genes candidatos que merecem maior atenção no seu papel quanto a susceptibilidade à doença. Neste sentido, acredita-se que os genes podem influenciar um determinado desfecho num modelo de 2 estágios da doença (figura 4). Assim, o primeiro estágio estaria relacionado com a primeira linha de defesa (imunidade inata) contra o agente infeccioso, no desfecho de susceptibilidade e/ou resistência à hanseníase *per se*. No segundo estágio, outro grupo de genes, tais como aqueles reguladores do eixo Th1/Th2, exerceria maior influência no desfecho relativo a severidade da doença ao longo do espectro de manifestações clínicas. De modo complementar, Moraes e colaboradores (2006) sugeriram que a intensidade da resposta Th1 pode ter um papel decisivo nos desfechos pós infecção pelo *M. leprae*. Deste modo, os indivíduos capazes de debelar a infecção teriam uma produção de citocinas Th1 mais intensa, ao passo que a redução deste fenótipo seria acompanhado pela gravidade clínica da hanseníase. Além disso, também podem contribuir para evolução de algum quadro de episódio reacional ou dano neural (33). Cabe ressaltar que este é apenas um modelo que visa facilitar a sistematização deste tipo de estudo, uma vez que a interação entre os genes e o balanço na

produção de mediadores da resposta imune ocorre de forma mais complexa e é difícil estabelecer um limite de atuação exclusivo em cada um destes estágios.

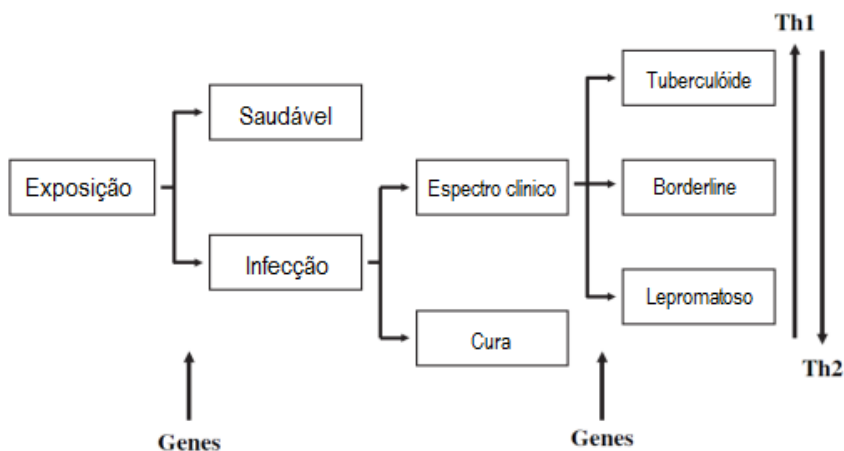


Figura 4: Modelo de 2 estágios no estudo de genes associados à susceptibilidade a hanseníase. 1º estágio: a exposição ao bacilo pode ter como consequência o adoecimento ou a resistência ao estabelecimento da infecção (hanseníase *per se*). 2º estágio: estabelecida a infecção, o indivíduo com infecção subclínica (assintomático) pode evoluir para a cura ou para um dos espectros clínicos da doença. Nesta etapa, um segundo conjunto de genes estaria relacionado à severidade da doença. Adaptado de Mira, 2006.

A seguir, observa-se um resumo das principais vias classicamente associadas a hanseníase (tabela 1). Dentre os marcadores genéticos mais estudados em análises de associação genética, estão os polimorfismos de base única (SNPs), uma das maiores fontes de variação do genoma humano. Posteriormente, na seção 5.4, serão apresentados alguns dados de SNPs em genes de miRNAs.

Tabela 1: Resumo dos principais estudos de associação genética na hanseníase.

GENE CANDIDATO	DESENHO DE ESTUDO	POPULAÇÃO	DESFECHO	ASSOCIAÇÃO
<i>Imunidade Inata</i>				
TLR1	Caso-controle	Nepal	Hanseníase <i>per se</i>	Proteção
MRC1	Caso-controle	Vietnam	Hanseníase <i>per se</i>	Proteção
	Estudo de famílias	Brasil	Forma multibacilar	
NOD2	Rastreamento genômico	Chinesa	Hanseníase <i>per se</i>	Susceptibilidade
TNF-α	Caso-controle	Brasil	Hanseníase <i>per se</i>	Proteção
	Estudo de famílias			
PARK2	Clonagem posicional	Vietnam	Hanseníase <i>per se</i>	Susceptibilidade
	Caso-controle			
	Estudo de famílias	Brasil		
<i>Imunidade adaptativa</i>				
HLA classe I (alelo A11)	Caso-controle	Korea	Hanseníase <i>per se</i>	Susceptibilidade
	Rastreamento genômico	Índia		
HLA Classe II		Vietnam	Hanseníase <i>per se</i>	Susceptibilidade
		Brasil		
DRB1*10	Caso-controle	Turquia	Hanseníase <i>per se</i>	Susceptibilidade
	Estudo de famílias	Korea		
DRB1*04	Caso-controle	Japão	Hanseníase <i>per se</i>	Proteção
	Estudo de famílias	Vietnam		
IFN-γ	Caso-controle	Brasil	Hanseníase <i>per se</i>	Proteção
IL-10	Caso-controle	Brasil	Hanseníase <i>per se</i>	Susceptibilidade
			Forma paucibacilar	

4. Aspectos da interação parasita-hospedeiro

Como descrito anteriormente, existe uma boa correlação entre os perfis clínicos da hanseníase e o predomínio da resposta imune do hospedeiro. Do ponto de vista imunológico, pacientes do polo LL apresentam um predomínio de citocinas características da resposta imune humoral Th2, com produção de IL-4 e IL-10 (39), formação de complexos de anticorpos, ausência da formação de granulomas e a inabilidade de restringir o crescimento micobacteriano. Observa-se ainda abundância de células T CD8⁺ e presença de macrófagos espumosos. Em contraste, o polo TT é caracterizado pela prevalência da resposta imune celular com produção de IL-2 e IFN- γ , abundância de células T CD4⁺ e presença de granulomas que restringem o crescimento bacteriano. Entretanto, grande parte da população doente se encontra localizada dentro do espectro *borderline*, que são consideradas formas mais instáveis e cuja imunologia é pouco compreendida. Neste sentido, alguns estudos sugerem que estes pacientes poderiam ser correlacionados com o perfil Th0 de citocinas, isto é, IFN- γ , IL-2 e IL-4 (1).

O reconhecimento *do M. leprae* pelo sistema imune tem início pela sua interação com receptores de reconhecimento de padrões (PRR) que atuam no reconhecimento de motivos e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Dentre eles, destacam-se os receptores do tipo *toll* (TLR), que fazem parte de uma família de proteínas transmembrana do tipo I, que é altamente conservada (40). A bactéria interage com a sítios extracelulares do heterodímero TLR1/2, que são capazes de reconhecer diferentes domínios do *M. leprae*, especialmente lipopeptídeos e a lipoproteína de 19 kDa. Acredita-se que estes receptores possam fazer uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, calcados na evidência de sua participação na diferenciação de monócitos em macrófagos – associados à função antimicrobicida – ou células dendríticas – células apresentadoras de antígenos (41). Interessantemente, os TLR1/2 estão envolvidos na expressão de diferentes tipos de microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes que apresentam função reconhecida no controle da resposta imune do hospedeiro. Esta temática será apresentada mais adiante no item 5.

Patógenos intracelulares, tais como o *M. leprae*, usam os receptores de superfície como porta de entrada, ativando o sistema complemento. De modo geral, esta manobra permite que a bactéria seja fagocitada sem que ocorra a produção de espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, a sua ação bactericida. Assim, além da utilização dos TLR, o *M. leprae*

também utiliza os receptores de manose – através da interação com o PGL-1 – e potencialmente os receptores DC-SIGN (do inglês, *dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-grabbing nonintegrin*) (41,42)

Sobreviver dentro do ambiente intracelular de um fagócito, como o macrófago, requer que o patógeno apresente mecanismos sofisticados de sobrevivência. Tais mecanismos precisam evitar a produção de agentes oxidantes, a fusão entre fagossomo e lisossomo, bem como a ação das enzimas lisossomais. Neste sentido, o *M. leprae* consegue subverter a resposta microbicida dos macrófagos promovendo um fenótipo fagocítico (43), e inibindo a apoptose de macrófagos (44). Adicionalmente, a ativação da via interferon tipo I (IFN-I) por micobactérias tem sido apontada como um regulador negativo da resposta imune inata (45,46), antagonizando a via microbicida promovida pelo IFN- γ , um IFN do tipo II (47).

5. MicroRNAs

"O genoma humano é como ter à mão uma versão do romance Guerra e Paz em russo. É um grande livro contendo tudo sobre experiências humanas, mas impossível de ler se você não souber russo."

Ewan Birney, diretor do *European Bioinformatics Institute*.

A frase supracitada oferece uma analogia aos desafios de compreender o funcionamento do genoma humano após a finalização do seu sequenciamento em 2003. Um destes desafios pode ser representado pela surpresa de apenas 2% do genoma codificar informações para síntese de proteínas. O termo "DNA lixo", cunhado na década de 60 para explicar o surgimento dos pseudogenes; foi prontamente adotado como referência a 98% da parcela não codificante do genoma, identificada pelo projeto ENCODE (do inglês, *Encyclopedia of DNA Elements*) (48). À época, embora já se soubesse da existência de regiões funcionais e não codificantes - tais como os RNA transportadores e ribossomais - com esta descoberta, uma nova camada de complexidade vem sendo adicionada a este cenário (49). Atualmente, sabe-se que os RNAs não codificantes possuem importante papel regulatório na expressão gênica. Este grupo pode ser subdividido de acordo com o seu tamanho em longos ou pequenos RNAs. Dentre os pequenos RNAs, aqueles chamados microRNAs (miRNAs) tem recebido grande interesse por parte da comunidade científica. Estes se destacam por possuírem mecanismo de ação e sequências bastante conservadas evolutivamente; e estima-se que possam modular a expressão gênica de aproximadamente 1/3 do genoma humano.

5.1 Histórico

A descoberta dos miRNAs ocorreu em 1993 com um estudo sobre o desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans*, trabalho desenvolvido por Lee, Feinbaum e Ambros (2004). Os pesquisadores estavam particularmente interessados em entender o mecanismo pelo qual o gene *lin-4* é capaz de regular o desenvolvimento de todos os estágios larvais e também diferenciação de um grande número de tipos celulares. O trabalho mostra que o gene não codificava uma proteína, mas sua expressão resultava em uma fita simples de RNA, com estrutura de grampo, contando com 61 nucleotídeos (nt); sendo esta a precursora de um pequeno RNA de 22 nt. Ambas as fitas possuíam uma região cuja sequência apresentava

complementaridade a um elemento repetitivo localizado na região 3' não traduzida (3'UTR) do gene *lin-14*. Sendo assim, foi proposto que a interação antisense RNA-RNA seria o mecanismo pelo qual o gene *lin-4* inibia a expressão do gene *lin-14* (50,51). Concomitantemente, Wightman e colaboradores demonstraram que o mecanismo de pareamento entre *lin-4/lin-14* resultou na redução dos níveis proteicos de LIN-14. Isto posto, estavam lançadas as bases para a compreensão de um novo nível de regulação da expressão gênica, baseado na interação entre RNAs (52,53).

Após sete anos desta descoberta, o que até então poderia ser um mecanismo singular em nematódeos, mostrou-se universal. Ainda em *C. elegans*, foi descoberto um outro gene (*let-7*) que também produzia um pequeno RNA de 21 nt capaz de controlar até 5 diferentes genes (54). Posteriormente, foram revelados genes homólogos ao *let-7* em diferentes organismos, incluindo plantas, alguns invertebrados até os seres humanos. Ou seja, evidências que esta nova classe de RNAs tem tanto a sua estrutura quanto a sua função bastante conservadas ao longo da evolução (55).

Estima-se que os miRNAs sejam os reguladores de expressão gênica mais abundantes em mamíferos, estando envolvido em diferentes processos celulares. Até o momento, 2588 miRNAs maduros já foram identificados (miRBase, *release* 21). Acredita-se que um único tipo de miRNA pode ter um grande número de alvos, na ordem de centenas ou milhares, estimando-se que entre 30-92% do genoma humano seja passível de regulação por miRNAs (56).

A respeito da organização genômica (figura 5), os genes de miRNAs podem estar espalhados em diferentes regiões. Alguns genes encontram-se isolados no genoma, em regiões ditas intergênicas, indicando que estes possuem uma unidade de transcrição independente. Entretanto, os miRNAs também podem ser encontrados em regiões exônicas e/ou intrônicas, a depender do *splicing* alternativo ou mesmo em pseudogenes. Quando localizados em íntrons, com frequência, os genes de miRNAs estão na mesma orientação do gene que o hospeda, utilizando-se de seus elementos regulatórios e sugerindo coordenação de produção de miRNAs e proteínas. Os miRNAs também podem estar organizados em *clusters*, implicando em transcritos multicistronicos quando controlados pelo mesmo promotor, ou podem ser transcritos individualmente quando regulados por promotores diferentes (56,57).

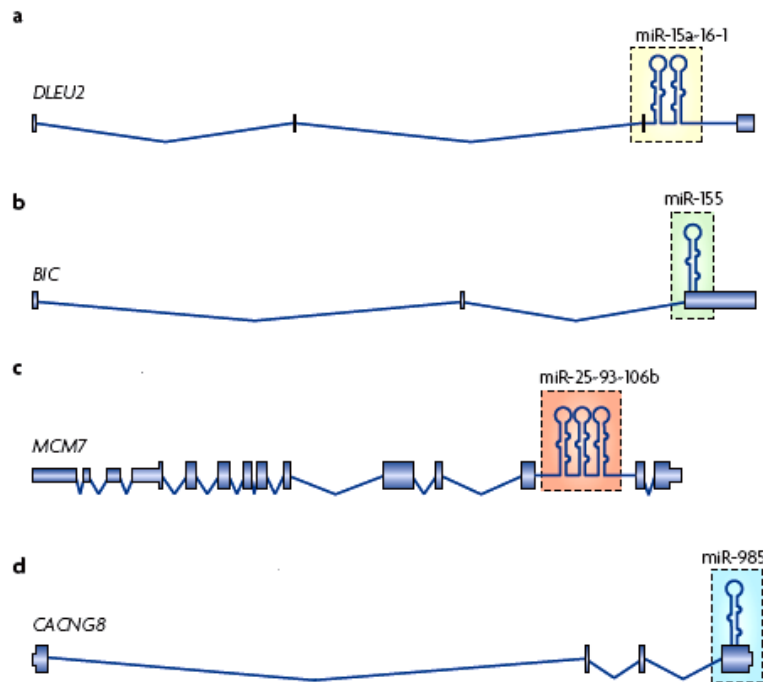


Figura 5: Localização genômica dos miRNAs. A – Localização no íntron de um transcrito não codificante; B – Localização no éxon de um transcrito não codificante. C – Localização no íntron de um transcrito codificante; D – Localização em um éxon de um transcrito codificante. Adaptado de Kim *et al.*, 2009.

5.2 Biogênese de miRNAs

Os miRNAs fazem parte da classe de RNAs não-codificantes (ncRNA) que engloba desde transcritos de tamanho longo, e com função pouco conhecida, até os pequenos RNAs. Na família de pequenos RNAs há três principais grupos descritos: os miRNAs, os piRNAs (*piwi-interacting RNAs*) e os pequenos RNAs de interferência (siRNA); que embora atuem de forma similar na regulação da expressão gênica, apresentam diferentes mecanismos de biogênese e origem, mas podendo compartilhar algumas vias (tabela 2). De forma resumida, os miRNA e os siRNAs são gerados pelas nucleases Droscha e Dicer, a partir de RNAs precursores de dupla fita, enquanto que os piRNAs são produzidos a partir de longos RNAs de fita simples, e seu completo mecanismo de biogênese ainda é mal compreendido (58).

Tabela 2: Pequenos RNAs que atuam na regulação gênica.

TIPO	ORGANISMO	TAMANHO	ENZIMAS	ORIGEM	FUNÇÃO
<i>miRNA</i>	algas, plantas, animais, protistas e vírus	20-25	Drosha (animais) e Dicer	miRNAs primários	Regula a estabilidade e a tradução de RNAm
<i>siRNA</i>	plantas ^a , animais ^b , fungos ^b e protistas ^b	^a 21 e 24 ^b ~21	Dicer*	viral ou outro RNAdf exógeno	Defesa anti-viral, regulação pós-transcricional
<i>piRNA</i>	metazoários**	24-30	Dicer-independente	transcritos primários longos (?)	Regulação de transposons

* Exceto em siRNAs secundários em *C. elegans*. Por serem produtos de RNA polimerase RNA-dependente não são considerados, tecnicamente, siRNAs.

** Exceto *Trichoplax adhaerens*.

Adaptado de GHILDIYAL; ZAMORE, 2009 (58)

O atual modelo proposto para a biogênese e maturação dos miRNAs envolve uma sequência de eventos com a participação de enzimas nucleares e citoplasmáticas. Duas vias foram descritas: a via canônica e a não-canônica. Na via canônica, a maioria dos miRNAs é transcrita a partir da atividade da RNA polimerase II (RNA pol-II) resultando em uma fita primária (pri-miRNA) (59). À exceção, foi identificado um *cluster* de miRNAs no cromossomo 19, intercalado com elementos repetitivos Alu, que é transcrito apenas pela RNA pol-III (60). As fitas pri-miRNA são longas e sofrem dobras sobre si mesma, formando uma estrutura de grampo, ou grampos múltiplos (figura 6A). Ainda no espaço intranuclear, a fita pri-miRNA é clivada por um complexo enzimático microprocessador, formado por uma subunidade catalítica (Drosha, uma RNase-III) e por uma subunidade de reconhecimento e seleção do sítio de clivagem, DGCR8 (do inglês, *DiGeorge syndrome Critical Region gene 8*), também podendo ser chamada de Pasha (“*Partner of Drosha*”) (61). A clivagem da fita pri-miRNA tem seu início pelo reconhecimento da junção RNA simples fita (RNAsf)-RNA dupla-fita (RNAdf), localizada próxima a região basal do grampo, pela DGCR8. Este reconhecimento funciona tanto para a ancoragem do complexo microprocessador quanto para medir a distância da junção RNAsf-RNAdf (62). Assim, a Drosha é fisicamente aproximada à região de clivagem, liberando a região da haste inferior do grampo que contém aproximadamente 11 nt. Esta primeira etapa gera a fita precursora dos miRNAs (pre-miRNA) (figura 6B), cuja estabilidade e transporte para o citoplasma depende do complexo do poro nuclear exportina-5 (63).

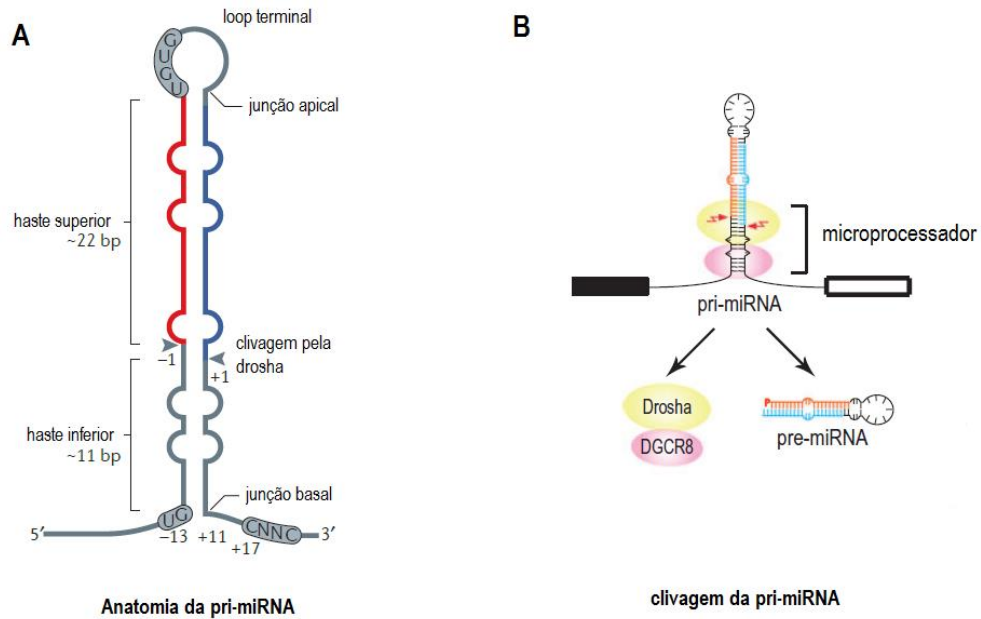


Figura 6: A fita pri-miRNA e sua clivagem pelo complexo microprocessador. (A) O esquema detalha a anatomia da fita pri-miRNA destacando a região de reconhecimento pela Drosha. Destaque para a localização da sequência do miRNA maduro (em vermelho) e da fita passageira (em azul). (B) Degradação do pri-miRNA gerando a fita pre-miRNA. Adaptado de (A) Ha & Kim, 2014 e (B) Liu, Fortin & Mourelatos, 2008.

Alternativamente, foi descrita uma subclasse de pre-miRNA provenientes de regiões intrônicas (mirtrons), cuja biogênese é independente da atividade do complexo microprocessador. Esta via, dita não-canônica (figura 7), depende basicamente da maquinaria de *splicing*, podendo ter sua origem em transcritos de RNAm ou até mesmo em outros RNAs não-codificantes, como RNAt e RNAsno (64).

Na fase citoplasmática de biogênese, a fita pre-miRNA sofre clivagem por outra RNase-III, a Dicer. Esta enzima também é capaz de converter moléculas longas de RNAdf em *duplex* de pequenos RNAs, gerando os siRNAs. Em mamíferos, a Dicer possui domínios específicos que interagem com 2 nucleotídeos na extremidade 3', permitindo que 2 regiões catalíticas sofram dimerização formando um centro único de processamento que cliva a haste da fita pre-miRNA, liberando um *duplex* de miRNA (~22 nt), que também pode ser chamado de miRNA:miRNA*. A fita miRNA* denota a fita de RNA passageira, normalmente degradada

ao final do processo, enquanto que a fita miRNA denota o miRNA maduro que será associado ao complexo de silenciamento (figura 7).

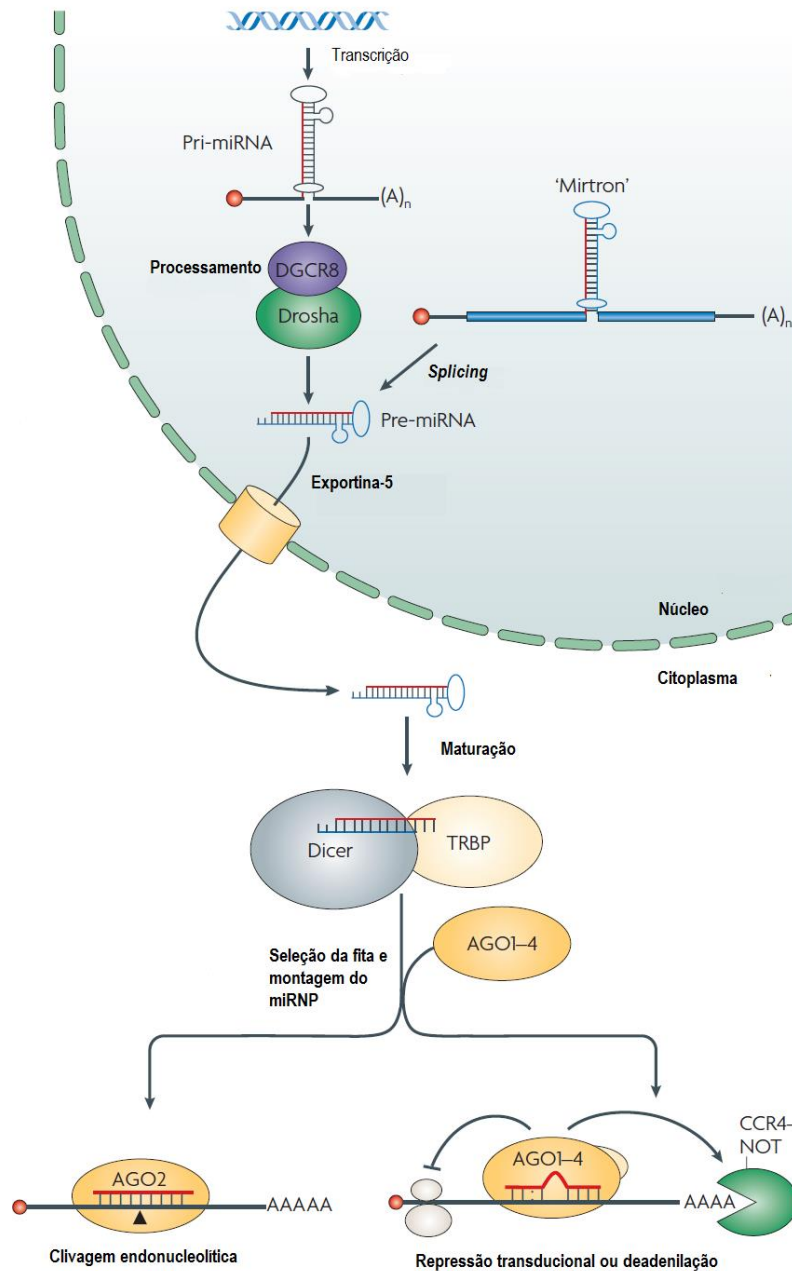


Figura 7: A biogênese dos miRNAs: vias canônica e não-canônica. Os pre-miRNAs podem ser originados pela clivagem da fita pri-miRNA pelo complexo enzimático microprocessador (via canônica) ou através do *splicing* (via não-canônica). No citoplasma o pre-miRNA sofre clivagem gerando um pequeno RNA de dupla fita. A associação de proteínas da família argonauta a apenas uma das fitas deste RNAs forma o complexo ribonucleoproteico de silenciamento (miRNP) que atuará na regulação da expressão gênica. Adaptado de Filipowicz *et al.*, 2008.

Em seguida à degradação do pre-miRNA, ocorre o processo de carregamento ou montagem. Este processo depende de uma família de proteínas denominada Argonata que é subdividida entre Ago e Piwi. As proteínas do tipo Ago se ligam aos miRNAs, e as proteínas do tipo Piwi se ligam aos piRNAs. Em humanos, as diferentes isoformas de Ago (Ago 1-4) podem, de forma indistinta, associar-se ao *duplex* de siRNA ou miRNA. Cada *locus* gera duas fitas, uma a partir da extremidade 5' e a outra da extremidade 3'. Com frequência, a fita guia/madura (ou -5p, i.e., aquela originada da extremidade 5') é a mais ativa biologicamente do que a fita passageira (-3p ou miRNA*), sendo preferencialmente carregada no complexo miRNP. A escolha dentre qual das duas fitas do *duplex* que será preferencialmente carregada pela Ago, é determinada pela estabilidade termodinâmica da região 5' de cada fita. A fita com menor estabilidade na extremidade 5' é carregada preferencialmente, formando a fita madura do miRNA e compondo o complexo ribonucleoproteico de silenciamento (miRNP) ou miRSC (do inglês, *miRNA-induced silencing complexes*) (64–66).

Com respeito a nomenclatura, para distinção entre genes de miRNAs duplicados (ou que apresentam mais cópias) localizados em diferentes *loci*, adiciona-se uma letra após a numeração (i.e., miR-146a e miR-146b). Se existirem múltiplos *loci* em um mesmo cromossomo, adiciona-se um sufixo numérico após o nome (i.e., miR-125b-1 e miR-125b-2). Além disso, pode-se referenciar a espécie em questão adicionando-se um prefixo que o identifique, por exemplo hsa-miR-146a refere-se à espécie *Homo sapiens* e o difere da origem do mmu-miR-146a, proveniente de *Mus musculus* (67,68).

5.3 Mecanismo de ação e predição de alvos

Os miRNAs interagem com seus RNAm-alvos através do pareamento com pequenas sequências chamadas de “elementos de reconhecimento de miRNAs” (do inglês, MRE), que se localizam na região 3'UTR do RNAm. A maioria dos miRNAs – de origem animal – possui um pareamento imperfeito com o RNAm. Entretanto, sabe-se que as regiões de semente dos miRNAs (2-8 nucleotídeos, a contar da extremidade 5') são cruciais para a regulação da expressão do RNAm, permitindo uma complementaridade perfeita ou quase perfeita (69). O pareamento da extremidade 3' do miRNA pode ter papel secundário na repressão, entretanto, se o pareamento for forte, ele pode acabar compensando o pareamento fraco de uma região de semente (figura 8) (70,71). Múltiplos MRE para o mesmo miRNA ou

para miRNAs diferentes podem ser encontrados na região 3' UTR. MicroRNAs distintos, porém cujas regiões de semente são idênticas – 2-8 nucleotídeos (8-mer) – são considerados como membros de uma mesma família de miRNAs, compartilhando a mesma origem evolutiva. Presumivelmente, miRNAs da mesma família possuem alvos redundantes. Contudo, miRNAs que diferem por apenas um nucleotídeo na região de semente frequentemente apresentam um grupo de RNAm-alvos diverso (65).

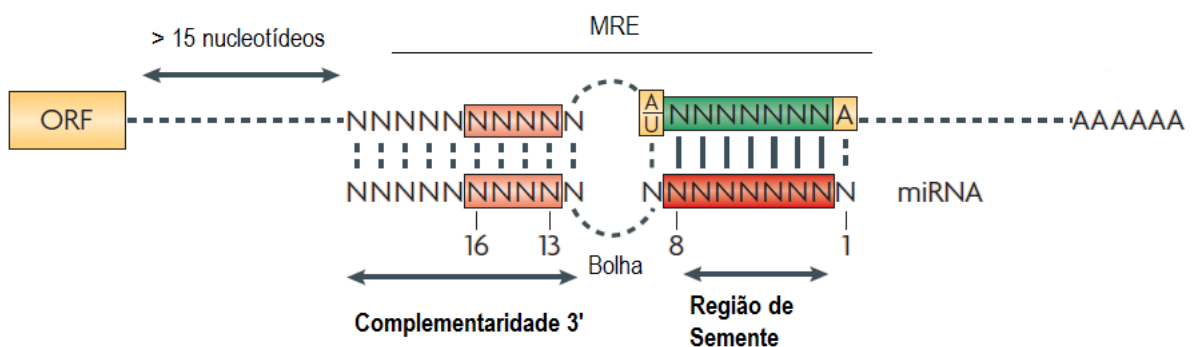


Figura 8: Interação entre miRNA e RNAm-alvo. O esquema detalha a região 3'UTR de um RNAm hipotético, evidenciando o elemento de reconhecimento de miRNAs (MRE) que é complementar à região de semente de um miRNA. No detalhe, destaca-se a importância do 2º ao 8º nucleotídeo (8-mer). Adaptado de Filipowicz *et al.*, 2014.

Considerando as principais características de reconhecimento entre miRNA-RNAm anteriormente descritas, diferentes algoritmos foram construídos no intuito de prever RNAm-alvos putativos dos diferentes miRNAs. Os principais critérios adotados são: (A) complementaridade na região de semente; (B) a termodinâmica de interação entre miRNA-RNAm; (C) a conservação da região 3'UTR entre as diferentes espécies (72).

O resultado da interação miRNA-RNAm pode levar a repressão da tradução, ou à clivagem do RNAm, uma decisão que depende do nível de complementaridade entre as duas fitas. Os mecanismos moleculares no controle da expressão gênica pelos miRNAs são ainda pouco compreendidos. Em linhas gerais, a hipótese mais aceita explica que o complexo formado por miRNP e o RNAm-alvo se acumulam em *P-bodies* (do inglês *processing bodies*), grânulos

citoplasmáticos compostos por RNA e proteínas envolvidas em sua degradação ou estoque. Neste nicho, os RNAm-alvos podem vir a sofrer clivagem ou repressão da tradução, seja pela perda gradual da cauda poli-A (deadenilação) ou pelo bloqueio das diferentes etapas que compõem a tradução. Eventualmente, sob influência do estímulo apropriado, os RNAm não clivados e armazenados nos *P-bodies* podem retornar ao processo de tradução através de um mecanismo desconhecido (66,73). Por esse motivo, nem sempre é possível correlacionar de forma direta a expressão de um miRNA com a redução da detecção do seu RNAm-alvo, neste caso, a avaliação dos níveis proteicos pode ser mais informativa. Assim, acredita-se que os *P-bodies* sejam um local para *turnover* de RNAm ou armazenagem de RNAm selecionados pelo complexo de silenciamento miRNP. Vale ressaltar que, muito do que se sabe atualmente foi descrito em *Drosophila melanogaster*, portanto, este é um campo que ainda merece mais estudos no que diz respeito ao controle da expressão em humanos (66,74).

Além desta visão “clássica” sobre o mecanismo de funcionamento dos miRNAs, trabalhos recentes sugerem que os miRNAs também podem atuar na região 5’ UTR dos RNAm ou até mesmo terem papel importante na promoção da expressão gênica, atuando em regiões promotoras do genoma (75,76). Também existem evidências de que a complementaridade entre a região de semente e a região 3’ UTR pode ser secundária. De fato, foi demonstrado que algumas regiões centrais de miRNAs (4-15 nt) – que não apresentam complementaridade nem na semente nem na 3’compensatória – podem atuar na regulação de regiões 3’UTR. A partir deste estudo, foi proposta uma nova forma de estudo da interação miRNA-RNAm (77). Além disso, alguns estudos apontam para uma possível interação funcional entre miRNAs e receptores *toll-like*, tendo como exemplos os miR-21/29a e let-7b, que funcionariam como ligantes de TLR-8 e TLR-7. Estes receptores se encontram localizados em compartimentos endossomais e são detectores de ácidos nucleicos exógenos, incluindo RNAs de fita dupla ou simples (78,79). Estes achados são extremamente interessantes e indicam um novo campo de estudo sobre miRNAs ainda por ser explorado.

5.4 Polimorfismos de base única (SNPs) em microRNAs

Os polimorfismos de base única são variantes do genoma que podem explicar a variabilidade genética interindividual de 0,1% observada em seres humanos. Até o momento, já foram descritos mais de 10 milhões de SNPs com ocorrência média a cada 100–300 pares de base

(80). A presença de SNPs em genes envolvidos no contexto da biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs pode ter um impacto importante na sua função e, em última análise, afetar os processos biológicos por eles regulados. Foi proposto que os SNPs e/ou mutações que influenciam a função dos miRNAs podem ser classificados em: (A) SNPs que alteram os sítios de interação entre miRNA-RNAm; (B) SNPs que afetam a biogênese dos miRNAs; e (C) SNPs ou mutações que alteram a regulação epigenética dos genes de miRNAs (81). A seguir, serão apresentados brevemente os principais impactos da presença de SNPs mencionados em 1 e 2, mais relevantes para o presente trabalho.

Considerando a natureza do reconhecimento entre os miRNAs e seus RNAm-alvos, a presença de SNPs localizados no MRE ou em regiões críticas do miRNA, como a semente, pode levar a perda ou ganho de função, ao criar ou destruir um sítio de interação entre miRNA-RNAm. Um estudo genômico indicou que a presença destes polimorfismos na região 3' UTR estão presentes em uma densidade de 3,984 SNPs/kb e sofrem pressão seletiva (82). Em 2005 foi descrito o primeiro trabalho que relaciona um polimorfismo na 3' UTR com a perda de regulação por miRNAs. Os autores demonstraram que o SNP presente no gene *SLITRK1* está relacionado com a síndrome de Tourette e disfunção do sítio de reconhecimento pelo miR-189 (83). A partir deste estudo, outros relatos da literatura têm reforçado a importância do estudo de SNPs em regiões de interação entre miRNA-RNAm, especialmente em estudos relativos ao câncer (84) e na farmacogenômica (85).

SNPs localizados nos genes de miRNAs podem levar a alterações no seu processo de síntese e maturação. Tomando como base o processo de biogênese dos miRNA, cada uma das etapas de reconhecimento pelas enzimas Drosha/Pasha e Dicer podem sofrer influência pela presença de SNPs, impactando a síntese do miRNA maduro (86). Neste sentido, muitos estudos têm associado a presença de SNPs na fita pri-miRNA e/ou pre-miRNA com susceptibilidade em alguns tipos de câncer. De modo geral, estes são polimorfismos funcionais, resultando na alteração dos níveis do miRNA. Dos genes estudados, destacam-se: miR-196a-2, miR-146a e miR-499 (84).

Curiosamente, a presença de polimorfismos na região 3' UTR dos RNAm-alvos são mais frequentes do que ao longo da sequência do miRNA maduro. Considerando a fita pre-miRNA, apenas 10% apresenta algum tipo de SNP registrado, onde a maioria se encontra localizada fora da região de semente (87). Em conjunto, estes dados reforçam e corroboram a relação entre genótipo-fenótipo com a presença de SNPs relacionados a via de biogênese/ação dos miRNAs. Além disso, oferecem a possibilidade de estudar a associação entre variantes genéticas que interferem na expressão dos genes (eQTL, do inglês *expression of quantitative trait loci*) e doenças complexas, como por exemplo a hanseníase.

Estudos relativos de associação genética entre de SNPs nos genes de miRNA (miRSNPs) são pouco frequentes no campo das doenças infecciosas. A maioria dos relatos descreve associações entre estas variantes genéticas e o câncer. O polimorfismo do gene miR-146a (rs2910164 G>C) já foi associado de forma genética, através do desenho de caso-controle, e funcional com alguns tipos de câncer, tais como glioma (88), carcinoma de tireoide (89) e carcinoma de fígado (90). Entretanto, é possível encontrar alguns estudos relativos à associação com a tuberculose. Destacam-se os polimorfismos dos genes miR-146a e miR-499 e a associação a tuberculose pulmonar (91).

5.5 MicroRNAs e infecções micobacterianas

Muito do que se sabe sobre o papel dos miRNAs no controle de processos celulares resulta de estudos sobre desenvolvimento. Contudo, os miRNAs são também apontados como novos reguladores da resposta imune (92). Por exemplo, a ativação de TLR leva à indução da expressão de diferentes miRNAs, dentre eles o miR-146a/b, miR-21 e miR-155. Os TLR são receptores primários no reconhecimento de micobactérias por macrófagos, sendo a sua ativação necessária para sinalizar a síntese de diferentes citocinas pró-inflamatórias, via NF- κ B. Sendo assim, pode-se supor que a ativação de macrófagos, incluindo outros tipos celulares, por diferentes patógenos também leva a modulação da expressão de miRNAs. E de fato, tem-se uma boa correlação entre os fenômenos citados. Além disso, tanto IFN- α quanto IFN- β estão associados a modulação de diferentes miRNAs, tais como miR-21 (93) e miR-155 (94).

Recentemente, apenas três estudos descreveram a participação dos microRNAs (miRNAs) no âmbito da hanseníase. O primeiro sugere que a hiporesponsividade de linfócitos T durante a progressão da hanseníase deve-se, em parte, à superexpressão de uma fosfatase (SHP-2) que está associada a baixos níveis do miR-181a (95). O segundo estudo compara a expressão gênica, por microarranjo, de biópsias de pele de pacientes do polo lepromatoso e tuberculóide. Este estudo identificou 13 genes de miRNAs que são diferencialmente expressos. Dentre eles, o miR-21 teve o maior nível de expressão em biópsias do polo lepromatoso, sendo apontado como um regulador da via antimicrobicida dependente de vitamina D. Além disso, a expressão deste miRNA foi induzida pelo *M. leprae* via ativação de TLR1/2 (96). Um outro miRNA de grande interesse para a polarização da resposta imune hanseníase é o miR-155. Foi demonstrado que o miR-155 é expresso apenas em linfócitos CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ de pacientes BL/LL quando comparados a pacientes BT/TT. Os dados sugerem que o miR-155 confere maior adaptabilidade competitiva a linfócitos Treg do polo lepromatoso, sendo capaz de prevenir a apoptose destas células através da regulação de SOCS1 e IL-2 (97). Claramente existe uma lacuna muito grande a ser preenchida na pesquisa de miRNAs e hanseníase. Um maior número de estudos pode ser encontrado na literatura quando nos referimos a outros tipos de infecções micobacterianas, especialmente em tuberculose, o que oferece um melhor panorama do tema.

Assim como na hanseníase, a tuberculose apresenta uma lacuna entre a doença latente e sua forma ativa, influenciada por fatores genéticos do hospedeiro (98). Portanto, tem-se no estudo da tuberculose um bom modelo comparativo que pode fornecer pistas sobre os mecanismos no controle de infecções micobacterianas pelo hospedeiro. Evidências do envolvimento dos miRNAs na infecção pelo *M.tb* foram obtidas tanto de estudos *in vitro* quanto em amostras clínicas, tais como soro, escarro e sangue periférico de voluntários. Macrófagos infectados com *M.tb* apresentam alterações na expressão de diferentes miRNAs, dentre eles o miR-125b e miR-155. O aumento da expressão do miR-125b foi correlacionado com a redução dos níveis de TNF, através na interação direta com a região 3' UTR (99). Este mesmo resultado foi alcançado através da estimulação de macrófagos com um componente da parede celular de natureza glicolipídica, a lipomanana, que interagem com TLR-2. Um estudo de média escala da expressão de miRNAs por macrófagos murinos infectados com *M.tb* identificou, pelo menos, três genes primordiais: o miR-155, miR-146a e o miR-21 (100). Estes três miRNAs

têm sido apontados como importantes reguladores das respostas imune e inflamatória, pois são ativados mediante estímulo de TLRs, sendo considerados o trio de miRNAs cuja expressão e atuação pode ocorrer de forma concomitante (101). Na tuberculose, sugere-se que o miR-155 tenha sua expressão dependente do fator de virulência ESAT-6. Como resultado, o aumento dos níveis deste miRNA se correlaciona com o favorecimento da sobrevivência do bacilo mediante aumento da expressão da enzima heme-oxigenase 1 e repressão da expressão da ciclooxigenase-2 e IL-6 (100). A literatura ainda contém estudos conflitantes no que diz respeito ao papel deste miRNA. Por exemplo, macrófagos humanos expostos ao *M.tb* apresentam redução da expressão do miR-155, que é concomitante com a redução de TNF; um mecanismo dependente da via de ativação TLR/MAPK/Akt (99).

Estudos *in vivo* também tem se mostrado ferramentas valiosas na elucidação do papel dos miRNAs durante infecções micobacterianas. Camundongos infectados com *M.tb* apresentaram aumento da expressão do miR-223 no sangue e no tecido pulmonar. Resultado corroborado em amostras clínicas de pacientes com tuberculose ativa. Além disso, animais com deleção neste gene foram mais susceptíveis à infecção, desenvolvendo um quadro agudo de inflamação pulmonar. O fenômeno observado foi explicado pelo aumento do influxo de neutrófilos no pulmão, devido a uma produção exacerbada das quimiocinas CXCL2 e CCL3 – alvos diretos do miR-223 (102). O miR-155 também está relacionado a maior susceptibilidade à tuberculose, camundongos inoculados intravenosamente com o bacilo mostraram um aumento da expressão do miR-155. A comparação entre linhagens selvagens e nocaute mostrou que a ausência do miR-155 resultou em um taxa de sobrevivência 2 vezes menor (103).

Uma revisão da literatura sobre a modulação de miRNAs por micobactérias, patogênicas ou não, oferece um melhor entendimento dos mecanismos de virulência e destaca o envolvimento de outros miRNAs, tais como miR-29a, miR-147, miR-144* e miR-99b (104,105). Os principais achados estão resumidos na tabela a seguir (tabela 3).

Tabela 3: Resumo dos miRNAs envolvidos em infecções micobacterianas.

miRNA	TIPO CELULAR	NÍVEL DE EXPRESSÃO	MICOBACTÉRIA	ALVOS	ATUAÇÃO
hsa-miR-21	Biopsias de pele Macrófagos e monócitos	Induzido	<i>M. leprae</i>	IL1B, CYP2B1	Inibição da via microbicida
hsa-miR-125b	Macrófagos	Induzido	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. smegmatis</i>	TNF- α	Possível subversão da imunidade do hospedeiro
hsa-miR-155 mmu-miR-155	Macrófagos	Induzido	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. smegmatis</i>	SHIP1	Resultados contraditórios quanto aos níveis de TNF- α
hsa-miR-99b mmu-miR-99b	Células dendríticas	Induzido	<i>M. tuberculosis</i>	TNF- α	Aumento da carga bacteriana
mmu-miR-146a	Células dendríticas	Induzido	BCG <i>M. tuberculosis</i>	IRAK-1, TRAF6	Supressão de IL-6, IL-1 β e TNF- α
hsa-miR-29a	Macrófagos	Reprimido	<i>M. avium</i>	Caspase 3	antiapoptose
hsa-let-7e	Macrófagos	Induzido	<i>M. avium</i>	Caspase 7	antiapoptose

Adaptado de Mehta e Liu, 2014.

5.6 MicroRNAs como biomarcadores

Um número significativo de miRNA já foi observado no espaço extracelular, alguns estudos suportam a existência de um sistema de controle específico na exportação e importação de miRNAs. Acredita-se que os pre-miRNAs possam ser transportados no interior de membranas derivadas de vesículas (exossomos e micropartículas), através de lipoproteínas e complexos ribonucleoproteicos. Quando exportados, estes miRNAs encontram-se disponíveis para serem absorvidos por outros tipos celulares, provocando mudanças importantes no seu fenótipo (106,107). Os miRNAs extracelulares atuam de forma similar na regulação da expressão gênica, ao serem captados pelas células-alvo, e processados pela maquinaria citoplasmática de biogênese. Embora mais estudos sejam necessários para se entender este mecanismo, evidências sugerem que o repertório de miRNAs transportados possa ser bastante diverso dos miRNAs remanescentes da célula que o originou, suportando a hipótese de que as células secretam miRNAs específicos e de forma seletiva (108–110). Alguns autores propõem, inclusive, o papel de “hormônios moleculares” para estes miRNAs (111).

Valendo-se desta característica, diferentes estudos descrevem os miRNAs extracelulares como importantes biomarcadores de algumas doenças, notadamente o câncer (112,113). Estudos sugerem que os miRNAs tem grande potencial de serem utilizados como biomarcadores. Acredita-se que os miRNAs apresentam (1) *especificidade* quanto a doença/condição patológica de um determinado tecido ou órgão; (2) *sensibilidade*, já que é possível que o estágio inicial e a progressão de determinada condição patológica sejam acompanhados pela mudança nos níveis de expressão de miRNAs; (3) *robustez*, já que sua detecção pode ser feita de forma acurada; (4) *translacionalidade*, já que podem permitir a correlação entre ensaios clínicos e pré-clínicos; e, por fim (5) são candidatos *não invasivos*, pois estão presentes em diferentes fluidos corporais (107). Além disso, os miRNAs circulantes estão frequentemente associados a proteínas ou no interior de exossomos, estando protegidos contra a atividade de RNases (114).

A respeito de doenças infecciosas, alguns estudos apontam genes de miRNAs como possíveis biomarcadores da tuberculose, dentre eles, o miR-155 e o miR-155* em PBMCs (115); e o miR-29a, em soro (116). Este tipo de abordagem também permite discriminar entre diferentes

patologias e/ou infecções, por exemplo, os miR-361-5p, miR-889 e miR-576-3p foram capazes de distinguir pacientes com tuberculose ativa em comparação com outras doenças infecciosas e indivíduos saudáveis (117). Esforços no sentido de se achar um candidato a biomarcador de tuberculose ativa vem sendo realizados, utilizando-se diferentes amostras clínicas, entretanto, ainda não se encontrou uma assinatura definitiva (118–120). No que diz respeito a hanseníase, nada se sabe sobre o perfil de expressão de miRNAs circulantes em pacientes ou seus contatos intradomiciliares.

6. Justificativa

A infecção pelo *M. leprae* não é suficiente para causar o adoecimento e progressão da doença. Uma grande quantidade de evidências corrobora que, além da influência ambiental, o repertório genético do hospedeiro tem fator decisivo no adoecimento e no desfecho das diferentes manifestações clínicas. Estes dados envolvem a participação de genes relacionados tanto na resposta imune inata quanto adaptativa e chamam atenção para o controle diferencial destes genes. Assim, a montagem mais eficiente da resposta imune humoral em detrimento da resposta imune celular leva ao desenvolvimento de formas mais graves da doença. Concomitantemente, o *M. leprae* é capaz de burlar a resposta imune primária à infecção, através do seu modo de vida intracelular, adaptado a escapar e subverter a resposta imune inata. É notório que a melhor compreensão de como os fatores genéticos do hospedeiro interagem e se autorregulam pode lançar nova luz nesta complexa interação parasita-hospedeiro.

O papel regulatório dos miRNAs, sua participação na infecção pelo *M. leprae* e ao longo do curso da doença e de seus desfechos ainda é um campo a ser explorado. Neste contexto, o estudo da expressão gênica dos miRNAs, bem como as variações nas sequências de seus respectivos genes, podem lançar novas perspectivas na compreensão da complexa imunorregulação da hanseníase apontando novas abordagens para o diagnóstico e o tratamento da doença. Portanto, para este estudo, inicialmente adotamos uma estratégia genética-epidemiológica, selecionando genes candidatos (miR-223, miR-125a, miR-196a-2 e miR-146a) para a análise de associação de polimorfismos de base única (SNPs) à hanseníase e seus desfechos. Posteriormente, realizamos análise funcional dos SNPs dos genes de miRNAs (miRSNP) que se mostraram associados à hanseníase. Além disso, nossa proposta também incluiu a busca por miRNAs candidatos em sangue total, utilizando um painel de 93 alvos, que pudessem ajudar na discriminação entre indivíduos saudáveis (contatos intradomiciliares) e doentes.

7. Objetivos

7.1 Objetivo geral

Estudar o papel de miRNAs candidatos na imunopatogênese da hanseníase, através de abordagens genéticas e/ou funcionais e a seleção de miRNAs candidatos a uma assinatura molecular da hanseníase.

7.2 Objetivos Específicos

7.2.1 Estudo genético

- a) Investigar a associação genética entre SNPs de miRNAs candidatos à hanseníase *per se*, bem como com suas formas clínicas;
- b) Estudar o papel funcional das variantes genéticas associadas à hanseníase em biópsias de pele e nervo e cultura de linhagem de macrófagos humanos.

7.2.2 Estudo funcional do miR-146a

- a) Analisar o papel do miR-146a na resposta de macrófagos murinos frente à infecção pelo *M. leprae*;
- b) Verificar a influência do miR-146a na viabilidade molecular do *M. leprae*.

7.2.3 Assinatura molecular de miRNAs

- a) Explorar o papel de miRNAs como biomarcadores de infecção recente e/ou adoecimento;
- b) Correlacionar o perfil de expressão gênica miRNAs e seus RNAm-alvos, identificando vias regulatórias envolvidas no curso da infecção pelo *M. leprae*.

8. Apresentação aos métodos e resultados

Dada a natureza da apresentação da tese, isto é, sua estrutura mista com a anexação de artigo e a apresentação tradicional de métodos e resultados, este tópico tem por objetivo oferecer uma visão geral da sua organização, a partir deste ponto. A seguir, será apresentada a seção, “Metodologia”. Nela serão apresentados os métodos referentes ao estudo funcional do gene miR-146a (do item 9.1 até 9.13) e ao estudo do perfil de miRNAs no sangue de pacientes e contatos (do item 9.14 em diante). Entretanto, toda a metodologia utilizada para gerar os dados genéticos e seus desdobramentos não serão repetidos no tópico metodologia; estas estarão disponíveis apenas no corpo do artigo – seção 1 do Capítulo II –, bem como os resultados gerados a partir destas análises.

O Capítulo II, intitulado “Resultados: estudo genético e funcional de microRNAs candidatos na Hanseníase”, está dividido em três partes e é dedicado ao estudo genético de miRNAs candidatos e posterior validação funcional. Como supracitado, a primeira parte está o artigo e seus anexos. Posteriormente, a segunda parte contempla a apresentação de dados do estudo genético do miR-146a que foram gerados após a publicação do artigo. Por fim, a terceira parte deste capítulo contém os dados funcionais do miR-146a que foram obtidos com o uso de células de camundongos nocaute.

O Capítulo III, intitulado “Expressão de microRNAs no sangue de pacientes e contatos: identificação de novas vias regulatórias”, contém os dados referentes ao estudo do perfil de miRNAs no sangue.

O Capítulo IV, intitulado “Discussão e conclusões” contém a discussão dos resultados da tese. O primeiro sub item (1.1) é referente à discussão dos dados apresentados no Capítulo II, ao passo que o segundo sub item (1.2) é referente à discussão dos dados apresentados no Capítulo III.

9. Metodologia

9.1 Linhagens de camundongos

Foram utilizadas fêmeas isogênicas de camundongos da linhagem C57BL/6, selvagens (miR-146a^{+/+}) e mutantes com deleção para o gene miR-146a (miR-146a^{-/-}). A produção dos animais nocaute e sua caracterização foi previamente descrita (121). Os animais utilizados tinham aproximadamente entre 6-10 semanas de vida. Para os experimentos, procurou-se selecionar animais com idades pareadas para evitar um possível viés nos resultados. Toda a experimentação animal foi realizada em condições assépticas e em acordo com os protocolos de procedimentos exigidos pelo *Institutional Animal Care and Use Committee, City of Hope*. Além da experimentação com animais, todas os procedimentos aqui descritos tiveram prévia aprovação pelo comitê de biossegurança e risco biológico do *Beckman Research Institute of the City of Hope* (OSBC Protocol No 12014), conforme anexo (Capítulo IV, item 4.7).

9.2 Obtenção e cultivo de macrófagos murinos derivados de medula óssea

Para a obtenção da medula óssea, os animais foram previamente sacrificados com dióxido de carbono. Os mesmos foram fixados em cortiça com auxílio de alfinetes e seu corpo esterilizado com álcool 70%. Com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgica (estéreis) foi realizada uma incisão na região do abdômen, a fim de permitir a abertura e descolamento da pele. Posteriormente os músculos das patas traseiras foram removidos e os fêmures e tíbias foram coletados e acondicionados em microtubos contendo 1 mL de meio DMEM completo contendo 10% de soro fetal bovino inativado, 100 U/mL de estreptomicina (Corning) e 100 U/mL de penicilina (Corning), e suplementado com 2 mM glutamina (Corning). Após a coleta, os ossos foram higienizados com etanol 70%. As extremidades dos ossos foram removidas com tesoura para exposição da medula. Uma agulha de 27 G ½ foi inserida no interior dos ossos – tíbia e fêmur – e a medula foi lavada com meio DMEM completo e coletada em tubos Falcon de 50 mL. Em seguida as células foram centrifugadas a 300 g por 5 min a 4 °C; o meio foi removido e foi adicionado 1 mL do tampão de lise de hemácias (1X) (Biolegend) seguido de incubação por 5 minutos no gelo. Após o período de lise, foram

adicionados 40 mL de PBS 1X (Corning) e as células foram novamente centrifugadas, conforme descrito acima. Assim, após centrifugação o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 10 mL de meio DMEM completo. A suspensão de células foi passada por um coador de 40 µM, após o que o número de células foi determinado por contagem no hemocitômetro.

O cultivo das células foi realizado com meio de cultura DMEM completo e mantidas em estufa umidificada, com 5% de CO₂ a 37 °C. As células da medula óssea foram plaqueadas em placa de petri com 10 cm de diâmetro, numa densidade aproximada de 2 x 10⁶/mL. A diferenciação das células de medula em macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) se deu na presença de 50 ng/mL do fator estimulador de colônias de macrófagos recombinante (M-CSFr) (R&D Systems), por 6 dias, com troca do meio de cultura no 3º dia. A presença do M-CSFr foi mantida ao longo de todos os experimentos realizados. No 6º dia de cultivo, os BMDM foram descolados da placa de Petri com uma solução de PBS 1X e 0.6 mM de EDTA a 37 °C por aproximadamente 5-8 minutos após o que a reação foi inativada com a adição de DMEM completo. As células remanescentes foram descoladas com o auxílio de um rodo de raspagem. Após centrifugação à 300 g por 5 min a 4 °C, os BMDM foram plaqueados (3 x 10⁵ – 4 x 10⁵ células) com meio completo e suplementado, sem antibióticos – para posterior incubação com *M. leprae*.

A diferenciação dos macrófagos foi verificada periodicamente através da marcação dos receptores de superfície CD11b e F4/80, por citometria de fluxo. Ao final do 6º dia de diferenciação foi observada pureza de 75-85% de macrófagos.

9.3 Obtenção do *M. leprae*

O *M. leprae* utilizado foi gentilmente fornecido pelo Dr. Richard Truman, membro do *National Hansen's Disease Programs, Louisiana State University*. O cultivo do bacilo, cepa Thai-53, é rotineiramente realizado no coxim plantar de camundongos atímicos *nude* por aproximadamente 6 meses, após o que é isolado por digestão com colagenase-dispase (1X)

(29,122). Foram enviadas alíquotas estéreis de 10^9 /mL bacilos viáveis e não-viáveis (pelo método de irradiação), refrigerados, que foram utilizadas até 24 h após o seu recebimento.

9.4 Infecções de macrófagos murinos com *M. leprae*

Após 6 dias de diferenciação, os macrófagos foram plaqueados (conforme seção 9.2) e as infecções foram realizadas após o período de 18-24 h, aproximadamente. Foram utilizadas diferentes relações de infecção expressas em bacilos por célula, ou multiplicidade de infecção (MOI), variando de 10–100 bacilos/célula. Após a adição dos bacilos, as células foram incubadas em estufa a 33 °C, temperatura ótima e permissiva para *M. leprae* (123). A infecção foi realizada por diferentes tempos (6, 12, 24, 48 h) e, ao seu término, as células foram lisadas com 700 µL de Qiazol (Qiagen) para extração de ácidos nucleicos (item 9.5). O sobrenadante foi coletado, centrifugado (300 g, 5 min a 4 °C) e armazenado para posterior análise da produção de citocinas (seção 9.8) e nitrito (seção 9.9). Como controle positivo, os macrófagos foram estimulados com LPS (10 ng/mL).

9.5 Extração de ácidos nucleicos

A extração dos ácidos nucleicos foi realizada com 700 µL de Qiazol (Qiagen). Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio com agitação vigorosa; as amostras foram centrifugadas a 4 °C, 12.000 rpm por 15 min. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o material remanescente foi guardado (-80 °C) para posterior extração de DNA. À fase aquosa coletada foi adicionado o mesmo volume de isopropanol. Para melhor precipitação do RNA, as amostras foram armazenadas *overnight* a -80 °C. Após este período, foi adicionado 1 µL de GlycoBlue (Invitrogen), um coprecipitante composto por glicogênio, ligado covalentemente a um corante azul, que ajuda na precipitação e visualização do RNA. Assim, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, 12.000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 1 mL de etanol 80% para lavagem do sedimento de RNA. Nova centrifugação foi realizada a 4 °C, 8.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi removido e, após a secagem do sedimento, o RNA foi ressuspensão em 20 µL de água RNase *free* (RF). Foi utilizado 1 µL de RNA para a

quantificação e análise de pureza dos ácidos nucleicos no instrumento Nano-Fotômetro® (IMPLEN). A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose (1,2%).

A fim de remover a contaminação com DNA genômico, foi realizado o tratamento com DNase (“DNase-free kit, Ambion). Ao RNA obtido foi adicionado 0,1 volume do tampão da enzima e 1 µL da DNase recombinante, seguida de incubação por 37 °C por 20 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 0,1 volume do inibidor de DNase com incubação a temperatura ambiente por 2 minutos, seguida de centrifugação por 1,5 min a 10.000 g. O sobrenadante contendo o RNA foi transferido para novo tubo e requantificado.

O material remanescente da primeira etapa de extração de RNA, interfase e fase orgânica, foi utilizado para extração de DNA. Ao material foram adicionados 100 µL de TE (Tris-HCl 5 mM pH 8,0, EDTA 0,1 mM) e 150 µL de clorofórmio seguido de agitação vigorosa. As amostras então foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e a esta foi adicionado 2 volumes de isopropanol. As amostras foram incubadas *overnight* a -20 °C. Na segunda etapa foi adicionado 1 µL de GlycoBlue e o material foi centrifugado a 12.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol a 70%, seguido de nova centrifugação (12.000 rpm por 15 min a temperatura ambiente). O sobrenadante foi descartado e após a secagem do sedimento o DNA foi ressuspensão em 20 µL de água RF. O DNA obtido foi quantificado no Nano-Fotômetro e posteriormente utilizado para determinação da viabilidade molecular do *M. leprae* (item 9.7).

9.6 Transcrição reversa e PCR quantitativo

Para a análise de expressão dos *miRNAs* foi utilizado o TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). O RNA total (10 ng), não desnaturado, foi reversamente transcrito com 1X de *stem-loop primers*, 1 mM de dNTP, 3 U/µL da enzima MultiScribe® e 0,253 U/µL do inibidor de RNase; diluídos em tampão (1X), para um volume final de 10 µL. A reação ocorreu inicialmente por 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C. O cDNA obtido foi diluído 10X em água RF e a PCR foi realizada com 1X

do Master Mix TaqMan Gene Expression (No UNG) e 1X dos ensaios TaqMan para expressão de miRNAs e 2 µL de cDNA, ajustados para um volume final de 10 µL de reação.

Para RT dos *RNA_m*, foi utilizado o protocolo da enzima M-MLV (Invitrogen). Assim, a etapa inicial de desnaturação foi realizada com 500 ng de RNA total, 200 ng de *random primers* (Fermentas) e 0,5 mM de dNTP (Invitrogen) em um volume final de 11 µL. A incubação foi realizada por 5 min a 65 °C. Às amostras foram acrescentados 2 U/mL do inibidor de Rnase (Applied Biosystems), 0,01 M de DTT (Invitrogen) e 1X do tampão *first-strand* (Invitrogen), totalizando 19 µL de reação. Em seguida, foi realizada uma rápida incubação a 37 °C por 2 min. Após esta etapa, foi adicionado 1 µL da enzima M-MLV e reação foi incubada por 10 min a 25 °C, 50 min a 37 °C e 15 min a 70 °C. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 1X do Master Mix TaqMan Gene Expression e 1X dos ensaios TaqMan para expressão gênica. Para a detecção dos genes de interesse foi utilizado 2 µL do cDNA diluído 1:10; para o gene de referência (Rn18) foi utilizado 2 µL do cDNA diluído 1:100.

As PCRs tanto para miRNA quanto para *RNA_m* foram realizadas de acordo com os seguintes parâmetros: uma etapa de 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 seg e 60 °C por 1 min. Todas as reações de PCR foram realizadas nos termocicladores 7500 ou Viiia-7 (Applied Biosystems).

9.7 Viabilidade molecular do *M. leprae*

A viabilidade intracelular do bacilo foi avaliada pelo método molecular descrito previamente descrito (124). O RNA total foi reversamente transcrito para a síntese da fita de DNA complementar do gene 16S RNA ribossomal (RNAr) conforme RT para *RNA_m* (item 9.6). A partir do DNA total, o fragmento de DNA correspondente ao gene 16S RNAr foi amplificado por PCR em tempo real. Para isso, um sistema de sonda de hidrólise e *primers* específicos foi sintetizado (20X) (IDT technologies) de acordo com as sequências fornecidas: *primer forward* 5'-GCA TGT CTT GTG GTG GAA AGC-3'; *primer reverse* 5'-CAC CCC ACC AAC AAG CTG AT-3' e sonda de hidrólise 5'-CAT CCT GCA CCG CA-3'. Para a detecção do cDNA, as reações foram realizadas com volume final de 10 µL contendo 1X do ensaio de detecção e

2 μ L do cDNA (diluído 1:10). Para a quantificação do DNA, todos os parâmetros anteriores foram mantidos, exceto pela substituição do cDNA por 15 ng de DNA total. A viabilidade molecular foi estimada pela quantificação relativa entre os alvos o cDNA RNAr 16S/DNA 16S RNAr.

9.8 ELISA

A quantificação de TNF- α presentes no sobrenadante de BMDM foi avaliada pelo método de ELISA (do inglês, *enzyme-linked immunosorbant assay*). As placas de 96 poços foram previamente recobertas com anticorpo de captura específico (eBioscience) na concentração de 2 μ g/mL distribuídos em 100 μ L por poço e incubadas *overnight* a 4 °C. Os poços foram lavados 3X com 225 μ L da solução de lavagem (PBS 1X + 0,05% Tween-20). Em seguida, foram adicionados 200 μ L da solução de bloqueio (PBS 1X + BSA 1%) e incubação por 1 h a temperatura ambiente. Após o bloqueio os poços foram lavados 3 vezes. Posteriormente, foram adicionados 100 μ L de quantidades conhecidas de TNF (variando de 1000 pg/mL – 15,6 pg/mL, com fator 2 de diluição), e 100 μ L de sobrenadante não diluído ou diluído (1:2, 1:10, 1:20) e a incubação foi realizada *overnight* a 4 °C. Os poços foram lavados 5 vezes e foi acrescentado 100 μ L de anticorpos de captura conjugados à biotina (diluição 1:500 em solução de bloqueio). Após 3 lavagens, foi realizada incubação com 100 μ L de avidina conjugada à HRP (diluição 1:1000 em solução de bloqueio) seguida de 5 lavagens 5X. Ao final, foram adicionados 100 μ L do reagente TMB (Biolegend), contendo o substrato para a enzima peroxidase. A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de H₂SO₄ (2N) e a absorbância foi medida com o comprimento de onda de 450 nm utilizando o leitor de placas SpectraMax® M3 (Molecular Devices). Os resultados foram analisados no programa SoftMax Pro (Molecular Devices). De posse dos valores de densidade ótica (OD), a quantidade de TNF (pg/mL) foi determinada por interpolação com base na curva padrão sigmoide de quatro parâmetros.

9.9 Detecção de nitrito

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada de forma indireta pela detecção de nitrito, um de seus metabólitos secundários (125). O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços

onde, para cada 150 μL de sobrenadante, foram adicionados 20 μL de Reagente de Griess (Biotium) e 130 μL de água deionizada. A curva padrão foi construída com uma solução de nitrito fornecida pelo kit, utilizando uma faixa linear de concentração que variou de 1,56–100 μM , usando fator 2 de diluição. A reação se desenvolveu por 30 min a temperatura ambiente. Após esta etapa, a absorbância foi medida com o comprimento de onda de 548 nm utilizando o leitor de placas SpectraMax® M3 (Molecular Devices). Os resultados foram analisados no programa SoftMax Pro (Molecular Devices), as medidas de absorbância das amostras e da curva padrão foram relativizadas com a média das amostras de referência (ou branco) que continham 280 μL de água deionizada e 20 μL do reagente de Griess. Os valores de nitrito, em μM , foram estimados através da interpolação do valor de OD das amostras na equação gerada baseada nos dados da curva padrão.

9.10 Obtenção do lisado total de macrófagos

Após a infecção de BMDM com *M. leprae* viável (100:1) durante 6 h, o sobrenadante foi removido, as células lavadas duas vezes com PBS 1X. Em seguida, as células foram descoladas com a ajuda de um *scraper* seguidas de centrifugação a 500 g por 5 min. O sobrenadante foi removido e ao sedimento foi adicionado 30 μL de tampão de lise contendo inibidores de proteases (Roche). A quantificação de proteínas foi realizada através do método de Bradford (Bio-Rad) (126). Foram adicionados 5 μL do lisado celular em 1 mL do reagente de Bradford e a leitura foi realizada a 595 nm no instrumento Nano-Fotômetro® (IMPLEN). A concentração de proteínas foi estabelecida com base em uma curva padrão. As amostras foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento do uso.

9.11 Eletroforese e imunomarcação

Antes da eletroforese, as proteínas foram desnaturadas com a adição do tampão de amostras seguido do processo de fervura por 5 min. Em seguida, 23 μg de proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida a 12%, com amperagem de 25 mA por 2 h a 100 V. Após esta etapa, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose à 400 mA, por aproximadamente 2 h. A membrana foi corada com Ponceau Rouge (0,1% de Ponceau (p/v) e 5% de ácido acético (v/v)) a fim de verificar a qualidade da transferência. Após o que a

membrana foi lavada com solução de lavagem PBS 1X + Tween-20 0,05%, seguida de bloqueio da membrana com 5% de leite desnatado diluído em tampão de lavagem durante 1 h. Assim, para a detecção da proteína de interesse, a membrana foi incubada com anticorpo policlonal LC3b (Cell Signaling) na diluição de 1:1000 por 1 h. Após 3 lavagens de 5 min, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugados a peroxidase (Cell Signaling) na diluição de 1:30.000. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes, foi adicionado o reagente de revelação quimioluminescente ECL (ThermoFisher) seguido de sua exposição a um filme fotográfico em sala escura. Após a revelação, a marcação com os anticorpos foi removida com a incubação da membrana em solução de *strip* (marca) por 1 h e a membrana foi novamente bloqueada e marcada para a proteína β -actina (1:40.000) conjugada à peroxidase por 1 h, e a revelação realizada conforme descrito anteriormente. As bandas foram quantificadas no *software* Image J e o resultado expresso em unidades arbitrárias da relação LC3b/ β -actina.

9.12 Avaliação da viabilidade de macrófagos

A viabilidade dos macrófagos infectados foi avaliada por um método colorimétrico baseado na capacidade das células de redução do composto MTS (tetrazolium 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboxi-metoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) em formazam, que é solúvel em meio de cultura (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega). Os BMDM foram plaqueados em placas de 96 poços (10^4 células/poço), e após 24 h foram infectados com o bacilo vivo ou irradiado, na MOI de 100:1, por 24 e 48 h. Antes da utilização do reagente, este foi deixado a temperatura ambiente por 40 minutos. Após o período determinado, foram adicionados 20 μ L de MTS por poço seguido de incubação por aproximadamente 3 h, em estufa umidificada com 5% de CO₂ a 33 °C. A OD foi adquirida à 490 nm utilizando o leitor de placas SpectraMax[®] M3 (Molecular Devices) e os resultados foram analisados no programa SoftMax Pro (Molecular Devices). Além disso, foi feita uma curva padrão para a estimativa do número de células. A curva foi construída baseada num fator 2 de diluição, variando de 16×10^4 – $0,2 \times 10^4$ células por poço. Os resultados foram expressos em números de células ($\times 10^4$) através da equação obtida na análise da curva padrão.

9.13 Análise estatística para o estudo funcional do miR-146a

O programa GraphPad Prism (versão 5.01) foi utilizado para análise estatística. O nível de significância foi considerado para valores de p menores ou iguais a 0,05. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para a análise de significância entre dois grupos foi utilizado o teste-t não pareado bicaudal. Para a comparação entre grupos múltiplos foi aplicado ou o modelo de *one-way* ou de *two-way* ANOVA (teste F), seguido do pós-teste de Tukey, conforme indicado na legenda de cada figura.

9.14 Obtenção das amostras de sangue total

Para o estudo do perfil de miRNAs em sangue, as amostras de sangue total foram coletadas em tubos *PaxGene blood RNA tube* (PreAnalytiX, Qiagen/BD) provenientes de pacientes do RJ, atendidos no Ambulatório Souza Araújo (ASA), FIOCRUZ. Os pacientes recrutados foram diagnosticados pelas equipes médicas do ASA e classificados de acordo com as formas clínicas definidas por Ridley e Jopling (10). Foram selecionados 12 pacientes MB (LL= 11; BL= 1), 13 PB (TT= 1; BT= 12), 61 contatos intradomiciliares dos pacientes MB e 9 controles saudáveis. Todos os indivíduos que participaram do estudo o fizeram sob consentimento, por escrito, conforme as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (protocolo CEP/Fiocruz 151/01), conforme anexo (Capítulo IV, item 4.8)

9.15 Seleção de miRNAs

O método de amplificação eleito para este estudo conta com um sistema de microfluídica (Fluidigm, Biomark) que permite a amplificação simultânea e individual de 96 alvos de miRNAs para cada 96 amostras, totalizando 9.216 reações de PCR. Deste modo, selecionamos 96 miRNAs com base em dados da literatura sobre miRNAs presentes em amostras clínicas de sangue total em tuberculose e outras doenças infecciosas e também de miRNAs circulantes. A lista dos 96 miRNAs pode ser encontrada no anexo (seção 4, A) desta tese.

9.16 Extração de RNA a partir do sangue total

A extração de RNA do sangue total foi realizada com o kit *PaxGene blood miRNA*, conforme instruções fornecidas pelo fabricante (PreAnalytiX, Qiagen/BD). O sangue foi centrifugado a 5.000 g por 10 min a temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido e a ele foram acrescentados 4 mL de água RF. Em seguida, o sedimento foi homogeneizado por vórtex, até a sua inteira dissolução seguido de nova centrifugação a 5.000 x g durante 10 min. Após a completa remoção do sobrenadante foram adicionados 350 µL do tampão de lavagem BM1 seguida homogeneização por vórtex até o sedimento não ficar mais visível. Esta solução foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e foram acrescentados 300 µL do tampão de digestão BM2 e 40 µL de proteinase K. Após homogeneização, as amostras foram incubadas a 55 °C por 10 min sob agitação. O lisado foi transferido para uma coluna (fornecida pelo kit, PAXgene Shredder Spin Columns) e centrifugado por 3 min a 20.000 g. O sobrenadante filtrado pela coluna foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e a ele foram adicionados 700 µL de isopropanol seguido de agitação por vórtex. Em seguida, esta solução foi transferida para uma nova coluna contendo uma membrana de sílica (fornecida pelo kit, PAXgene RNA Spin columns) e novamente centrifugado a 20.000 g por 1 min. Após o que, a membrana foi lavada com 350 µL do tampão BM3, seguido de centrifugação a 20.000 g por 1 min. À membrana foi adicionado 80µL de uma solução contendo DNase I (10 µL do estoque de DNase I + 70 µL do tampão RDD) seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 min. Após a digestão, a membrana foi novamente lavada com 350 µL do tampão BM3 e centrifugada a 20.000 g por 1 min. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com 500 µL do tampão BM4 e centrifugado a 20.000g durante 2 min. Assim, a coluna foi transferida para um novo microtubo e mais uma centrifugação (20.000 g por 1 min) foi realizada para evaporar o isopropanol remanescente na membrana. Após esta etapa a coluna foi transferida para um microtubo de coleta (1,5 mL) e a ela foram adicionados 80 µL de tampão de eluição BR5 seguido de centrifugação a 20.000 g por 1 min. O RNA obtido foi então desnaturado por 5min a 65 °C e armazenado a -80 °C.

9.17 Quantificação e análise da integridade de miRNAs

O RNA obtido foi primeiramente quantificado no NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc) e as amostras dentro dos padrões de pureza, ou seja, baixa contaminação por proteínas ($260/280 \geq 1,8$) e reagentes orgânicos ($260/230 \geq 1,8$) foram posteriormente avaliadas para

qualidade em sistema de eletroforese capilar. Para isso, inicialmente, foram utilizados o *chip* e o *kit* para análise de pequenos RNAs (Agilent small RNA kit). A análise consiste em submeter o RNA, previamente marcado com um corante, à eletroforese em capilares finos que permite a separação destes por tamanho e o registro de sua intensidade de fluorescência num determinado ponto fixo. A técnica permite a aferição da integridade dos pequenos RNAs, incluindo os miRNAs, de forma bastante precisa. De modo complementar, também é possível determinar a quantidade (pg/ μ L) da população dos pequenos RNAs. A execução da técnica consistiu em preparar o chip para receber as amostras, acrescentando 9 μ L da matriz de separação e 9 μ L de um reagente condicionante. Posteriormente, foi acrescentado 1 μ L de RNA total (até 100 ng/ μ L) em cada poço do chip. Ao RNA foi acrescentado 5 μ L do reagente *marker*. A estimativa de tamanho do RNA foi obtida por comparação com o *Ladder* presente no *chip*. A análise foi feita no instrumento Bioanalyzer 2100 (Agilent).

9.18 Transcrição reversa e pré-amplificação

Para a síntese de cDNA, foi utilizado um *pool* customizado contendo 96 *stem-loop primers* (Applied) específicos para os miRNAs selecionados para este estudo. Os miRNAs (1 pg) foram reversamente transcritos com o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Para isso foram utilizados 1X de *stem-loop primers*, 2 mM de dNTP, 10 U/ μ L da enzima MultiScribe® e 0,253 U/ μ L do inibidor de RNase; diluídos em tampão (1X), para um volume final de 8 μ L. A reação ocorreu por 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C. O cDNA obtido foi utilizado para a reação de pré-amplificação, sem diluição prévia. A pré-amplificação foi realizada em um volume final de 12,5 μ L contendo 1X do *pool* de *primers* PreAmp (Applied) customizado para os 96 miRNAs, 1X do TaqMan PreAmp Master Mix (Applied) e 2 μ L do cDNA. A primeira etapa da reação ocorreu a 95 °C por 10 min, seguida da segunda etapa de 55 °C por 2 min e posteriormente por 72 °C durante 2 min. A ciclagem foi realizada a 95 °C por 15 seg, 60 °C por 4 min (12 ciclos). Por fim a enzima foi desnaturada a 99,9 °C durante 10 min. O produto obtido foi diluído (8X) com a adição de 87,5 μ L de água RF e foram utilizados 2,5 μ L por reação de PCR.

9.19 PCR quantitativo (Biomark Fluidigm)

Para a execução da PCR no sistema Biomark (Fluidigm), inicialmente foi realizada a etapa de *Prime* que consiste na aplicação de 150 μ L do fluido de controle no chip 96.96 seguido do seu

carregamento no instrumento IFC Controller HX, de acordo com o *script* “Prime 136X”. Após esta etapa, foram preparados 96 ensaios individuais 10X contendo 2,5 μ L do ensaio individual 20X TaqMan Gene Expression (Applied) e 2,5 μ L do ensaio 2X Loading Reagent (Fluidigm). Separadamente, para cada 2,5 μ L de amostra foi acrescentado 0,25 μ L da solução 20X GE Sample Loading Reagent (Fluidigm) e 2,5 μ L do 2X TaqMan Universal Master Mix No UNG. Nos poços “Assay Inlets” foram aplicados 5 μ L dos ensaios individuais 10X, ao passo que nos poços “Sample Inlets” foram aplicados 5 μ L da solução contendo as amostras. Em seguida, foi realizado o *Load* das amostras e ensaios de expressão no chip 96.96, usando no instrumento IFC Controller HX, de acordo com o *script* “Load 136X”. Após o *Load* das amostras, o *chip* foi colocado no termociclador Biomark (Fluidigm) para a realização da PCR.

9.20 Análise de expressão dos dados de PCRq (Biomark Fluidigm) e estatística

Os dados de fluorescência da plataforma comercial Fluidigm (Biomark) foram exportados e analisados através de uma rotina de análise estabelecida na linguagem R. Para cada amostra, foi realizada a correção da fluorescência de fundo e análise exploratória dos dados através da montagem de gráficos de acúmulo de fluorescência a partir da intensidade do repórter normalizado (R_n). Para a análise de quantificação relativa, os dados do acúmulo de fluorescência da PCR de cada amostra foram ajustados através de uma curva sigmoide de quatro parâmetros a fim de representar cada curva de amplificação, utilizando a biblioteca qpcR (127) do programa de estatística R (versão 3.0.1) (128). O ciclo de quantificação foi determinado para cada amplificação pelo ponto máximo da segunda derivada da curva sigmoide ajustada. A eficiência de cada reação de amplificação foi determinada através da razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo imediatamente anterior. A média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação de um alvo de miRNA foi utilizada como estimativa de eficiência daquele miRNA. A normalização dos dados de expressão foi dada pela média geométrica do valor de expressão do miRNA mais altamente expresso de uma determinada amostra (129). As comparações das médias de expressão normalizadas de cada miRNA entre os diferentes grupos foi determinada através de teste-t não paramétrico com 1.000 permutações, e *one-way* ANOVA não-paramétrico com 1.000 permutações irrestritas (130); seguidos de comparações de pares *post-hoc* com pós-teste de Bonferroni através de um teste-t não-paramétrico com 1.000 permutações. O erro do tipo I foi ajustado para comparações múltiplas através da estimativa da taxa de falso positivo (FDR)

(131). Os dados foram representados pela média \pm erro padrão da média. Níveis de significância bi-caudais $\leq 0,01$, $0,05$ e $0,1$ foram considerados como “altamente significantes”, “significantes” e “sugestivos”, respectivamente.

9.21 Análise de enriquecimento dos alvos de miRNAs

Para os miRNAs identificados como potencialmente envolvidos nas comparações realizadas, foram identificados seus RNAm-alvos putativos a partir de algoritmos de predição de 5 bases de dados disponíveis na internet, são elas (1) TargetScan (<http://www.targetscan.org/index.html>); (2) miRNAMap (<http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw>); (3) PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu/>); (4) Microcosm Target (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5>); e (5) miRand (<http://www.microrna.org/microrna/home>). Como critério de inclusão, cada RNAm foi considerado alvo putativo caso sua predição fosse indicada em pelo menos 3 destes algoritmos. No sentido de identificarmos vias regulatórias e potenciais mecanismos destes miRNAs provenientes das amostras de sangue periférico, realizamos uma análise de enriquecimento funcional (GSEA, do inglês *gene set enrichment analysis*) com seus RNAm-alvos putativos (132). Como grupo gênico, foram considerados todos os alvos putativos que compartilham a mesma ontologia conforme a base de dados *Gene Ontology* (GO) (133,134). O método de GSEA permite a identificação de processos biológicos os quais estejam sobre representados dentre a lista de RNAm-alvos. Os processos biológicos sobre representados foram determinados com *score* estatístico baseado no teste hipergeométrico com p-valor $\leq 0,001$.

Capítulo II – RESULTADOS: ESTUDO GENÉTICO E FUNCIONAL DE MICRORNAS CANDIDATOS NA HANSENÍASE

Este capítulo é dedicado ao estudo de associação genética de genes de miRNAs à hanseníase. Ele se encontra dividido em três partes. A primeira consiste em um estudo genético envolvendo a associação de 4 miRSNPs candidatos através de um desenho do tipo caso-controle e outro por um desenho baseado em famílias (TDT), seguidos de validação funcional. Estes dados deram origem ao primeiro artigo da tese, já publicado na Revista PLOS Neglected Tropical Diseases (135), e eles serão apresentados no formato de artigo. Na segunda parte serão apresentados dados genéticos relativos a duas regiões regulatórias do gene miR-146a. Foram selecionados 2 SNPs localizados na região promotora ou próxima a ela, e um estudo do tipo caso-controle foi realizado. Por fim, o terceiro tópico diz respeito ao estudo funcional do miR-146a *in vitro*. O modelo experimental contou com a infecção de macrófagos murinos, provenientes de animais selvagens e nocautes para o gene miR-146a. Esta última etapa foi realizada durante o estágio no exterior, pelo programa Ciência Sem Fronteiras (Doutorado Sanduíche), no período de dez meses no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Beckman de Pesquisa, City of Hope. A seguir, segue um fluxograma (figura 9) que resume as etapas de trabalho deste capítulo.

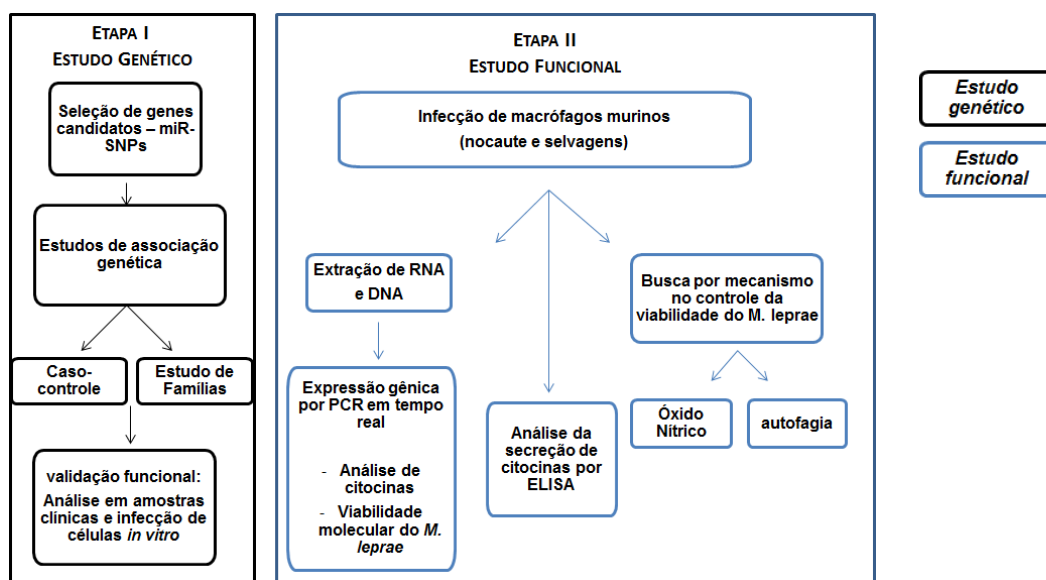


Figura 9: Fluxograma de trabalho do estudo de associação genética e funcional dos miRNAs.

1. Artigo: O polimorfismo de base única do pre-miR-146a (rs2910164 G>C) está geneticamente e funcionalmente associado a hanseníase

A escolha dos genes de miRNAs candidatos ao estudo genético-epidemiológico se deu através de trabalhos que indicaram a importância destes miRNAs na fisiologia de células do sistema imune e pelo fato de sua expressão ser induzida por receptores do tipo *Toll* (92,136). Classicamente, a indução da expressão do miR-146a pode ser alcançada pela ativação do TLR1/2 ou TLR4 (137), ambos os receptores são importantes na interação entre as células do sistema imune, tais como os macrófagos e as micobactérias. O miR-223, além de ter sido implicado na tuberculose, está relacionado com a funcionalidade das células Treg, tendo sua expressão aumentada nestas células (92). Por sua vez, o miR-125a também tem a sua expressão induzida por TLR2 e TLR4. Adicionalmente, este miRNA parece ser importante na ativação de macrófagos (138). Além disso, sabendo-se da sugestão de um *fingerprint* genético comum entre a doença de Crohn e a hanseníase (139)(140), justificamos a escolha do miR-196a-2 pelo seu envolvimento com esta doença regulando eventos de autofagia (141). Na tabela abaixo (tabela 4), encontram-se resumidas informações sobre estes genes, tais como localização cromossômica, o tipo de troca de bases e a posição do SNP no gene de miRNA. Obviamente, estas foram as evidências iniciais que os elegeram miRNAs candidatos ao estudo genético. Posteriormente, durante a execução deste estudo, outros trabalhos reforçaram esta escolha.

Tabela 4: Resumo das informações dos genes de miRNAs candidatos utilizados no estudo genético.

miRNA gene	ID SNP	Região cromossômica	SNP	Posição
miR-125a	rs12975333	19q13.41	G > T	Semente
miR-223	rs34952329	Xq.12	* > C	Pre-miR-223 loop
miR-196a-2	rs11614913	12q13.13	C > T	Pre-miR-196a-2*
miR-146a	rs2910164	5q33.3	G > C	Pre-miR-146a*



Pre-miR-146a (rs2910164 G>C) Single Nucleotide Polymorphism Is Genetically and Functionally Associated with Leprosy

Paula F. T. Cezar-de-Mello¹, Thiago G. Toledo-Pinto¹, Carolinne S. Marques¹, Lucia E. A. Arnez¹, Cynthia C. Cardoso^{1a}, Luana T. A. Guerreiro^{1b}, Sérgio L. G. Antunes¹, Márcia M. Jardim¹, Claudia de J. F. Covas^{1c}, Ximena Illaramendi¹, Ida M. Dias-Baptista², Patrícia S. Rosa², Sandra M. B. Durães³, Antonio G. Pacheco⁴, Marcelo Ribeiro-Alves^{1d}, Euzenir N. Sarno¹, Milton O. Moraes^{1*}

1 Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil, **2** Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, São Paulo, Brasil, **3** Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, **4** Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil

Abstract

Mycobacterium leprae infects macrophages and Schwann cells inducing a gene expression program to facilitate its replication and progression to disease. MicroRNAs (miRNAs) are key regulators of gene expression and could be involved during the infection. To address the genetic influence of miRNAs in leprosy, we enrolled 1,098 individuals and conducted a case-control analysis in order to study four miRNAs genes containing single nucleotide polymorphism (miR SNP). We tested miR SNP-125a (rs12975333 G>T), miR SNP-223 (rs34952329 *>T), miR SNP-196a-2 (rs11614913 C>T) and miR SNP-146a (rs2910164 G>C). Amongst them, miR SNP-146a was the unique gene associated with risk to leprosy *per se* (GC OR = 1.44, p = 0.04; CC OR = 2.18, p = 0.0091). We replicated this finding showing that the C-allele was over-transmitted (p = 0.003) using a transmission-disequilibrium test. A functional analysis revealed that live *M. leprae* (MOI 100:1) was able to induce miR-146a expression in THP-1 (p < 0.05). Furthermore, pure neural leprosy biopsies expressed augmented levels of that miRNA as compared to biopsy samples from neuropathies not related with leprosy (p = 0.001). Interestingly, carriers of the risk variant (C-allele) produce higher levels of mature miR-146a in nerves (p = 0.04). From skin biopsies, although we observed augmented levels of miR-146a, we were not able to correlate it with a particular clinical form or neither host genotype. MiR-146a is known to modulate TNF levels, thus we assessed TNF expression (nerve biopsies) and released by peripheral blood mononuclear cells infected with BCG Moreau. In both cases lower TNF levels correlates with subjects carrying the risk C-allele, (p = 0.0453 and p = 0.0352; respectively), which is consistent with an immunomodulatory role of this miRNA in leprosy.

Citation: Cezar-de-Mello PFT, Toledo-Pinto TG, Marques CS, Arnez LEA, Cardoso CC, et al. (2014) Pre-miR-146a (rs2910164 G>C) Single Nucleotide Polymorphism Is Genetically and Functionally Associated with Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 8(9): e3099. doi:10.1371/journal.pntd.0003099

Editor: Pamela L. C. Small, University of Tennessee, United States of America

Received: February 19, 2014; **Accepted:** July 5, 2014; **Published:** September 4, 2014

Copyright: © 2014 Cezar-de-Mello et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by FAPERJ (from portuguese: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro PRONEM); CAPES (from portuguese Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior/PPSUS); CNPq (from portuguese, Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico) and FIOCRUZ/PAPES V (from portuguese, Fundação Oswaldo Cruz/Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde). MOM is a CNPq and FAPERJ (CNE) fellow. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: mmoraes@fiocruz.br

^{1a} Current address: Laboratório de Virologia Molecular Animal, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

^{1b} Current address: Laboratório de Biocorrosão e Biodegradação, Instituto Nacional de Tecnologia, Rio de Janeiro, Brasil

^{1c} Current address: CESAM, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

^{1d} Current address: Laboratório de Pesquisa em Farmacogenética, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil

Introduction

Leprosy is an ancient disease caused by *Mycobacterium leprae*. Once infected, the majority of individuals may clear the bacilli through a natural resistant response. Nevertheless, some patients could develop a latent infection that eventually evolves to one of the clinical symptomatic forms of leprosy. Peripheral nerves Schwann cells and skin macrophages are preferentially invaded, evoking a chronic infection that may take years to become active. Once the disease is established, a range of immune responses occur in spite of *M. leprae* been genetically conserved [1]. The

spectral clinical manifestations are classified in a five-group system proposed in the 1960s by Ridley and Jopling [2]. A classic view of predominant Th1 for tuberculoid (TT) pole where a localized form of the disease is observed, in contrast to a major Th2 profile, where a disseminated form, called lepromatous (LL) pole is verified [3]. This classification system also comprises intermediate phenotypes, known as borderline, that interpose those two well characterized poles. Also, a variable percentage of the patients can experience an abrupt inflammatory episodes during the natural course of the disease, which are called type I (reversal) or type II (erythema nodosum leprosum) reactions [4,5]. Patients at the onset

Author Summary

In spite of the successful drug therapy, leprosy is still affecting people worldwide. It is well known that host genetic background influences leprosy development and that genetic variants have been associated with the disease. Therefore we conducted a study to evaluate the role of microRNAs (miRNAs) polymorphisms in leprosy. We observed that a polymorphism in miR-146a is associated with the risk to develop leprosy in Brazilians. Based on the analysis of clinical specimens, we found that the genetic variant was correlated with elevated levels of miR-146a and it is also a negative regulator of tumor necrosis factor (TNF), an important inflammatory mediator in the leprosy context. These findings provide tenable evidences that miR-146a is important in the control of gene expression during *M. leprae* infection and also may contribute with leprosy development by controlling TNF levels.

of the episodes exhibit high cytokine levels that are decreased once anti-inflammatory drugs are effective [6–8], while genetic association might also be important [9].

Host susceptibility or protection is associated with the complex interaction between environment and genetic background, leading to different outcomes. Several publications aimed to understand the genetic contribution to leprosy risk or protection using different approaches including: twin studies, family-based linkage analysis, candidate gene association and genome wide association studies [10–13]. In fact, studies are linking or associating genes that have been generating a compelling amount of evidence to confirm the genetic influence in leprosy outcome. For instance, genes associated with innate immune response, like *TLR1*, *NOD2*, and *PARK2* [11,14–16] or adaptive immune responses, such as *IL10*, *IFNG* and *LTA/TNF/HLA* have been consistently associated with leprosy [9,13,17–19].

Recently, microRNAs (miRNAs) have been described as novel regulators of innate and adaptive immune responses, although a few data reported its involvement in leprosy. MiRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [20], resulting in a hairpin primary-miRNA (pri-miRNA) that is processed, in a cascade, by different RNAses [21] generating pre-miRNA, and finally the mature miRNA strand facilitating the miR-RISC (RNA-induced silencing complex) assembly [20,22]. The miRNAs control gene expression at post-translational level by pairing with 3'-untranslated regions [23] leading to mRNA cleavage or translational repression [24]. Given that, it is possible to assume that the presence of polymorphisms along double-stranded sequences can affect miRNA expression and gene silencing [25]. Genetic variants in miRNA precursors, miR-196a-2 (rs11614913 C>T) and miR-146a (rs2910164 G>C) have been associated with cancer and tuberculosis [26–30]. Here, we conducted a case-control and a family-based study to test these miRNA SNPs with leprosy susceptibility. Further, we performed functional studies using cell cultures and biopsies from skin and nerves to investigate miRNA mature expression form to define a genotype-phenotype correlation.

Materials and Methods

Subjects for the genetic study

The case-control study includes a total of 1,098 individuals from Rio de Janeiro; of these, the 491 patients were recruited from the Souza Araújo outpatient unit, located at Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. The data for 607 controls was

obtained from a bone marrow donors' bank in Rio de Janeiro comprising of samples from local healthy individuals. A detailed presentation of this population has been described in Table S1 and elsewhere [16,31]. A replication population was also tested. Subjects for the family-based study were enrolled from Duque de Caxias, a hyper endemic city from the Rio de Janeiro state (Table S2). This population exhibited 97 nuclear families (426 subjects) [31]. All patients were routinely diagnosed according to Ridley and Jopling criteria (1966). Also, we adopted the World Health Organization (WHO) classification for treatment purposes, and patients were classified as paucibacillary/PB (including TT and borderline-tuberculoid) and multibacillary/MB (including LL, borderline-lepromatous and borderline-borderline). Population characteristics according to the WHO classification and reactional status are summarized in Table S1 and S2. All patients signed an informed consent and this project was approved by the institutional ethics committees from the involved institutions.

Nerve and skin biopsy specimens

Nerve biopsy samples were obtained at Souza Araújo outpatient unit. A detailed description of nerve samples and clinical forms was previously published [32]. To perform the correlation of TNF mRNA expression with miR-146a genotype we used 33 nerve samples (19 diagnosed with leprosy and 14 with other neuropathies). Among these specimens, we were able to determine miR-146a expression in 12 samples from leprosy patients and 7 from other peripheral neuropathies. In the group of neuropathies other than leprosy, our clinicians were able to accurately diagnose three out of 7 patients. Among those there was: chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP, n=2); and one case of systemic lupus erythematosus. All undiagnosed patients returned to their neurological clinic for follow-up.

Skin biopsies were obtained from patients who live in Rondonópolis (Mato Grosso State, Brazil), enrolled and diagnosed by professionals from Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru city, São Paulo State, Brazil). These specimens comprise 54 skin samples, amongst which 17 patients were diagnosed as MB [borderline borderline (BB) = 10, borderline lepromatous (BL) = 2, LL = 5; distributed as 3 women and 14 men; mean age: 41.6±9.6]. Thirty seven patients were classified as PB [borderline tuberculoid (BT) = 21 and TT = 16; distributed as 17 women and 20 men; mean age: 43.9±16.9].

Ethics statement

The sample collection and procedures described in this work were approved by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) and Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL) ethics committees. All patients or their parents/guardians signed a written informed consent (IRB protocol - Fiocruz 151/01 and ILSL 172/09).

Mycobacteria

M. bovis BCG Moreau strain (obtained from Fundação Ataulpho Paiva, Rio de Janeiro, Brazil) was cultured, for about 2 weeks, in Middlebrook 7H9 (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 0.02% glycerol and enriched with 10% ADC Middlebrook and 0.5% Tween-80 at 37°C as described elsewhere [32]. Live *M. leprae* from Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru, São Paulo) was aseptically cultured in footpads of athymic NU/NU mice, purified and enumerated using methods described previously [33–35]. All infections experiments with live *M. leprae* were conducted at 33°C. A portion of live *M. leprae* was irradiated with ionizing radiation 10 kiloGray (Acelétrica Ltda).

Cell cultures and infection

THP-1 cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, EUA) and cultivated with RPMI-1640 (LGC Biotecnologia, Brazil) supplemented with 2 mM L-Glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% heat-inactivated FBS (HyClone Laboratories, Canada) at 37°C, 5% CO₂. Before infection, cells (5×10⁵/well) were differentiated into macrophage-like cells (mTHP-1) using 80 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) for 24 h. Then, mTHP-1 were washed with PBS (1×), which was replaced by fresh antibiotics-free medium. Subsequently, stimulation (3, 24, and 48 h) was performed with irradiated or live *M. leprae* (Multiplicity of Infection - MOI 10:1, 100:1) at 33°C. After infection, total RNA was extracted as described below.

PBMC from healthy donors were collected in K₃EDTA-tube (Labor Import Com. Imp. Exp. Ltda, Brazil), and isolated by Ficoll-Hypaque density gradient. After centrifugation (2,500 rpm, 30 min, 25°C), the interface containing mononuclear cells monolayer was collected, washed twice with PBS 1×, and cultivated in RPMI 1640 (LGC Biotecnologia, Brazil) supplemented with 10% human A/B RH⁺ serum (Sigma-Aldrich).

ELISA

After isolation, PBMC were carefully selected according to miR-146a genotype (rs2910164 G>C), as described below. Cells were infected with BCG Moreau strain (MOI 10:1) for 24 hours at 37°C. BCG was used as a surrogate model for *M. leprae* infections since it is a better inducer of TNF and also because this mycobacteria is able to induce miR-146a expression in vitro (data not shown). The supernatant was collected and detection to TNF levels was evaluated by Enzyme-linked immunosorbent assay kit DuoSet (R&D Systems, EUA) according to the manufacturer's protocol. Samples optical density (OD) was taken at 450 nm and estimated based on a standard curve, ranging (15.6–1000 pg/mL). Measurements were performed in duplicate.

Nucleic acid extraction

Genomic DNA for the genetic study was extracted from peripheral blood or directly from PBMCs aliquots according to salting-out method as described [36]. RNA, and then DNA, from skin and nerve biopsy specimens were extracted using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions [37]. After DNA extraction, all samples were genotyped for SNPs as described below. Total amount of nucleic acids and purity were measured at NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) instrument. The quality inspection of RNA was tested using agarose gel electrophoresis (1.2%) of 200 ng of SYBR Green II-stained RNA visualized at a transilluminator system (L-Pix Touch, *Loccus Biotecnologia*).

MiRNAs genotyping and gene expression analysis by PCR

Allelic discrimination was performed using TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems, CA, USA) for miR-196a-2 (rs11614913 C>T), miR-146a (rs2910164 G>C), miR-125a (rs12975333 G>T) and miR-223 (rs34952329 *>T) SNP. DNA (10–50 ng) amplification was performed in a final volume of 5 µL (2.5 µL of the TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems), 0.125 µL of the TaqMan primers and probes). For miRNA expression analysis we performed a pooled-RT by using a set of specific stem-loop primers for each target (miR-146a, RNU44, RNU48) as indicated by the manufactures (TaqMan, Applied Biosystems). Briefly, non-denatured total RNA (200 ng) was incubated with RT primer pool (0.02×), dNTP (2 mM),

Superscript III (10 U/µL, Invitrogen), RNase inhibitor (0.253 U/µL, Invitrogen) and first strand buffer (1×) in a final volume of 15 µL. The cDNA obtained was diluted (1:6) and 2 µL were subjected to real-time PCR reaction, at a final volume of 10 µL. For RPL13a and TNF expression, total RNA (500 ng) was reversed transcribed following Superscript III manufacturer's instruction (Invitrogen). Then, 5 µL of diluted cDNA (1:5) was amplified by real time PCR using SYBR Green PCR Master Mix (1×) and primers (0.5 µM) at the final volume of 20 µL. Both genotyping and miRNA expression were run on a StepOne Plus thermocycler detection system (Applied Biosystems). Specifically for TNF mRNA expression in nerve biopsies, data was retrieved from previous experiment and reanalyzed stratifying patients according to genotypes. Quantitative RT-PCR was performed using Biomark multiplex assays (Fluidigm, CA) as previously described [32].

Statistical analysis

After genotyping, we performed the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) analysis by chi-square tests. Then, we determined the genotypic, allelic and minor allele carriers frequencies, in order to perform comparisons between case and control groups. Genotypes and alleles with higher frequency were taken as baseline. The measure of allelic and genotypic association with leprosy was estimated by the Odds Ratio (OR) values generated after the application of a logistic regression model as described in detail elsewhere [31]. We also assessed an OR value adjusted for sex, ethnicity and age-at-onset for all comparisons evaluated (leprosy *per se*, subgroup PB–MB, reaction *per se*, and types of leprosy reactions). We also performed a case-control analysis using age as a categorical variable, for that analysis we adjusted for sex and ethnicity. Case-control study statistical analysis was performed using the packages *genetics* and *coin* from open source software R version 2.12.2 (available at <http://www.R-project.org/>). MiR-146a allele-dose effect (GC/CC) was determined by the Cochran–Armitage trend test. The analysis of the family-based transmission/disequilibrium test (TDT) was performed with FBAT software, version 2.0.2c. The TDT allows exploring if miR-146a C-allele is transmitted, from heterozygous parents to its affected child [38]. The amount of transmitted alleles was determined in the software Haploview [39]. We first performed the TDT analysis considering all affected child, regardless of their clinical form. A second analysis was conducted to verify the allele transmission to affected child according to their PB/MB status. To test for statistical significance among subgroup analysis we performed heterogeneity testing determined by Cochran's Q statistic.

Gene expression statistical analyses were done using Prism 5 (GraphPad software). Two-tailed Mann-Whitney *t*-test was applied for two sample group comparisons. For multiple testing, Kruskal-Wallis test was used followed by Dunn's post-test. Data is presented as mean ± SEM, except for ELISA (median). The value of *p*<0.05 was taken as statistically significant.

Results

MiR-146a (rs2910164) C-allele is associated with risk to leprosy *per se* and clinical forms

Allelic, genotypic and carrier frequencies were determined in both cases and controls and they did not deviate from HWE for SNPs miR-146a and miR-196a-2 (Table 1). The other two tested SNPs (miR-125a and miR-223) proved not polymorphic in our population. No association was detected for miRSNP-196a-2 genotypic or allelic frequencies with leprosy *per se*. Nevertheless, the polymorphisms of miR-146a gene have a susceptibility effect to

leprosy *per se* for genotypes (*GC* $OR_{adjusted} = 1.44$; $p = 0.04$ and *CC* $OR_{adjusted} = 2.18$; $p = 0.0091$). This effect was also observed for allelic frequencies and *C*-allele carriers ($OR_{adjusted} = 1.47$; $p = 0.03$ and $OR_{adjusted} = 1.56$; $p = 0.008$; respectively). The genotypic *OR* values prompted us to investigate if it was directly proportional to the *C*-allele presence in each genotype (allele-dose effect), which was confirmed by applying the Cochran–Armitage trend test ($\chi^2 = 96.6$, $p = 2.2 \times 10^{-16}$). Interestingly, when we evaluated the influence of age-at-leprosy diagnosis in the association effect of miR-146a, we found a stronger effect in the subgroup correspondent from 25 to 34 years/old (Figure S1 and Table S3). Furthermore, we performed a comparison between controls and clinical forms, as stratified by PB and MB (Table S4). Once again, we could not find any association with miR-196a-2. Nonetheless, for both comparisons (PB vs. control or MB vs. control) we observed the risk association of *C*-allele for miR-146a, which was more prominent in the PB group. Significance levels were maintained in different comparison levels in PB subgroup versus controls rather than MB subgroup (Table S4). But, the heterogeneity test demonstrated no statistical significance (p -value = 0.40)

A confirmation of the genetic finding for miR-146a was observed after TDT analysis (Table 2). Considering leprosy *per se*, twenty-eight over 41-affected informative patients, received the *C*-allele indicating its over-transmission ($p = 0.003$). When we stratified affected individuals according to their PB or MB classification, the TDT for PB patients revealed sixteen over twenty one-affected transmissions ($p = 0.01$). The number of transmissions of the *C*-allele for MB affected patients were not significant ($p = 0.23$) (Table S5). These data confirm that miR-146a, in our replication sample, is associated with leprosy *per se*,

however we could not provide sufficient evidence to infer subtype specificity.

MiR-146a (rs2910164 G>C) SNP was not associated with leprosy reaction

In order to evaluate if those miRSNPs could be associated with leprosy reaction episodes, we subdivided only our patient group in (1) controls, patients without occurrence of reactional episodes and (2) cases, patients who exhibited only one type of leprosy reactional (LR) episodes (erythema nodosum leprosum, ENL or reverse reaction, RR). Those who have experienced both episodes were excluded from analysis. We could not observe any association between miR-196a-2 and leprosy reactions (data not shown). Although we found that *CC* genotypes showed borderline association with protection to leprosy reactions (Table S6), and ENL as outcome, no statistical significance was found after adjustment for the covariates gender, ethnicity and age (Table S7).

Live *M. leprae*, but not irradiated *M. leprae*, was able to induce miR-146a expression

Previous results have shown that specific pathways associated with pro-mycobacterial profiles that reprogram cellular environment to establish a suitable niche for bacterial survival are dependent on *M. leprae* viability [40]. So, we asked whether the functional role of miR-146a was dependent on live *M. leprae*. Irradiated *M. leprae* did not induce miR-146a expression (data not shown), on the other hand, live *M. leprae* infection for 3, 24 and 48 h at two different MOIs (10:1 and 100:1) induces miR-146a expression at 100 bacilli per cell (Figure 1). MiR-146a expression started at 24 h and was sustained until 48 h of infection.

Table 1. Genetic association of the miR-196a-2 and miR-146a in the Rio de Janeiro sample: a case-control study of leprosy *per se*.

SNP	Genotype/Allele	Case	Control	OR (95% CI; p Valor)	OR (95% CI; p Valor)*
miR-196a-2 (rs11614913)	CC ^b	237 (0.48)	272 (0.47)	-	-
	CT	203 (0.41)	251 (0.44)	0.93 (IC = 0.72–1.2; p = 0.5655)	1.02 (IC = 0.71–1.46; p = 0.90)
	TT	51 (0.1)	52 (0.09)	1.13 (IC = 0.74–1.72; p = 0.5841)	1.18 (IC = 0.64–2.19; p = 0.59)
	Total	491	575		
	C-Allele ^b	677 (0.69)	795 (0.69)	-	-
	T-Allele	305 (0.31)	355 (0.31)	1.01 (IC = 0.78–1.31; p = 0.9468)	1.06 (IC = 0.73–1.54; p = 0.75)
	T-Carriers	254	303	0.96 (IC = 0.76–1.22; p = 0.7533)	1.05 (IC = 0.74–1.48; p = 0.78)
miR-146a (rs2910164)	GG ^b	184 (0.38)	330 (0.54)	-	-
	GC	246 (0.5)	242 (0.40)	1.82 (IC = 1.42–2.35; p = 3.28 × 10⁻⁰⁶)	1.44 (IC = 1.02–2.05; p = 0.04)
	CC	58 (0.12)	35 (0.06)	2.97 (IC = 1.88–4.69; p = 2.93 × 10⁻⁰⁶)	2.18 (IC = 1.21–3.93; p = 0.0091)
	Total	488	607		
	G-Allele ^b	614 (0.63)	902 (0.74)	-	-
	C-Allele	362 (0.37)	313 (0.26)	1.7 (IC = 1.32–2.21; p = 0.0001)	1.47 (IC = 1.03–2.11; p = 0.03)
	C-Carriers	304	277	1.97 (IC = 1.54–2.51; p = 4.68 × 10⁻⁰⁸)	1.56 (IC = 1.12–2.18; p = 0.008)

Population counts are shown as N (frequency).

*Adjusted for sex, ethnicity and age.

^bGenotype or allele used as baseline.

Global p-value to miR-146a $p = 0.002$. Trend test: miR-146a *C*-allele, $\chi^2 = 96.6$; $p = 2.2 \times 10^{-16}$ /case-control comparison. HWE of control population: miR-196a-2; $\chi^2 = 0.2$; $p = 0.65$ and miR-146a; $\chi^2 = 0.95$; $p = 0.34$.

doi:10.1371/journal.pntd.0003099.t001

Table 2. Family Based Association test of 97 family cores, n=426 individuals from Duque de Caxias city.

miRSNP-146a	Transmitted	Not transmitted	Allele Frequency	Z Test	p-Value
G	13	28	0.66	-2.979	0.003
C	28	13	0.34	2.979	0.003

doi:10.1371/journal.pntd.0003099.t002

Mature miR-146a expression is differentially expressed in nerves from leprosy patients and it is affected by host genotype

So far, we observed an associated SNP in a gene that was being up-regulated by *M. leprae* infection. Then, we decided to explore miR-146a expression in skin and nerve biopsy samples trying to correlate genetic, clinical and biological findings. Initially, we determined miR-146a levels in nerve leprosy patients (L) and performed a comparison with biopsies from patients with non-leprosy (NL) neuropathies. We found that miR-146a is more expressed in leprosy nerve biopsies group than in NL biopsies (Figure 2A). The examination of miR-146a expression according to host genotype revealed that carriers of C-allele were able to produce high levels of the mature miRNA (Figure 2B) in nerves. We determined miR-146a levels in skin biopsies from leprosy patients and performed a comparison between the MB and PB groups. Our results showed that biopsies from patients in both clinical forms express moderate-to-high levels of this miRNA, but no difference between MB and PB was detected (Figure 2C). Stratification according to Ridley and Jopling (R&J) clinical forms (LL, BL, BB, BT and TT) did not show any differences in miR-146a levels (data not shown). Furthermore, stratification by the risk allele (C-carriers) showed a tendency of augmented miR-146a expression in skin biopsies, although not significant (Figure 2D). Comparisons indicate that miR-146a C-allele seems to induce higher levels of miR-146a, which was also increased in leprosy patients, although no clustering was observed between clinical forms.

TNF expression and secretion was influenced by rs2910164 miR-146a genotypes

It was previously reported that miR-146a negatively regulates cytokines in primary peritoneal macrophages of mice, such as TNF [41]. Therefore, at this point, our hypothesis was whether the

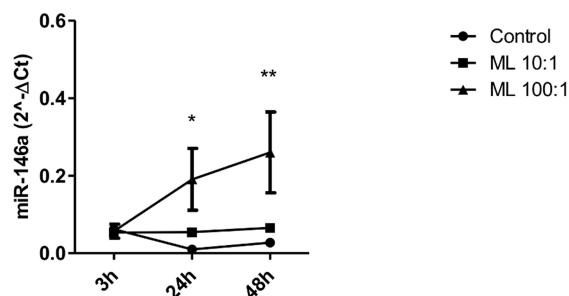


Figure 1. MiR-146a expression in cells exposed to *M. leprae*. Macrophage-like THP-1 cells (5×10^5) were infected with live *M. leprae* (MOI 10:1, 100:1) for 3, 24 and 48 h at 33°C. RNA was extracted and a real-time stem-loop RT-PCR was performed using RNU48 to normalize. Data show mean \pm SEM (* $p < 0.05$ relative to 24 h control, ** $p < 0.05$ relative to 48 h control). Results represent four independent experiments.

doi:10.1371/journal.pntd.0003099.g002

polymorphism associated with risk (C-allele) correlates to lower levels of TNF. For this, we analyzed the expression of TNF in nerve biopsies [32] and stratified according to the genotypes. As shown in Figure 3A, the presence of C-allele is associated with a reduction of TNF expression ($p = 0.045$), irrespective the disease type (L or NL). Then, we tested if miR-146a genotypes could influence TNF secretion. For that purpose, the cells were either left uninfected or infected with BCG Moreau and we compared infected groups with different genotypes. As shown in Figure 3B, the presence of the C-allele was related with less TNF secretion when comparing it to its control, GG-infected genotype ($p = 0.0352$).

Discussion

In this study we showed that a SNP in miR-146a (rs2910164G>C), located in a cytokine cluster (5q31) associated with autoim-

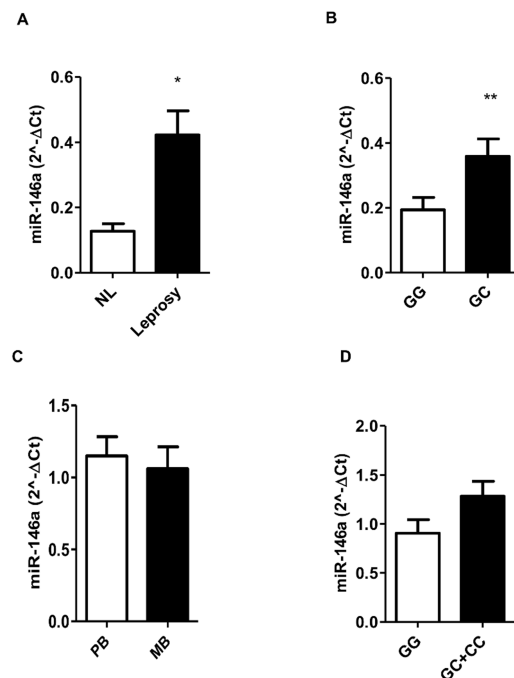


Figure 2. MiR-146a expression in nerve and skin biopsies, and according to patients' genotype (rs2910164). MiR-146a mature form expression was analyzed in nerve (A, B) and skin (C, D) specimens by real-time stem-loop RT-PCR after total RNA extraction. RNU48 expression was used to normalize. (A) Analysis was performed comparing the levels of miR-146a expression in nerve biopsies (NL = not leprosy, n=7/Leprosy, n=12). (B) MiR-146a expression stratified by rs2910164/G>C genotype, GG (n=8) and GC (n=7). The data show mean \pm SEM (* $p = 0.0099$; and ** $p = 0.0401$) (C) Results show neither difference of miR-146a expression in skin biopsies according to clinical forms (PB=37 and MB=17), nor by genotype stratification (GG=10; GC=22; CC=4) (D).

doi:10.1371/journal.pntd.0003099.g002

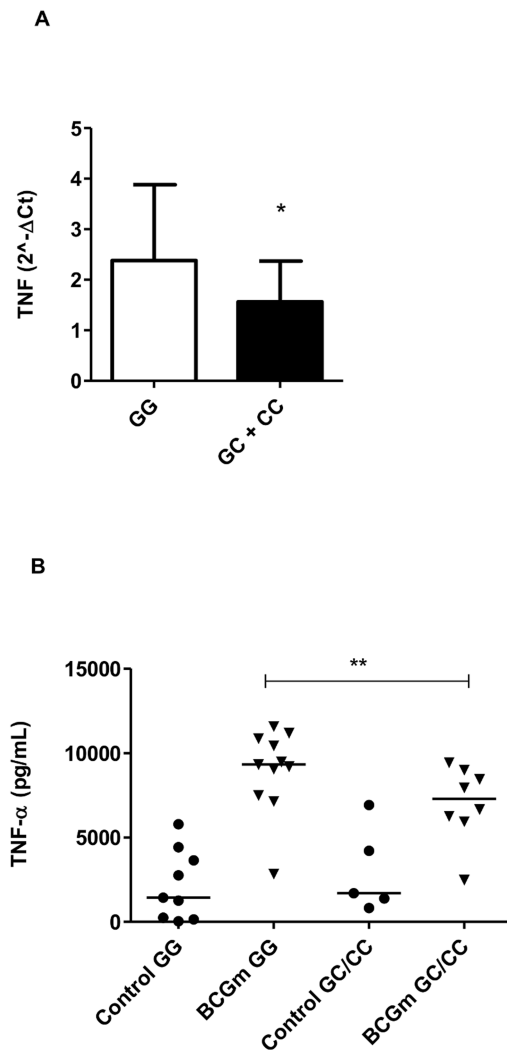


Figure 3. TNF expression and secretion according to the host genotypes (rs2910164). (A) TNF expression from nerve biopsies was assessed by qRT-PCR after RNA isolation. Standardized expression values are shown. Control genotype (GG) = 12 and risk genotype (GC+CC) = 15. Data show the mean \pm SEM (* p = 0.0453). (B) To assess TNF secretion, PBMC (3×10^6 cells) were infected with BCG Moreau (BCGm) at a MOI 10:1 for 24 h at 37°C. Supernatant was collected and TNF concentration (pg/mL) was estimated by ELISA. TNF levels produced by infected cells were significantly lower in C-allele carriers (risk variant) when compared with infected cells with GG genotype. Lines represent the median of each group and the dots represent individual PBMC donors. (** p = 0.0352). doi:10.1371/journal.pntd.0003099.g003

munity [42,43] and Crohn's disease [44], was associated with leprosy susceptibility. Interestingly, live *M. leprae* up regulates this miRNA and carriers of the risk allele were also expressing more miR-146a. Furthermore, we were able to correlate lower levels of TNF with the presence of the risk allele. We also selected other two candidate miRNA SNPs (miR-125a, miR-223) previously identified as associated with regulation of immune responses [45,46], but neither were polymorphic in Brazilians. The miR-196a-2 were chosen based on their involvement in Crohn's disease [47]. Nonetheless, we could not find any association between miR-196a-2 and leprosy although a previous report provided evidence to a common genetic fingerprint in Leprosy and Crohn's disease [48].

It was reported that miR-146a (rs2910164) GC polymorphisms plays an important role in papillary thyroid carcinoma while CC genotype are linked with risk and the reduction of survival in patients with glioma [49]. Controversial studies concerning susceptibility to cancer were investigated by a meta-analysis. They could not find a pattern between the SNP and the tumor type, conversely, the study pinpointed that there is an association between GG variant genotypes and increased risk of cancer among Asians [50], maybe reflecting the heterogeneity of the disease. Considering mycobacteria infections, it was demonstrated that the G-allele has an association with pulmonary tuberculosis in different directions in Han (protection) and Tibetan (risk) populations [51]. Here, we provide consistent evidence of G>C miR-SNP-146a associated with leprosy among Brazilians. Using two different study designs, case-control and family-based, we found that the C-allele was strongly associated with susceptibility to leprosy *per se* and age-at-diagnosis was an important adjustment for the association, which was also suggested previously in leprosy [52,53]. For all case-control comparisons, we tested the miR-SNP-146a association considering sex and ethnicity with or without (data not shown) age as covariate, but the results remain unaltered after the inclusion of age-at-diagnosis correction. However, considering age subsets independently, a stronger association in the early-onset leprosy (25–34 years/old) was detected. This last observation is consistent with the idea that the early-onset may reflect a stronger genetic effect [17,52,54]. Curiously, the genetic design using leprosy reactions as outcome suggested an association between CC genotypes and LR protection towards protection, although not statistically significant after correction considering or not the covariate age.

MiR-146a mature form contributes to the reduction of TNF synthesis by down-regulation of adapter molecules IRAK1/TRAF6 through 3'UTR matching [55]. In THP-1 ectopically super-expressing miR-146a, Boldin and coworkers described that the exacerbated immune response was down-regulated by the reduction of TNF and IL-6 levels. Also, they found an uncontrolled autoimmune profile in miR-146a^{-/-} knockout mice, as the animals were hyper-responsive to LPS challenge, producing high levels of those pro-inflammatory cytokines TNF, IL-6 [41] that was also in agreement with previous reports [56,57] and our results here. It was recently shown that *M. bovis* BCG induces miR-146a expression and regulates TNF levels [58]. In our model, only live *M. leprae* was able to stimulate miR-146a expression. A recent paper from Siddle and colleagues, identified some SNPs in miRNA genes as markers of expression of quantitative trait loci (eQTL) in dendritic cells infected with *M. tuberculosis* [54,59]. In fact, it has been proposed that SNPs along the strands that generate miRNAs can have great impact on both biogenesis of mature miRNA as well as the gain or loss of function of a particular miRNA [25,60]. The miR-SNP-146a is localized in the precursor strand and involves a shift of G:U pair to C:U mismatch. Jazdzewski showed that miR-146a expression was lower in the presence of the C-allele when compared to the G-allele [27,28]; confirmed by others reports on cancer [61,62]. In our analysis, miR-146a expression in nerve biopsies from leprosy patients revealed a different pattern: C-allele carriers are related with the high levels of the mature miR-146a. In agreement with our findings, it was shown by Kogo and colleagues that miR-146a was highly expressed in carriers of CC genotype than GG in both healthy and tumor tissues from patients with gastric cancer [63]. Also, in lupus a study showed that the presence of the C-allele correlates with increased expression of the mature miR-146a [64]. Nevertheless, we did not observe differences in skin biopsies from PB and MB patients. Perhaps, in this case, it seems that rs2910164

G>C SNP might impact miR-146a expression very early in the progression from latent infection to active disease, since pure neural form could be considered an earlier stage of the leprosy development. We could hypothesize that in the early stages of progression towards active disease, miR-146a expression in the macrophages/dendritic cells may be differentially regulating cytokine secretion and the emergence of T cell specific subpopulations precipitating disease outcome [65]. This controversy in the literature suggests that the presence of this SNP G>C (rs2910164), and maybe others, may govern the expression of mature miRNAs.

Recently it has been shown that miR-21 targeting CYP27b1, an enzyme that convert the vitamin D pro-hormone to its active form, inhibits the microbicidal vitamin D dependent-pathway [66]. Also, the same study showed that miR-146a was the second most differentially expressed miRNA in lepromatous leprosy skin biopsies [66], although in our hands, with a high number of samples we detected no difference between the clinical forms of the disease.

In summary, we demonstrated the genetic association between miR-146a C-allele with leprosy susceptibility. Our data also suggest that miR-146a was overexpressed in leprosy biopsies and also produced by mTHP-1 infected with live *M. leprae*. Subjects carrying the risk allele also express high levels of miR-146a which correlates with lowest levels of TNF as readout of the inflammatory responses.

Supporting Information

Figure S1 The impact of “age-at-diagnosis” in miR-146a association with leprosy *per se* susceptibility using age as a categorical variable. The case-control analysis was performed considering different age subsets independently. We consider subsets of age-at-diagnosis less than 25 years old (yrs), from 25 to 34 yrs, from 35 to 44 yrs, from 45 to 54 yrs and equal or older than 55 yrs. The results showed a main effect of susceptibility association in the subset ranging 25 to 34 yrs, considering the homozygous genotype, C-allele and C-carriers. Also, we observed an association of heterozygous genotype and C-carriers in the 35 to 44 yrs subset. The GG genotype or G-allele was used as baseline. The results showed OR values adjusted for sex and ethnicity, age was used as categorical variable (*p-value<0.05 and **p-value=0.06). A detailed description of “age-at-diagnosis” subset populations can be found in supplemental table S3. (TIF)

Table S1 Characteristics of the population included in the case-control study. (DOCX)

References

1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, et al. (2006) The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol Rev* 19: 338–381.
2. Ridley DS, Jopling WH (1966) Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 34: 255–273.
3. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, et al. (1992) Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 149: 1470–1475.
4. Antunes DE, Araujo S, Ferreira GP, Cunha ACSR Da, Costa AV Da, et al. (2013) Identification of clinical, epidemiological and laboratory risk factors for leprosy reactions during and after multidrug therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108: 901–908.
5. Voorend CGN, Post EB (2013) A systematic review on the epidemiological data of erythema nodosum leprosum, a type 2 leprosy reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2440.
6. Oliveira RB, Moraes MO, Oliveira EB, Sarno EN, Nery JAC, et al. (1999) Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J Leukoc Biol* 65: 364–371.
7. Moraes MO, Sarno EN, Almeida a S, Saraiva BC, Nery J a, et al. (1999) Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 50: 541–549.
8. Moraes MO, Sarno EN, Teles RM, Almeida a S, Saraiva BC, et al. (2000) Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. *J Invest Dermatol* 115: 935–941.
9. Cardoso CC, Pereira AC, De Sales Marques C, Moraes MO (2011) Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol* 6: 533–549.
10. Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR (2010) Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 589–620.
11. Zhang F, Huang W, Chen S, Sun L, Liu H, et al. (2010) Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med* 362: 1447; author reply 1447–8.
12. Pacheco AG, Moraes MO (2009) Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers* 27: 173–186.
13. Moraes MO, Pacheco a G, Schonkeren JJM, Vanderborgh PR, Nery J a C, et al. (2004) Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun* 5: 592–595.
14. Mira MT, Alcáiz A, Moraes MO, Flumeri C Di, Thai VH, et al. (2004) Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Lett. to Nature* 427: 636–640.

Table S2 Characteristics of the population included in the TDT study.

(DOCX)

Table S3 Genotype counts for miR-146a in the Rio de Janeiro case-control group stratified according to age-at-leprosy.

(DOCX)

Table S4 Genetic association of the miR-196a-2 and miR-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy outcomes (MB and PB).

(DOCX)

Table S5 Family-Based Association test of leprosy outcome (PB and MB) from Duque de Caxias city population.

(DOCX)

Table S6 Genetic association of miR-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy reaction *per se*.

(DOCX)

Table S7 Genetic association of miR-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy reaction type as outcomes (RR and ENL).

(DOCX)

Checklist S1 STROBE checklist.

(DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to Dra. Luciana da Silva Rodrigues and João Pedro Souza Santos for management and live *M. leprae* isolation. Also, we thank Karina Garcia and Evandro Gomes de Souza, from Acéletron (Acelétrica Comércio e Representações Ltda., Rio de Janeiro, RJ) for technical assistance with *M. leprae* irradiation. We thank all subjects who accepted to participate in this study. Finally, we thank Ana Vigo by careful revision of the English text.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PFTcM MOM MRA AGP. Performed the experiments: PFTcM TGTP CSM LTAG XI SMBD CdjFC IMDB. Analyzed the data: PFTcM MRA TGTP CSM SLGA MMJ LEAA CCC AGP MOM. Contributed reagents/materials/analysis tools: IMDB ENS XI AGP PSR MOM. Wrote the paper: PFTcM AGP MOM.

15. Wong SH, Gochhait S, Malhotra D, Pettersson FH, Teo YY, et al. (2010) Leprosy and the adaptation of human toll-like receptor 1. *PLoS Pathog* 6: 1–9.
16. De Sales Marques C, Brito-de-Souza VN, Guerreiro LTA, Martins JH, Amaral EP, et al. (2013) Toll-like Receptor 1 N248S Single-Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Risk and Regulates Immune Activation During Mycobacterial Infection. *J Infect Dis* 208: 120–129.
17. Alcais A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, et al. (2007) Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. *Nat Genet* 39: 517–522.
18. Vanderborght PR, Pacheco A G, Moraes ME, Antoni G, Romero M, et al. (2007) HLA-DRB1*04 and DRB1*10 are associated with resistance and susceptibility, respectively, in Brazilian and Vietnamese leprosy patients. *Genes Immun* 8: 320–324.
19. Cardoso CC, Pereira A C, Brito-de-Souza VN, Dias-Baptista IM, Maniero VC, et al. (2010) IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet* 128: 481–490.
20. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, et al. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051–4060.
21. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415–419.
22. Hammond SM, Boettcher S, Caudy A a, Kobayashi R, Hannon GJ (2001) Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293: 1146–1150.
23. Lai EC (2002) MicroRNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30: 363–364.
24. Engels BM, Hutvagner G (2006) Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation. *Oncogene* 25: 6163–6169.
25. Mishra PJ, Bertino JR (2009) MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics* 10: 399–416.
26. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, et al. (2008) Genetic variants of miRNA sequences and non – small cell lung cancer survival. 118: 2600–2608.
27. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, et al. (2008) Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7269–7274.
28. Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, Pachucki J, Ringel MD, et al. (2009) Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1502–1505.
29. Tian T, Shu Y, Chen J, Hu Z, Xu L, et al. (2009) A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 1183–1187.
30. Qi P, Dou T, Geng L, Zhou F, Gu X, et al. (2010) Association of a variant in MIR 196A2 with susceptibility to hepatocellular carcinoma in male Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hum Immunol* 71: 621–626.
31. Cardoso CC, Pereira AC, Brito-de-Souza VN, Duraes SMB, Ribeiro-Alves M, et al. (2011) TNF -308G>A Single Nucleotide Polymorphism Is Associated With Leprosy Among Brazilians: A Genetic Epidemiology Assessment, Meta-Analysis, and Functional Study. *J Infect Dis* 204: 1256–1263.
32. Guerreiro LTA, Robottom-ferreira AB, Ribeiro-alves M, Rosa PS, Sandoval FG, et al. (2013) Gene Expression Profiling Specifies Chemokine, Mitochondrial and Lipid Metabolism Signatures in Leprosy. *PLoS One* 8: e64748.
33. Truman RW, Krahenbuhl JL (2001) Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr other Mycobact Dis* 69: 1–12.
34. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J (2005) Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol* 54: 235–242.
35. Levy L, Ji B (2006) The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lep Rev* 77: 5–24.
36. Miller SA, Dykes D., Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 12–15.
37. Martinez AN, Lahiri R, Pitman TL, Scollard D, Truman R, et al. (2009) Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 47: 2124–2130.
38. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506–516.
39. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263–265.
40. Mattos K a, Oliveira VGC, D'Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, et al. (2011) TLR6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol* 187: 2548–2558.
41. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, et al. (2011) miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med* 208: 1189–1201.
42. Tokuhira S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, et al. (2003) An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 35: 341–348.
43. Friberg C, Björck K, Nilsson S, Inerot A, Wahlström J, et al. (2006) Analysis of chromosome 5q31-32 and psoriasis: confirmation of a susceptibility locus but no association with SNPs within SLC22A4 and SLC22A5. *J Invest Dermatol* 126: 998–1002.
44. Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS, Lindblad K, Steinhart H, et al. (2001) Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 29: 223–228.
45. Sheedy FJ, O'Neill L a J (2008) Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis* 67 Suppl 3: iii50–5.
46. Li Y, Shi X (2013) MicroRNAs in the regulation of TLR and RIG-I pathways. *Cell Mol Immunol* 10: 65–71.
47. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, et al. (2011) A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet* 43: 242–245.
48. Schurr E, Gros P (2009) A Common Genetic Fingerprint in Leprosy and Crohn's Disease? *N Engl J Med* 361: 2666–2668.
49. Permut-Wey J, Thompson RC, Burton Nabors L, Olson JJ, Browning JE, et al. (2011) A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma. *J Neurooncol* 3: 639–646.
50. Wang J, Bi J, Liu X, Li K, Di J, et al. (2011) Has-miR-146a polymorphism (rs2910164) and cancer risk: a meta-analysis of 19 case-control studies. *Mol Biol Rep* 4: 4571–9
51. Li D, Li D, Wang T, Song X, Ququo M, et al. (2011) Genetic study of two single nucleotide polymorphisms within corresponding microRNAs and susceptibility to tuberculosis in a Chinese Tibetan and Han population. *Hum Immunol* 72: 598–602.
52. Alcais A, Quintana-Murci L, Thaler DS, Schurr E, Abel L, et al. (2010) Life-threatening infectious diseases of childhood: Single-gene inborn errors of immunity? *Ann N Y Acad Sci* 1214: 18–33.
53. Alter A, Fava VM, Huong NT, Singh M, Orlova M, et al. (2012) Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. *Hum Genet* 132: 107–116.
54. Casanova J-L, Abel L, Quintana-Murci L (2013) Immunology Taught by Human Genetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 78:157–172. doi:10.1101/sqb.2013.78.019968.
55. Taganov KD, Boldin MP, Chang K, Baltimore D (2006) NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *PNAS* 103:12481–6.
56. Perry MM, Moschos SA, Williams AE, Shepherd NJ, Larner-svensson HM, et al. (2008) Rapid Changes in MicroRNA-146a Expression Negatively Regulate the IL-1-Induced Inflammatory Response in Human Lung Alveolar Epithelial Cells. *J Immunol* 180:5689–5698.
57. Nahid M a, Pauley KM, Satoh M, Chan EKL (2009) miR-146a is critical for endotoxin-induced tolerance: IMPLICATION IN INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem* 284: 34590–34599.
58. Liu Z, Zhou G, Deng X, Yu Q, Hu Y, et al. (2014) Analysis of miRNA expression profiling in human macrophages responding to *Mycobacterium infection*: induction of the immune regulator miR-146a. *J Infect* 68: 553–61.
59. Siddle KJ, Deschamps M, Tailleux L, Nedelec Y, Pothlichet J, et al. (2014) A genomic portrait of the genetic architecture and regulatory impact of microRNA expression in response to infection. *Genome Res* 24: 850–859.
60. Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, et al. (2009) SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA* 15: 1640–1651.
61. Xu T, Zhu Y, Wei Q-K, Yuan Y, Zhou F, et al. (2008) A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 29: 2126–2131.
62. Xu B, Feng N-H, Li P-C, Tao J, Wu D, et al. (2010) A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *The Prostate* 70: 467–472.
63. Kogo R, Mimori K, Tanaka F, Komune S, Mori M (2011) Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases. *Clin Cancer Res* 17: 4277–4284.
64. Löfgren SE, Frostegård J, Truedsson L, Pons-Estel B a, D'Alfonso S, et al. (2012) Genetic association of miRNA-146a with systemic lupus erythematosus in Europeans through decreased expression of the gene. *Genes Immun* 13: 268–274.
65. Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, et al. (2011) Early Secreted Antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* Promotes Protective T Helper 17 Cell Responses in a Toll-Like Receptor-2-dependent Manner. *PLoS Pathog* (11):e1002378.
66. Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, et al. (2012) MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat Med* 18: 267–273.

1.1 Informações suplementares

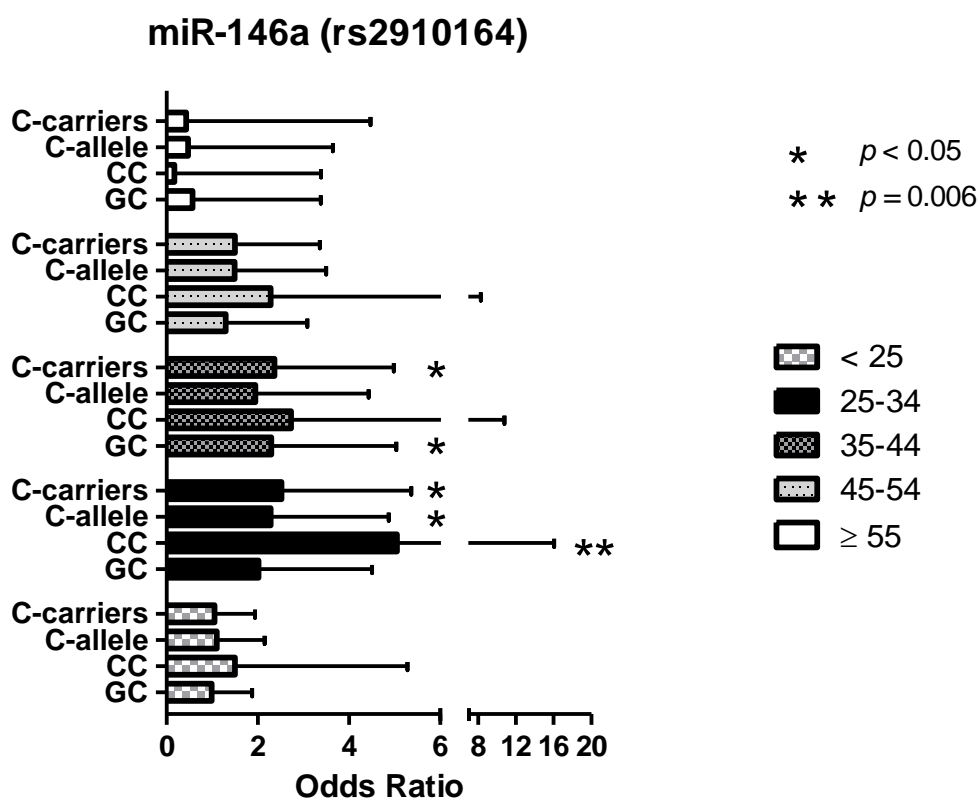


Figure S1: The impact of “age-at-diagnosis” in miRSNP-146a association with leprosy per se susceptibility using age as a categorical variable.

The case-control analysis was performed considering different age subsets independently. We consider subsets of age-at-diagnosis less than 25 years old (yrs), from 25 to 34 yrs, from 35 to 44 yrs, from 45 to 54 yrs and equal or older than 55 yrs. The results showed a main effect of susceptibility association in the subset ranging 25 to 34 yrs, considering the homozygous genotype, C-allele and C-carriers. Also, we observed an association of heterozygous genotype and C-carriers in the 35 to 44 yrs subset. The GG genotype or G-allele was used as baseline. The results showed OR values adjusted for sex and ethnicity, age was used as categorical variable (*p-value < 0.05 and **p-value = 0.06). A detailed description of “age-at-diagnosis” subset populations can be found in supplemental table S3.

Table S1.Characteristics of the population included in the case-control study.

	Case-control study population		WHO classification		leprosy reactions		
	Cases	Controls	MB	PB	RR*	ENL*	None LR
Age (mean ± SD)	39.4±16.8	33.5 ± 9.6	38.2 ± 16.4	41.1 ± 17.2	42.2 ± 16.8	34 ± 14.2	40.3 ± 17.4
Sex							
<i>Female</i> n (frequency)	325 (0.36)	314 (0.45)	152 (0.28)	173 (0.5)	48 (0.41)	37 (0.28)	73 (0.46)
<i>Male</i> n (frequency)	569 (0.64)	386 (0.55)	396 (0.72)	173 (0.5)	69 (0.59)	94 (0.72)	84 (0.54)
Ethnicity							
<i>Caucasoids</i> n (frequency)	438 (0.56)	393 (0.57)	266 (0.57)	172 (0.54)	49 (0.58)	41 (0.50)	63 (0.55)
<i>Mestizoes</i> n (frequency)	271 (0.34)	195 (0.28)	156 (0.33)	115 (0.36)	26 (0.30)	31 (0.37)	43 (0.38)
<i>Blacks</i> n (frequency)	79 (0.10)	105 (0.15)	46 (0.10)	33 (0.10)	10 (0.12)	11 (0.13)	8 (0.07)

Abbreviations: MB, multibacillary; PB, paucibacillary; RR, reverse reaction; ENL, erythema nodosum leprosum and LR, leprosy reactions.

*patients that have experienced only one kind of leprosy reaction episodes.

Table S2.Characteristics of the population included in the TDT study.

	Affected	Unaffected
Age (mean ± SD)	13 ± 7.9	39 ± 15.8
Sex		
<i>Female</i> n (frequency)	92 (0.55)	103 (0.56)
<i>Male</i> n (frequency)	75 (0.45)	79 (0.44)
Ethnicity		
<i>Caucasoids</i> n (frequency)	70 (0.47)	61 (0.44)
<i>Mestizoes</i> n (frequency)	45 (0.30)	52 (0.37)
<i>Blacks</i> n (frequency)	34 (0.23)	26 (0.19)
WHO classification		
<i>Paucibacillary</i> n (frequency)	68 (0.49)	--
<i>Multibacillary</i> n (frequency)	69 (0.50)	--

Table S3. Genotype counts for miRSNP-146a in the Rio de Janeiro case-control group stratified according to age at leprosy.

	< 25 yrs	25-34 yrs	35-44 yrs	45-54 yrs	≥ 55 yrs
Cases	103	110	69	40	4
GG	46 (0.45)	58 (0.53)	44 (0.64)	20 (0.50)	1 (0.25)
GC	46 (0.45)	44 (0.40)	21 (0.30)	16 (0.40)	2 (0.50)
CC	11 (0.10)	8 (0.07)	4 (0.06)	4 (0.10)	1 (0.25)
Controls	92	58	61	72	76
GG	47 (0.51)	21 (0.36)	26 (0.43)	30 (0.42)	34 (0.45)
GC	40 (0.44)	23 (0.40)	27 (0.44)	29 (0.40)	36 (0.47)
CC	5 (0.05)	14 (0.24)	8 (0.13)	13 (0.18)	6 (0.08)

Population counts are shown as N (frequency). In bold are shown total counts for each subgroup. Yrs= years old.

Table S4. Genetic association of the miRSNP-196a-2 and miRSNP-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy outcomes (MB and PB).

SNP	Genotype / allele	Group			OR (95% CI; p-Value)*	OR (95% CI; p-Value)*
		MB	PB	Control	PB vs Control	MB vs Control
miR-196a-2 (rs11614913)	CC ^b	140 (0.48)	97 (0.49)	272 (0.47)		
	CT	117 (0.40)	86 (0.43)	251 (0.44)	1.04 (IC= 0.66-1.64; p= 0.88)	1.08 (IC= 0.7 -1.65; p= 0.71)
	TT	36 (0.12)	15 (0.08)	52 (0.09)	0.79 (IC= 0.34-1.85; p= 0.59)	1.53 (IC= 0.77-3.03; p= 0.23)
	Total	293	198	575		
	C-Allele ^b	397 (0.68)	280 (0.71)	795 (0.69)		
	T-Allele	189 (0.32)	116 (0.29)	355 (0.31)	0.95 (IC= 0.59-1.55; p= 0.84)	1.18 (IC= 0.77-1.83; p= 0.44)
	T-Carriers	153	101	303	0.99 (IC= 0.64-1.54; p= 0.98)	1.16 (IC= 0.78-1.73; p= 0.47)
miR-146a (rs2910164)	GG ^b	118 (0.41)	66 (0.33)	330 (0.54)		
	GC	143 (0.49)	103 (0.52)	242 (0.40)	1.47 (IC= 0.93-2.33; p= 0.09)	1.52 (IC=1.01-2.29; p= 0.05)
	CC	29 (0.1)	29 (0.15)	35 (0.06)	3.08 (IC=1.53-6.20; p= 0.002)	1.62 (IC= 0.81-3.24; p= 0.17)
	Total	290	198	607		
	G-Allele ^b	379 (0.65)	235(0.59)	902 (0.74)		
	C-Allele	201 (0.35)	161 (0.41)	312 (0.26)	1.70 (IC= 1.08-2.67; p= 0.02)	1.37 (IC=0.90-2.09; p=0.0001)
	C-Carriers	172	132	277	1.54 (IC= 1.09-2.18; p= 0.01)	1.56 (IC=1.12-2.18; p= 0.008)

Population counts are shown as N (frequency). *Adjusted for sex, ethnicity and age. ^bGenotype or allele used as baseline. For both comparisons, the global p-value < 0.001.

Table S5. Family Based Association test of leprosy outcome (PB and MB) from Duque de Caxias city population.

miRSNP-146a	Transmitted	Not transmitted	Allele Frequency	Z Test	p-Value
Paucibacillary: 45 nuclear families, 195 individuals					
G	5	16	0.63	- 2.560	0.01
C	16	5	0.37	2.560	0.01
Multibacillary: 41 nuclear families, 193 persons					
G	6	7	0.71	-1.208	0.23
C	7	6	0.29	1.208	0.23

Q statistic (heterogeneity) p-value = 0.40.

Table S6. Genetic association of miRSNP-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy reaction *per se*.

SNP	Genotype/ allele	Case	Control	OR (95% CI; p-Value)	OR (95% CI; p-Value)*
miR-146a (rs2910164)	GG ^b	117 (0.41)	53 (0.34)		-
	GC	138 (0.48)	78 (0.50)	0.8 (IC= 0.52-1.2; p= 0.31)	0.77 (IC= 0.47-1.25; p= 0.30)
	CC	30 (0.11)	26 (0.17)	0.52 (IC= 0.28-0.97; p= 0.039)	0.54 (IC= 0.27-1.11; p= 0.097)
	Total	285	157		
	G-Allele ^b	372 (0.65)	184 (0.59)	-	-
	C-Allele	198 (0.35)	130 (0.41)	0.75 (IC= 0.54-1.12; p=0.17)	0.76 (IC= 0.48-1.2; p= 0.24)
	C-Carriers	168	104	0.73 (IC= 0.48-1.09; p= 0.13)	0.72 (IC= 0.45-1.14; p= 0.16)

Population counts are shown as N (frequency). *Adjusted for sex, clinical form (BL, LL), relapse and age. ^bGenotype or allele used as baseline. Global p-value = 0.75.

Table S7. Genetic association of miRSNP-146a in Rio de Janeiro population: a case-control study of leprosy reactions as outcomes (RR and ENL).

miR-146a (rs2910164)	Group			OR (95% CI) p-Value		OR (95% CI)* p-Value	
	Control	RR	ENL	RR vs cont.	ENL vs cont.	RR vs Cont.	ENL vs cont.
GG ^b	53 (0.34)	44 (0.38)	56 (0.43)	-	-	-	-
GC	78 (0.50)	59 (0.50)	63 (0.48)	0.91 (IC= 0.54-1.54) p= 0.73	0.76 (IC= 0.46-1.26) p= 0.29	0.86 (IC= 0.50-1.50) p= 0.60	0.71 (IC= 0.29-1.74) p= 0.45
CC	26 (0.17)	14 (0.12)	12 (0.09)	0.65 (IC= 0.30-1.39) p= 0.27	0.44 (IC= 0.2-0.95) p= 0.04	0.53 (IC= 0.23-1.21) p= 0.13	0.56 (IC= 0.16-1.98) p= 0.36
Total	157	117	131				
G-Allele ^b	184 (0.59)	147 (0.63)	175 (0.67)	-	-	-	-
C-Allele	130 (0.41)	87 (0.37)	87 (0.33)	0.84 (IC= 0.51-1.37) p= 0.48)	0.70 (IC= 0.43-1.14) p= 0.15	0.77 (IC= 0.46-1.30) p= 0.34	0.75 (IC= 0.33-1.71) p= 0.50
C-Carriers	104	73	75	0.85 (IC= 0.51-1.4) p= 0.51	0.68 (IC= 0.42-1.1) p=0.12	0.78 (IC= 0.46-1.3) p= 0.35	0.67 (IC= 0.28-1.59) p= 0.37

Population counts are shown as N (frequency). *Adjusted for sex, clinical form (BL, LL), relapse and age. ^bGenotype or allele used as baseline. Global p-value: RR vs control p =0.9666 and ENL vs control p = 0.4083.

2. Análise genética de associação entre SNPs da região promotora do miR-146a e a Hanseníase

Como explicitado anteriormente, este estudo tem por finalidade aprofundar a análise genética de regiões regulatórias do miR-146a, a fim de oferecer mais detalhes sobre a associação do miR-146a e a hanseníase. Por este motivo, selecionamos 2 SNPs localizados na região promotora do miR-146a. Os polimorfismos se encontram à montante da região de início da transcrição (TSS, do inglês *transcription start site*), localizados à 8 kb e 15 kb, rs2431099 (A>G) e rs2431697 (C>T), respectivamente (figura 10).

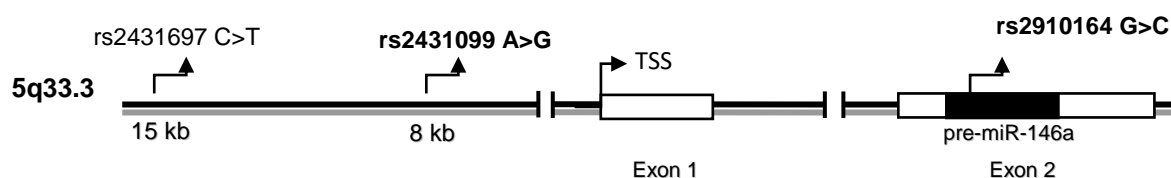


Figura 10: Representação esquemática do gene miR-146a e a localização dos polimorfismos estudados. Os SNPs escolhidos estão localizados na região promotora putativa do gene e distam 8kb (rs2431099) e 15kb (rs2431697) à montante da região de início da transcrição (TSS). O gene é composto por dois éxons e o 2º éxon hospeda a fita pre-miR-146a.

Brevemente, as amostras foram amplificadas por qPCR utilizando-se os ensaios Taqman respectivos para a realização da discriminação alélica¹. Na seção anterior, estudamos a associação genética do miRSNP-146a rs2910164 (G>C) localizado na fita precursora do miRNA, mais precisamente na região que dará origem a fita passageira ou miR-146a*. Mostramos que este polimorfismo influencia a expressão do miRNA maduro, onde o provável mecanismo pode ser explicado pela interferência no processamento do pre-miRNA, ou até mesmo do pri-miRNA. Nossos resultados mostram que a presença do alelo C está associada com maiores níveis de expressão do miR-146a e, conseqüentemente, menores níveis de TNF- α . Outros trabalhos na literatura também fizeram esta abordagem, alcançando, entretanto, resultados diferentes. Estes relatam que o alelo G estaria associado com maiores níveis de expressão do miRNA maduro. Contudo, não sabemos se outros polimorfismos ao longo deste gene também poderiam influenciar a sua regulação/expressão.

Inicialmente, as frequências alélicas e genotípicas destes SNPs foram determinadas na população de controles. A partir destas frequências foi observado que ambos os polimorfismos se encontram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (rs2431099: $\chi^2 = 1.8$, $p = 0.181$; e, rs2431697: $\chi^2 = 0.61$, $p = 0.44$). Em seguida, foi realizado um teste de desequilíbrio de ligação LD) o que mostrou que estes SNPs estão em LD, $r^2 = 0,79$ ($p = 2,2 \times 10^{-16}$), mas não com o SNP rs2910164 ($r^2 = 0.006$ e $r^2 = 0.009$; com relação ao rs2431099 e rs2431697, respectivamente). Em virtude desta alta correlação de LD, escolhemos apenas um dos polimorfismos, aquele localizado à 8 kb de distância do TSS (rs2431099), para prosseguir com as análises de associação genética.

Através do modelo de regressão logística, foram realizadas comparações das frequências genotípicas e alélicas, entre casos e controles, a fim de se estimar a *odds ratio* (OR) e p-valor.

¹ A população estudada bem como a metodologia empregada na análise de caso-controle não difere daquelas aplicadas no artigo “Pre-miR-146a (rs2910164 G>C) Single Nucleotide Polymorphism Is Genetically and Functionally Associated with Leprosy”, apresentado na seção anterior. Portanto, para facilitar a leitura e a fluidez da tese, elas não foram repetidas na seção de metodologia. Os resultados aqui descritos serão discutidos ao final da tese, no capítulo de discussão (Capítulo IV, seção 1.1), em conjunto com todos os dados aqui apresentados.

Desta forma, a OR foi calculada para medir a associação à hanseníase *per se*. Valores de OR acima de 1 indicam susceptibilidade à doença, valores abaixo de 1 indicam proteção e, finalmente, valores de OR iguais a 1 indicam a ausência de associação. Para todas as análises, utilizamos um intervalo de confiança (IC) de 95%. Os resultados obtidos estão resumidos na tabela 5 a seguir. Foram analisados um total de 837 indivíduos, estratificados em 397 controles e 440 pacientes. As frequências dos alelos A e G foram, respectivamente, 0,52 e 0,48, na população de casos e 0,51 e 0,49 na população de controles. Os valores de OR encontrados (~ 1) indicam a ausência de associação desta variante à hanseníase *per se*, antes e após o ajuste para as co-variáveis sexo e etnia. Igualmente, através das comparações tanto genóticas quanto dos carreadores do alelo de menor frequência, também não foi observado nenhum tipo de associação à hanseníase *per se*. Posteriormente foi realizada uma análise de associação de haplótipos entre este polimorfismo (rs2431099) e o anteriormente estudado (rs2910164). O haplótipo G (rs2910164) / A (rs2431099) foi tomado como base para as comparações. Como pode ser visto na tabela 6, os haplótipos contendo o alelo C permanecem associados à hanseníase na mesma direção, ou seja, risco. Entretanto, apenas a combinação C / G permaneceu associada de forma significativa antes (OR = 1,86, p = 0,003) e após a correção (OR = 1,79; p = 0,007) para as co-variáveis sexo e etnia.

Tabela 5: Análise de associação entre o miRSNP-146a 8kb (rs2431099) e a Hanseníase *per se*

Polimorfismo	Genótipo/ alelo	Caso	Controle	OR [IC (95%); p-valor]	OR [IC (95%); p-valor]*
Mir-146a 8kb TSS (rs2431099)	AA ^b	104 (0,26)	105 (0,26)	-	-
	AG	203 (0,51)	235 (0,52)	0,85 (IC= 0,6 - 1,18; p=0,34)	0,85 (IC= 0,6 - 1,2; p= 0,36)
	GG	90 (0,23)	100 (0,22)	0,92 (IC= 0,6 - 1,36; p= 0,68)	1,01 (IC= 0,67 - 1,53; p= 0,96)
	Total	397	440		
	Alelo A ^b	411 (0,52)	445 (0,51)	-	-
	Alelo G	383 (0,48)	435 (0,49)	0,96 (IC= 0,73 - 1,26; p=0,76)	1,0 (IC= 0,75 - 1,33; p=0,99)
	Carreadores- G	293	335	1,03 (IC= 0,74 - 1,4; p= 0,88)	1,3 (IC= 0,8 - 1,6; p= 0,5)

*Ajustado para sexo, idade e etnia ^bGenótipo ou alelo de referência. P-valor global: 0,62.

Tabela 6: Análise de associação haplotípica do gene miR-146a (rs2910164/rs2431099) com a Hanseníase *per se*

Haplótipos	Frequência		Associação à Hanseníase <i>per se</i>	
	Caso	Controle	OR [IC (95%); p-valor]	OR * [IC (95%); p-valor]
G / A ^b	0,33	0,39	-	-
G / G	0,30	0,35	0,97 (CI= 0,72 - 1,32; p= 0,87)	0,99 (IC= 0,73 - 1,36; p=0,97)
[§] C / G	0,18	0,14	1,32(IC= 0,94 - 1,86; p= 0,11)	1,35 (IC= 0,95 - 1,92; 0,097)
[§] C / A	0,19	0,11	1,86 (IC= 1,24 - 2,79; p= 0,003)	1,79 (IC= 1,78 - 2,73; p=0,007)

*Ajustado para sexo, idade e etnia. ^bHaplótipo de referência. [§]Alelo previamente associado à risco.

3. Estudo funcional do gene miR-146a durante na infecção de macrófagos murinos pelo *Mycobacterium leprae*

O miR-146a tem sido descrito como um importante regulador da imunidade inata. O número de evidências acumuladas sobre o envolvimento do miR-146a na hanseníase não nos deixou dúvidas sobre a necessidade de aprofundar este estudo. Além dos nossos resultados genéticos com o polimorfismo rs2410164, outro trabalho mostrou que este miRNA está sobreexpresso em biópsias de pacientes MB, embora os autores não tenham explorado este resultado com mais detalhes (96). Dados referentes a outras micobactérias, por exemplo *M. bovis* (142) e *M. avium* (143), confirmam a importância deste miRNA durante infecções micobacterianas. Portanto, esta etapa da tese foi dedicada ao estudo funcional do miR-146a durante a infecção pelo *M. leprae*. Decidimos por uma abordagem de perda de função do gene utilizando linhagens de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para o gene do miR-146a². O efeito da ausência deste gene nos camundongos nocautes já foi previamente descrito através de um modelo de desafio *in vivo* com inoculação de LPS. Nestes animais, foi possível observar o aumento dos níveis séricos de TNF- α e IL-6, explicado pelo aumento dos níveis de IRAK1 e TRAF6, moléculas sinalizadoras e reguladoras da via TLR/TNF α . A ausência deste miRNA também acarretou no desenvolvimento de tumores associados à mieloproliferação (121).

²A metodologia está descrita no Capítulo I, seção 9.1 até 9.13. Os resultados serão discutidos em conjunto com os dados genéticos, e será apresentado no capítulo de discussão (Capítulo IV, seção 1).

3.1 O *M. leprae* induz a expressão do miR-146a em macrófagos murinos

A ativação de TLR pode levar à expressão de diferentes miRNAs, dentre eles o miR-146a. Este efeito pode ser conseguido tanto pelo uso de ligantes de TLR1/2, como é o caso do Pam3CSK4, um composto sintético que mimetiza a porção amino terminal de lipopeptídeos bacterianos, quanto pela ativação do TLR4 através do LPS (137). Nós demonstramos que a infecção de células THP-1 pelo *M. leprae* leva a um aumento da expressão deste miRNA e que sua expressão está presente em amostras clínicas de pele e nervos de pacientes. No sentido de aprofundar o entendimento do papel deste miRNA, buscamos uma abordagem de perda de função com o uso de macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 nocautes para o gene do miR-146a. Foi demonstrado por Boldin e colaboradores (2011) que este miRNA é amplamente expresso em diversas células do sistema imune murino, tais como linfócitos, macrófagos e células dendríticas estimuladas por ligantes de TLR. Por outro lado, o miR-146b possui sua expressão um pouco mais restrita, não estando presente, por exemplo, em células da medula óssea e células originadas a partir deste tecido (dados não publicados do mesmo autor). Assim, a escolha do modelo de macrófagos derivados de medula óssea provenientes de camundongos miR-146a^{-/-} não teria seu efeito mascarado pela presença do miR-146b.

Para validarmos nosso modelo de estudo, testamos o efeito de diferentes cargas bacilares na expressão deste miRNA no tempo de 24 h. Conforme esperado, foi observado um efeito MOI dependente de expressão, tendo nas MOI de 50:1 e 100:1 os maiores níveis de indução da expressão do miR-146a, e ausência de efeito na MOI de 10:1 (dados não mostrados). A partir deste resultado, a MOI de 100:1 passou a ser utilizada nos outros experimentos. Assim, os BMDM foram infectados com *M. leprae* vivo por diferentes intervalos de tempo (6, 12, 24 e 48 h) usando a MOI de 100:1. A análise dos dados evidenciou que o pico de expressão do miR-146a ocorre no tempo de 24h e se mantém até o tempo de 48 h (figura 11).

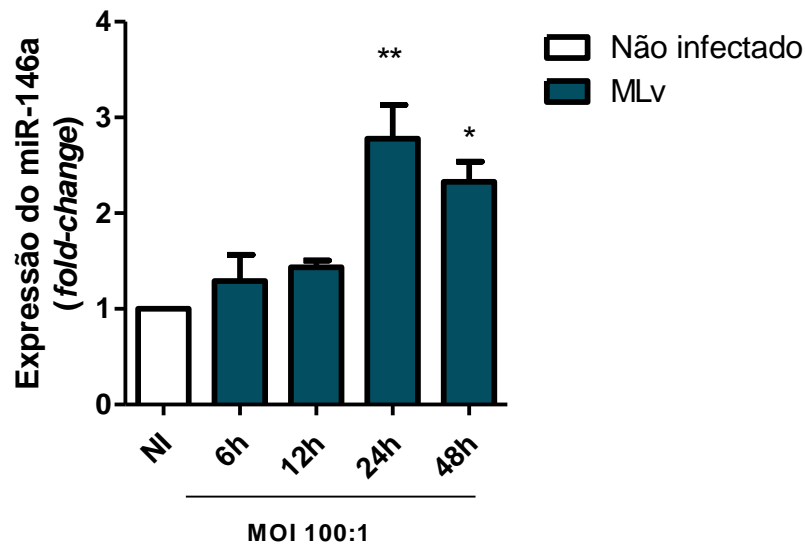


Figura 11: Cinética de expressão do miR-146a em BMDM infectados com *M. leprae*. Os BMDM miR-146a^{+/+} (n = 3) foram infectados com *M. leprae* viável (MLv) por diferentes intervalos de tempo. A expressão do miR-146a foi avaliada por RT-PCRq e normalizada pelo gene Sno234. Para determinação do *fold-change*, o grupo experimental NI (não infectado) foi utilizado como base. Os dados representam a média ± erro padrão da média. Modelo *one-way* ANOVA (teste F), pós-teste Tukey, **p = 0,0034; *p < 0,05.

3.2 A viabilidade dos macrófagos murinos não é alterada pela infecção com *M. leprae*

Um estudo anterior mostrou que o *M. leprae* viável não induz apoptose em macrófagos murinos. Porém, a exposição destas células à bactéria irradiada causou 40% de apoptose (44). Em virtude da alta MOI utilizada no modelo de infecção do presente estudo, buscamos confirmar a viabilidade dos BMDM ao longo do curso de infecção experimental. Para abordar esta questão, BMDM foram infectados por *M. leprae* (MOI 100:1) por 24 e 48 h e, ao final deste período, a viabilidade dos macrófagos foi avaliada de acordo com a capacidade celular em reduzir o composto MTS em formazan. Nossos resultados mostram que os macrófagos de ambos os genótipos se mantiveram viáveis ao longo de 24 h (figura 12) e 48 h (dados não mostrados).

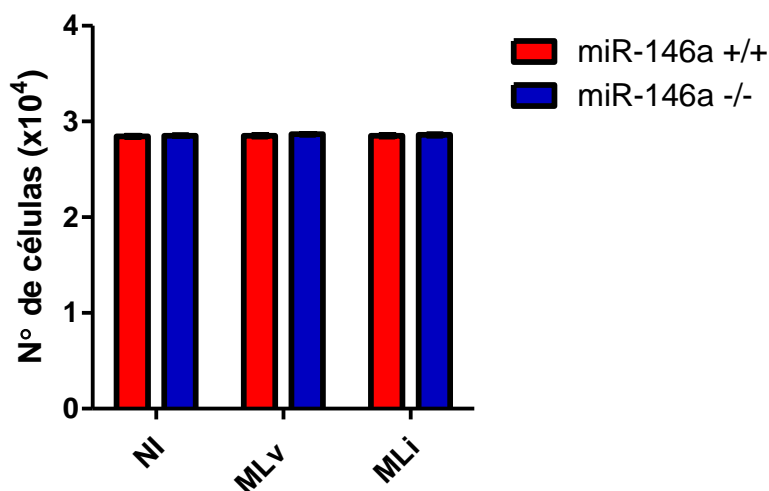


Figura 12: Viabilidade de BMDM infectados com *M. leprae* vivo e irradiado. Os BMDM miR-146a^{+/+} (n = 3) e miR-146a^{-/-} (n = 2) foram infectados com *M. leprae* vivo (MLV) ou irradiado (MLi) na MOI de 100:1, por 24 h. Após este período, foi adicionado MTS e a produção de formazan foi adquirida na densidade óptica de 490 nm. O experimento foi realizado com três replicatas técnicas e os dados representam a média \pm erro padrão da média. Modelo *two-way* ANOVA (teste F).

3.3 A expressão do miR-146a depende da viabilidade do *M. leprae*

Sabendo que o modelo de BMDM é aplicável ao objetivo do nosso estudo, prosseguimos as análises no sentido de comparar o efeito de exposição destas células aos bacilos viáveis e não viáveis. Assim, os BMDM foram expostos ao *M. leprae* irradiado (100:1) e ao bacilo viável (MOI 10:1 e 100:1) (figura 13) por 24 h. Os níveis do miR-146a se mostraram aumentados apenas nas células infectadas com *M. leprae* vivo na MOI de 100:1. A exposição dos macrófagos ao bacilo não-viável, mesmo usando a mais alta MOI, não alterou a expressão deste miRNA. Estes dados estão de acordo com nossos dados prévios no modelo de THP-1, onde apenas o bacilo vivo foi capaz de modular a expressão do miR-146a.

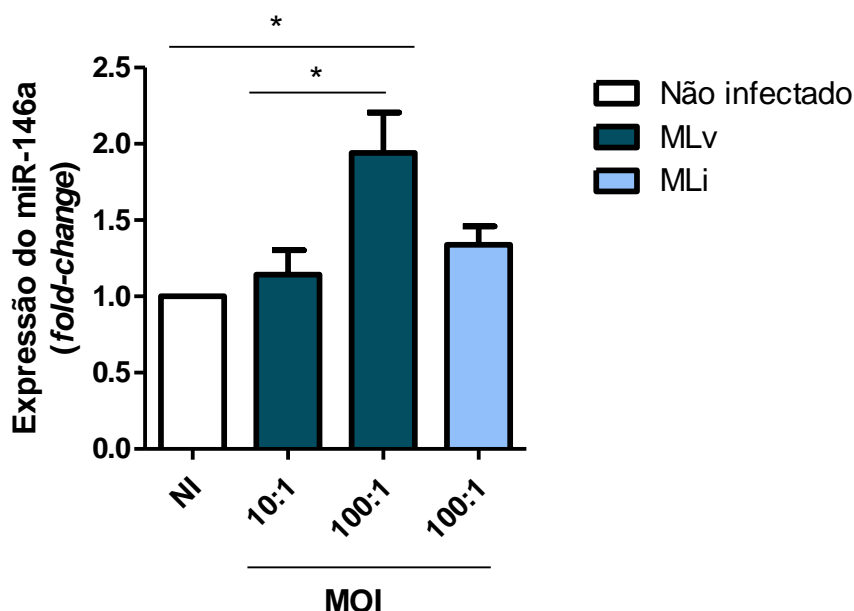


Figura 13: Efeito da viabilidade do *M. leprae* na expressão do miR-146a em BMDM infectados. Os BMDM miR-146a^{+/+} (n= 4) foram infectados com *M. leprae* viável (MLv) e irradiado (MLi) com diferentes MOI por 24 h. A expressão do miR-146a foi avaliada por RT-PCRq e normalizada pelo gene sno234. Para determinação do *fold-change*, o grupo experimental NI (não infectado) foi utilizado como base. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Modelo *one-way* ANOVA (teste F), pós-teste Tukey, *p < 0,05.

3.4 Macrófagos miR-146a^{-/-} expressam maiores níveis de TNF- α após infecção pelo *M. leprae*

O miR-146a tem sido implicado na modulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-6 (121). A ativação de receptores TLR1/2 promove a síntese de TNF- α , via IRAK1/TRAF6/NF- κ B. Além disso, este mesmo fator de transcrição foi descrito como mediador da expressão do miR-146a. Sendo assim, a síntese do miR-146a pode contribuir para a redução da síntese de TNF- α pela regulação negativa das moléculas adaptadoras IRAK1/TRAF6. Por conseguinte, avaliamos o envolvimento do miR-146a na produção desta citocina em BMDM infectados pelo *M. leprae*, através de uma cinética de infecção que variou de 6, 12, 24 a 48 h. Para este fim, foi realizado um estudo comparativo utilizando células provenientes de camundongos miR-146a^{+/+} e nocautes miR-146a^{-/-}. De modo geral, a cinética nos permitiu determinar que a infecção de macrófagos pelo *M. leprae* (MOI 100:1) culminou na expressão do TNF- α no tempo de 6 h de infecção, para ambos os genótipos (figura 14). Em contrapartida, comparados às células selvagens, macrófagos deficientes para o gene miR-146a apresentaram uma maior expressão de TNF- α quando da infecção pelo bacilo viável apenas com a maior MOI (100:1), não sendo observada diferença significativa na MOI 10:1 (figura 15A). Ao passo que, a exposição ao bacilo irradiado resultou num efeito menos pronunciado tanto nos níveis de expressão do TNF- α quanto na diferença entre as células nocaute e selvagem (figura 15B). Estes dados mostram que o controle da expressão de RNAm de TNF- α pelo miR-146a, como indica a literatura, também ocorre durante a infecção pelo *M. leprae* ou estímulo com *M. leprae* irradiado, mas o efeito da regulação de TNF- α via *M. leprae* irradiado parece apenas parcialmente dependente de miR-146a. Ainda, não foi possível detectar a presença de TNF- α no sobrenadante destas células (método de ELISA) em nenhum dos tempos de infecção testados o que sugere algum mecanismo pós-traducional de regulação.

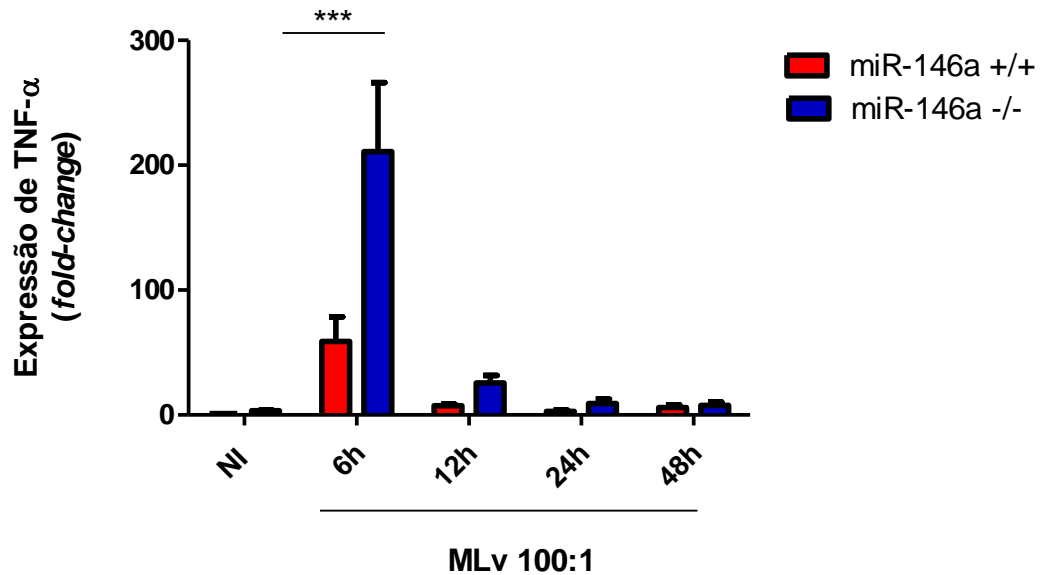
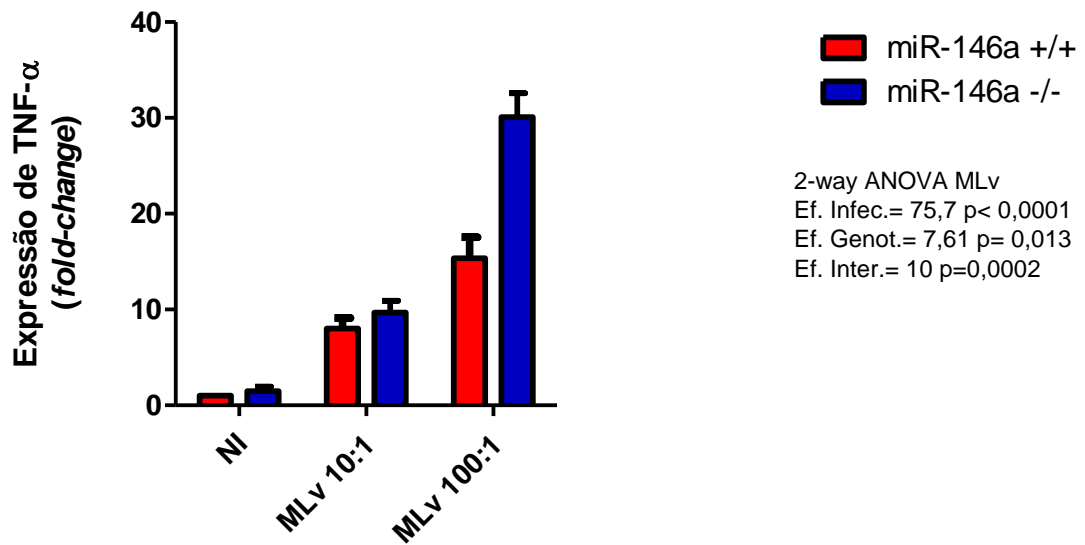


Figura 14: Cinética da expressão de TNF- α em BMDM infectados com *M. leprae*. Cinética de infecção dos BMDM miR-146a^{+/+} (n = 3) e miR-146a^{-/-} (n = 4) com *M. leprae* viável (MLv) com a MOI 100:1. A expressão de TNF- α foi avaliada por RT-PCRq e seus valores de expressão foram normalizados pelo gene Rn18. Para a determinação *fold-change* (unidades arbitrárias), o grupo experimental NI (não infectado) miR-146a^{+/+} foi utilizado como base. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Foram ajustados dois modelos *one-way* ANOVA (teste F), de acordo com cada genótipo, e seguidos do pós-teste Tukey. Para todas as comparações, o grupo de 6 h foi significativamente diferente dos demais.

A



B

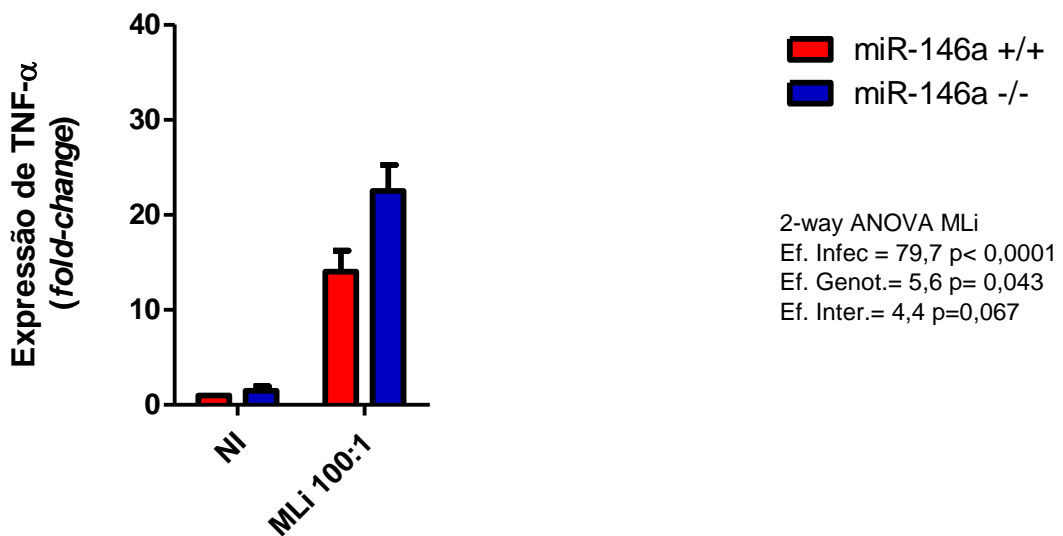


Figura 15: Expressão de TNF- α em BMDM infectados com *M. leprae*. Infecção de BMDM miR-146a^{+/+} (n = 4) e miR-146a^{-/-} (n = 4) com (A) MLv utilizando as MOI de 10:1 e 100:1 e (B) *M. leprae* irradiado (MLi) na MOI de 100:1, por 6 h. A expressão de TNF- α foi avaliada por RT-PCRq e seus valores de expressão foram normalizados pelo gene Rn18. Para a determinação do *fold-change* (unidades arbitrárias), o grupo experimental NI (não infectado) miR-146a^{+/+} foi utilizado como base. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Foi ajustado o modelo *two-way* ANOVA (teste F), um para cada análise. Ambos seguidos de pós-teste de Bonferroni. Ef. Infec = efeito da infecção, Ef. Genot.= efeito do genótipo, Ef. Inter.= efeito da interação entre infecção e genótipo.

3.5 A viabilidade do *M. leprae* é dependente da expressão do miR-146a

A maior produção de TNF- α está relacionada com o controle do crescimento de patógenos intracelulares, por conseguinte sua maior produção pode levar ao *killing* micobacteriano. Sabendo-se que há diferença na produção desta citocina de acordo com a presença/ausência do miR-146a, realizamos um estudo de viabilidade do *M. leprae* em BMDM infectados com a bactéria (MOI 100:1) após 24 h. A viabilidade do bacilo foi avaliada através da técnica de PCR quantitativo descrita por Martinez e colaboradores (2009), com adaptações. Em resumo, a análise consiste na detecção dos níveis de 16S RNAr normalizados pelos valores de detecção do DNA deste mesmo gene. A redução da viabilidade do *M. leprae* se correlaciona de forma direta com a redução dos níveis de RNA do gene 16S, todavia, os níveis de DNA permanecem estáveis. Conforme esta análise, nossos dados mostram uma redução de 66,5% da viabilidade do *M. leprae* em macrófagos nocaute para miR-146a quando comparada com a viabilidade em macrófagos selvagens, indicando que a presença do miR-146a é fundamental para a viabilidade do bacilo (figura 16).

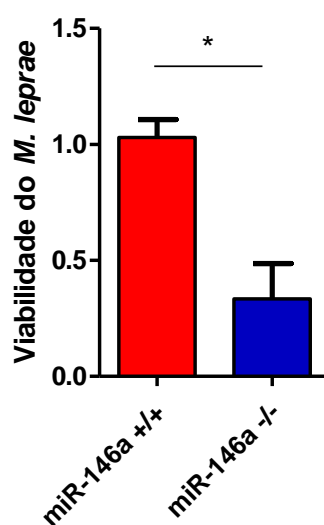


Figura 16: Viabilidade molecular do *M. leprae* em macrófagos murinos. Os BMDM miR-146a^{+/+} (n = 5) e miR-146a^{-/-} (n = 6) foram infectados com *M. leprae* (100:1) por 24 h. Em seguida a viabilidade molecular do *M. leprae* foi determinada por RT-PCRq através da razão entre o cDNA 16S RNAr e o DNA 16S RNAr. Os dados representam a média \pm erro padrão da média. Teste Mann Whitney, *p = 0,035.

3.6 O *M. leprae* não induz a expressão de NO em macrófagos murinos

Ao observarmos que a viabilidade do *M. leprae* depende da presença do miR-146a, buscamos determinar quais seriam os mecanismos envolvidos no controle da viabilidade micobacteriana. Já foi previamente descrito que os macrófagos miR-146a^{-/-} estimulados com LPS produzem mais óxido nítrico (NO) do que os macrófagos selvagens (121). Por este motivo, analisamos a produção de NO dos BMDM frente a infecção com o *M. leprae* pós 12, 24 e 48 h de infecção. De fato, foi verificada uma maior produção de NO pelos macrófagos miR-146a^{-/-} estimulados por 24 h com LPS (10 ng/mL), porém não significativa. A produção de NO frente ao *M. leprae* não foi relevante para o controle da viabilidade micobacteriana (figura 17), independente do tempo de estímulo e genótipo celular. Também não foi observada a produção de NO pelos macrófagos não infectados.

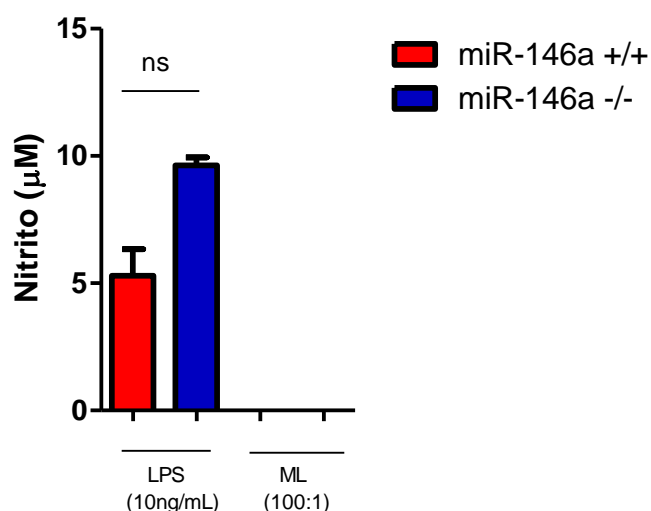


Figura 17: Produção de óxido nítrico em BMDM estimulados com LPS e *M. Leprae*. Os BMDM miR-146a^{+/+} e miR-146a^{-/-} foram estimulados com LPS (10 ng/mL) e *M. leprae* viável (100:1) por 24 h. A produção de NO foi avaliada através da quantificação de nitrito presente no sobrenadante pelo método de Griess. Os dados representam a média \pm o erro padrão da média. Teste Mann Whitney, ns = diferença de médias não significativa.

3.7 Macrófagos nocaute apresentam maior expressão de LC-3b quando infectados

A autofagia constitui um importante mecanismo de eliminação de bactérias intracelulares, dentre elas *Salmonella*, *Listeria* e *Mycobacteria* (144). A conversão da proteína citosólica LC3b-I (ou ATG8) na sua forma transmembrana lipidizada LC3b-II, localizada na membrana dos autofagossomos, consiste num mecanismo marcante deste processo. Por conseguinte, a conversão de LC3b-I em LC3b-II é normalmente utilizada como parâmetro para verificar a ativação da via autofágica (145). Sabendo que a viabilidade do *M. leprae* depende da presença do miR-146a e que este fenômeno não se correlaciona com a produção de NO, tivemos como objetivo avaliar se a ativação da via autofágica explicaria a redução da viabilidade da bactéria. Deste modo, os macrófagos miR-146a^{+/+} e miR-146a^{-/-} foram infectados ou não com o *M. leprae* viável (100:1) durante 6 horas. Após este período, a conversão entre as formas citosólica e lipidizada foi avaliada por *western blot*. Como pode ser observado na figura 18, alterações nos níveis de LC3b-II não são detectáveis. Contudo, a infecção pelo *M. leprae* resultou num aumento da expressão de LC3b-I nos macrófagos selvagens, mas sobretudo nos macrófagos nocaute. Além disso, também foi possível observar um aumento dos níveis basais desta proteína nos macrófagos nocautes não infectados. Estes resultados sugerem que esta via pode estar desregulada nos macrófagos miR-146a^{-/-}.

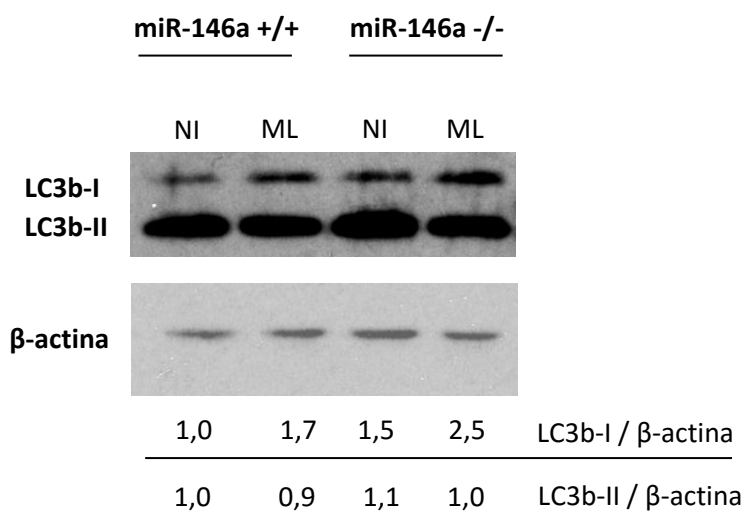


Figura 18: Expressão de LC3-b em BMDM infectados pelo *M. leprae*. Os BMDM miR-146a^{+/+} e miR-146a^{-/-} foram infectados com *M. leprae* viável (100:1) por 6 h. Após este período, as células foram lisadas, e 24 µg de proteínas foi submetido à eletroforese. A membrana foi imunomarcada com anticorpo anti-LC3b, seguido de *strip* e imunomarcagem com anticorpo anti-actina. A densitometria das bandas foi analisada no *software* Image J. Os resultados expressam a relação LC3b-I/β-actina e LC3b-II/β-Actina. Os dados são representativos de 2 experimentos similares e independentes.

Capítulo III – EXPRESSÃO DE MICRORNAS NO SANGUE DE PACIENTES E CONTATOS: IDENTIFICAÇÃO DE NOVAS VIAS REGULATÓRIAS

Um programa de poliquimioterapia para a eliminação da hanseníase é utilizado mundialmente refletindo na redução da prevalência, entretanto, pouco impacto foi observado com relação a incidência da doença. Atualmente ferramentas de diagnóstico não conseguem distinguir infecções subclínicas ou latentes de doença ativa, permitindo a manutenção da cadeia de transmissão. Os pacientes não tratados são potencial reservatório dos bacilos e seus contatos domiciliares têm o risco mais elevado de desenvolver a doença. O acompanhamento clínico da população com maior exposição pode ter como resultado um diagnóstico precoce, quebrando o ciclo de exposição-infecção dentro daquele núcleo familiar.

Uma assinatura de miRNAs em hanseníase pode ser útil como um preditor de adoecimento/diagnóstico e um apoio para a estratégia de tratamento. Uma quantidade convincente de evidências mostra a importância dos miRNAs como biomarcadores em diferentes tipos de fluidos. Características como especificidade, resistência intrínseca à atividade de RNases e a capacidade de refletir uma condição patológica em particular, elege-os candidatos confiáveis para o papel de biomarcadores não-invasivos. Até o momento, nenhum estudo investigou um perfil de miRNA no sangue de pacientes com hanseníase. Neste trabalho, procurou-se avaliar a expressão de miRNAs provenientes de sangue total de pacientes na tentativa de identificar vias e processos metabólicos. Para este efeito, foram selecionados 93 miRNAs candidatos a fim de se investigar a expressão dos mesmos em sangue total de pacientes (paucibacilares e multibacilares), contatos domiciliares de pacientes MB e indivíduos saudáveis. Deste modo, foi realizada uma comparação no perfil de expressão de miRNAs de cada grupo e posteriormente os miRNAs diferencialmente expressos foram selecionados para a identificação de sua rede de interação miRNA-RNAm *in silico*.

Do painel de 93 alvos, 47 foram analisados e os demais foram considerados com detecção não satisfatória/não expressos. Do total de 95 amostras (a nonagésima sexta foi o controle negativo da PCR), 93 permaneceram ao longo das análises, entretanto, nem todas tiveram

sinal de amplificação para os 47 miRNAs analisados. A lista dos 47 miRNAs amplificados está discriminada a seguir:

hsa-let-7b	hsa-miR-15b	hsa-miR-26a
hsa-let-7c	hsa-miR-16	hsa-miR-29c
hsa-let-7d	hsa-miR-17	hsa-miR-30a-5p
hsa-miR-103	hsa-miR-181b	hsa-miR-30b
hsa-miR-106a	hsa-miR-184	hsa-miR-30c
hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-185	hsa-miR-30e-5p
hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-192	hsa-miR-320
hsa-miR-125b	hsa-miR-196a	hsa-miR-34a
hsa-miR-140	hsa-miR-197	hsa-miR-423-5p
hsa-miR-142-3p	hsa-miR-19b	hsa-miR-451a
hsa-miR-142-5p	hsa-miR-206	hsa-miR-484
hsa-miR-145	hsa-miR-208	hsa-miR-576-3p
hsa-miR-146a	hsa-miR-20a	hsa-miR-638
hsa-miR-146b	hsa-miR-210	hsa-miR-92a
hsa-miR-150	hsa-miR-223	hsa-miR-93
hsa-miR-155	hsa-miR-25	

1. MiRNAs diferencialmente expressos no sangue de pacientes e contatos intradomiciliares

Após a seleção de 12 amostras de pacientes MB e 13 amostras de pacientes PB, foi realizado um perfil de expressão de 93 miRNAs. Os dados obtidos indicam o envolvimento de 5 miRNAs que foram diferencialmente expressos (figura 19), dentre eles, o miR-15b foi altamente significativo ($p = 0,009$) tendo sua expressão aumentada no grupo dos multibacilares. Em contrapartida, o miR-30e-5p foi identificado como mais expresso no grupo de paucibacilares ($p = 0,048$). Além destes, foram identificados 3 miRNAs com p-valor sugestivo, são eles: miR-25, miR-27 e miR-196a.

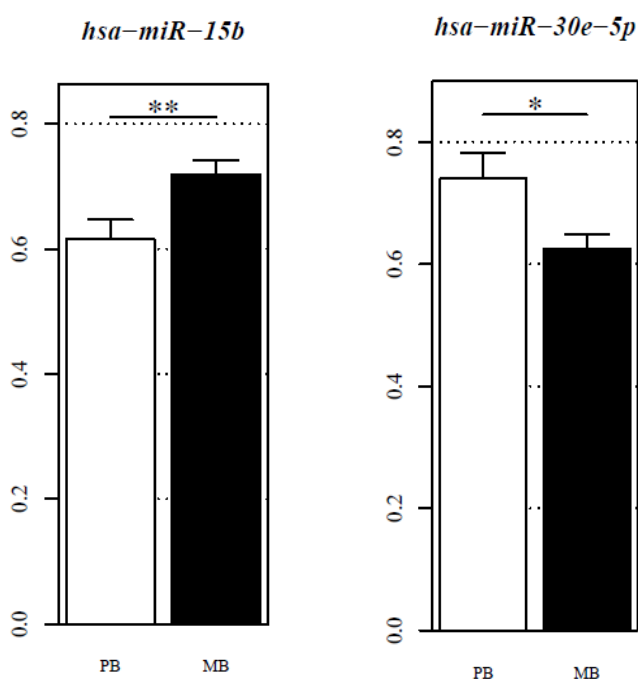


Figura 19: Expressão de miRNAs de sangue periférico de pacientes paucibacilares e multibacilares. O RNA total foi extraído com o *kit* específico para sangue coletado em tubos *PaxGene*. Após análise de qualidade e quantificação dos miRNAs no Bioanalyzer, foi realizada a RT multiplex seguido de qPCR Biomark (Fluidigm). O gráfico mostra os valores de expressão normalizados do miR-15b para os grupos PB (n = 9) e MB (n = 11) e do miR-30e-5p para os grupos PB (n = 3) MB (n = 7). As barras representam média \pm erro padrão da média; **p-valor $\leq 0,01$ (altamente significante); *p-valor $\leq 0,05$ (significantes).

Ao realizarmos uma comparação entre pacientes MB e contatos intradomiciliares (HHC), que representam a população mais susceptível à hanseníase, foi possível identificar 3 miRNAs diferencialmente expressos (figura 20). Dentre eles, o miR-30e-5p ($p = 0,01$) foi classificado como altamente significativos e se encontra sobreexpresso nos contatos. Ainda foi possível identificar os miR-196a e miR-15b, como significativamente ($p < 0,05$) sobreexpresso e reprimido em contatos, respectivamente. Dentre os miRNAs com p-valor sugestivo, destacam-se: miR-16, miR-206, miR-484, miR-30b e miR-210. A comparação entre pacientes PB e contatos intradomiciliares não revelou nenhum miRNA diferencialmente expresso, apenas indicou dois miRNAs sugestivos, o miR-17 (reprimido em PB) e o miR-29c (induzido em PB).

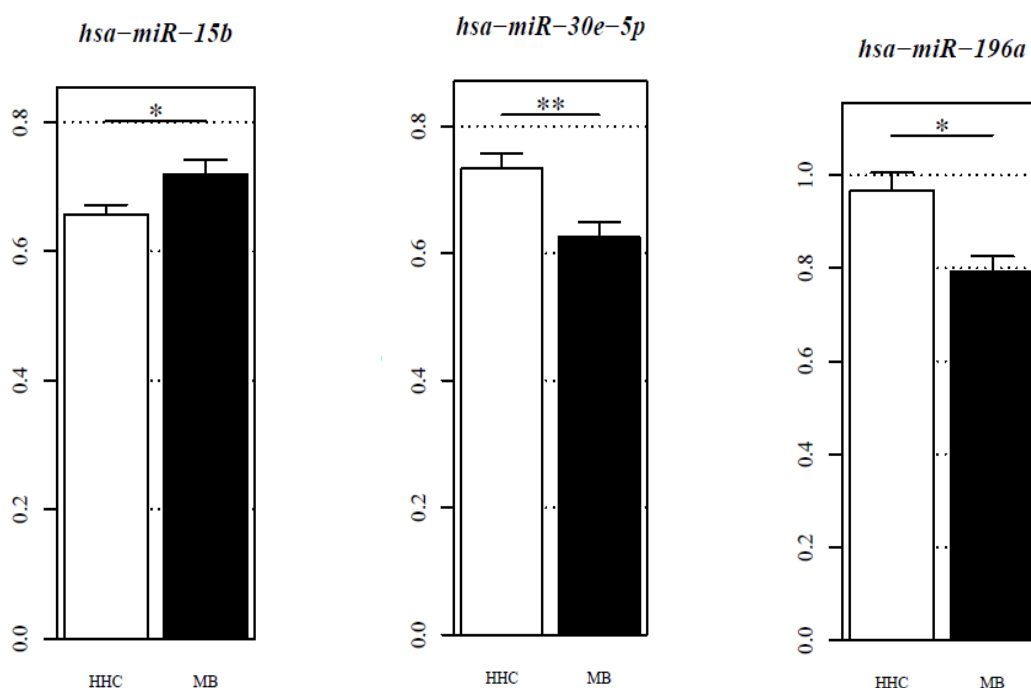


Figura 20: Expressão de miRNAs de sangue periférico de pacientes multibacilares e contatos intradomiciliares. O RNA total foi extraído com o *kit* específico para sangue coletado em tubos *PaxGene*. Após análise de qualidade e quantificação dos miRNAs no Bioanalyzer, foi realizada a RT multiplex seguido de qPCR Biomark (Fluidigm). O gráfico mostra os valores de expressão normalizados do miR-15b para os grupos HHC (n = 37) e MB (n = 11); do miR-30e-5p para os grupos HHC (n = 16) e MB (n = 7) e do miR-196a para os grupos HHC (n = 13) e MB (n = 4). As barras representam média ± erro padrão da média; **p-valor ≤ 0,01 (altamente significante); *p-valor ≤ 0,05 (significantes).

A comparação entre os grupos MB, PB e contatos intradomiciliares apontou apenas dois miRNAs diferencialmente expressos (figura 21). O miR-15b se manteve significativamente diferente entre os grupos MB e PB ($p = 0,032$), assim como o miR-30e-5p com relação à comparação MB e contatos intradomiciliares ($p = 0,047$). Não foi observado nenhum miRNA diferencialmente expresso na comparação entre PB e contatos intradomiciliares.

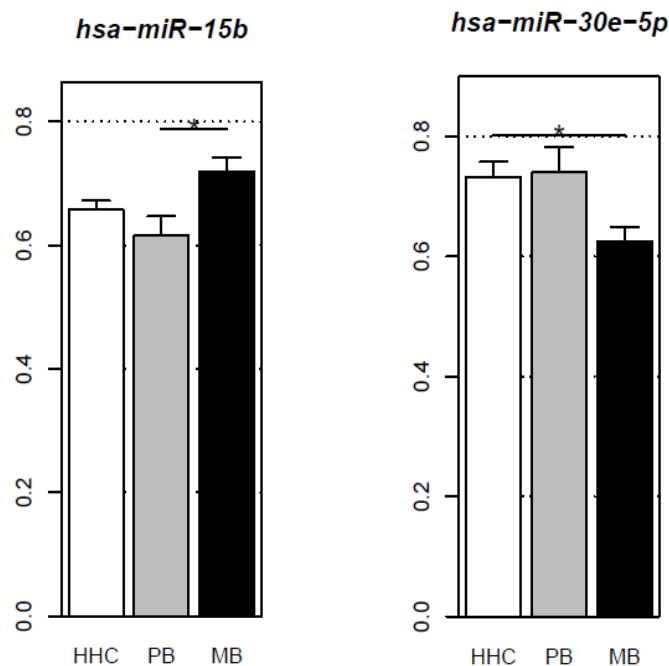


Figura 21: Expressão de miRNAs de sangue periférico de contatos, paciente paucibacilares e multibacilares. O RNA total foi extraído com o *kit* específico para sangue coletado em tubos *PaxGene*. Após análise de qualidade e quantificação dos miRNAs no Bioanalyzer, foi realizada a RT multiplex seguido de qPCR Biomark (Fluidigm). O gráfico mostra os valores de expressão normalizados do miR-15b para os grupos HHC ($n = 37$), PB ($n = 9$) e MB ($n = 11$) e do miR-30e-5p para HHC ($n = 16$), PB ($n = 3$) e MB ($n = 7$). As barras representam média \pm erro padrão da média; **p-valor $\leq 0,01$ (altamente significante); *p-valor $\leq 0,05$ (significantes).

Por fim, avaliamos os miRNAs diferencialmente expressos entre o grupo de doentes (PB + MB) e contatos intradomiciliares. A partir desta análise, o miR-484 foi apontado como sobreexpresso em pacientes ($p = 0,034$), assim como o miR-30b, entretanto este último apresentou p-valor sugestivo. Na busca de alvos para o miR-484, apenas dois dos cinco bancos de dados utilizados possuíam predição de alvos disponível, portanto, não será apresentado RNAm-alvos para este miRNA uma vez que ele não se encontra dentro do nosso critério de inclusão.

2. MiRNAs diferencialmente expressos no sangue de pacientes e indivíduos saudáveis

Para estudar a diferença entre pacientes e indivíduos saudáveis, agrupamos os indivíduos MB e PB em um único grupo denominado hanseníase e comparamos com 9 indivíduos saudáveis sem nenhum histórico de hanseníase na família (figura 22). Assim, esta comparação indicou que um único miRNA diferencialmente expresso, o miR-206 ($p = 0,034$), que se encontra reprimido no grupo de pacientes. Também foram identificados dois miRNAs sugestivos, o miR-34a e miR-30b, reprimido e sobre expresso em pacientes, respectivamente.

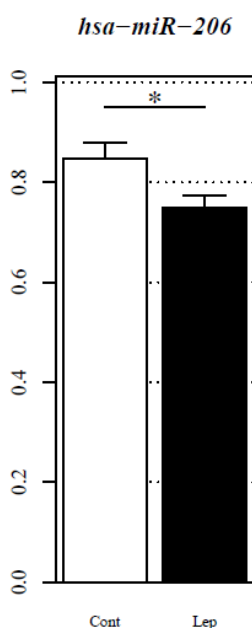


Figura 22: Expressão de miRNAs de sangue periférico de pacientes hanseníase e controles saudáveis. O RNA total foi extraído com o *kit* específico para sangue coletado em tubos *PaxGene*. Após análise de qualidade e quantificação dos miRNAs no Bioanalyzer, foi realizada a RT multiplex seguido de qPCR Biomark (Fluidigm). O gráfico mostra os valores de expressão normalizados de controles (Cont) ($n = 8$) e doentes (Lep = MB, $n = 10$ + PB, $n = 10$). As barras representam média \pm erro padrão da média; **p-valor $\leq 0,01$ (altamente significativo); *p-valor $\leq 0,05$ (significantes).

A seguir, uma tabela (tabela 7) que resume os principais miRNAs encontrados neste estudo e sua condição de expressão nas comparações realizadas.

Tabela 7: Resumo dos miRNAs diferencialmente expressos no sangue de pacientes, contatos e indivíduos saudáveis

<i>miRNA / miRBase</i>	<i>Sequência do miRNA maduro[§] (5' - 3')</i>	<i>Região cromossômica</i>	<i>Condição</i>	<i>Comparação</i>
<i>miR-15b</i> <i>MIMAT0000417</i>	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	3q25.33	Induzido	MB vs PB MB vs HHC
<i>miR-30e-5p</i> <i>MIMAT0000692</i>	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG	1p34.2	Reprimido	MB vs PB MB vs HHC
<i>miR-196a</i> <i>MIMAT0000226</i>	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	17q21.32* 12q.13.13**	Reprimido	MB vs HHC
<i>miR-206</i> <i>MIMAT0000462</i>	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	6p12.2	Reprimido	Lep vs Cont
<i>miR-484</i> <i>MIMAT0002174</i>	UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU	16p13.11	Induzido	Lep vs HHC

§ Em negrito, destaca-se a região de semente
* miR-196a-1: cromossomo 17
** miR-196a-2: cromossomo 12

3. Predição de RNAm-alvos e processos biológicos dos miRNAs diferencialmente expressos

A partir dos miRNAs identificados, foi realizada uma análise de seleção de RNAm-alvos, que foram agrupados em processos biológicos (BPs) – definido como o conjunto de eventos moleculares que fazem parte de um processo/função biológica relativos a uma unidade vital (célula, tecido...) – de acordo com a anotação depositada no *Gene Ontology* (GO). Os BPs aqui apresentados são aqueles com menor p-valor dentre as vias metabólicas mais relevantes para a imunopatogênese. A ontologia gênica de todos os BPs será apresentada na seção de anexos para todos os miRNAs analisados. Nesta seção, estão destacados os achados mais interessantes.

Relativo aos outros miRNAs, apenas o miR-15b se encontra induzido no grupo MB. Deste modo, espera-se que os BPs identificados tenham a sua função reprimida. Para este miRNA, os BPs mais relevantes foram relacionados a eventos celulares, dentre eles, o termo Comunicação Celular (GO0007154) foi o mais representativo, contando com 87 genes. Em seguida, destacaram-se os termos Regulação Positiva de Processos Celulares (GO0048522) e Regulação Negativa de Processos Celulares (GO0048523), conforme a tabela 8.

Os miR-196a e miR-206 figuram entre os miRNAs reprimidos nas condições analisadas, MB e pacientes com hanseníase, respectivamente. Para o miR-196a pode-se destacar o BP Resposta Celular ao Estímulo de Fatores de Crescimento (GO0071363), com o envolvimento de 7 RNAm-alvos putativos (SLC9A6, NRAS, GATA6, COL3A1, COL1A2, CALM3 e ADCY9). Em contrapartida, os principais processos identificados para o miR-206 envolvem o processamento de macromoléculas, são eles: Processos Metabólicos de Proteínas Celulares (GO0044267); Processo de Modificação de Proteínas (GO0036211) e Regulação Positiva de Processos Metabólicos de Macromoléculas (GO0010604), conforme tabela 9.

Tabela 8: Principais processos biológicos e RNAm-alvos potencialmente regulados pelo miR-15b

TERMO DO GO	P-VALOR	TAMANHO DO GO	GENES POR GO
GO0007154; COMUNICAÇÃO CELULAR	7,29 x 10 ⁻⁰⁶	87;5267	TLK1; CLOCK; BAG5 ; CD28 ; TRIP10; SOCS6 ; ACVR2A; CCNT2; ZNF622; CCNE1; SYNJ1; NRP2 ; CD164; MKNK1; DIXDC1; ITGA10; CASR; CUL2; GPR63; YWHAH; VAMP1; SRPR; SMPD1; TSPYL2; BDNF; TGIF2; BCL2L2; PLEKHA1; RAP2C; ARHGAP20; SIPA1L2; PTH; CYP26B1; PRKAR2A; ENAH; UBE2Q1; STRADB; TMEM100; PPP2R1A; PID1; PLXNA2; RNF138; CRIM1; PAFAH1B1; OMG; SMAD7; LRP6; C1QL3; KIF5A; KCNN4; KCNJ2; HTR4; HSPG2; DLL1; SESN1; GLS2; GHR; B4GALT1; LATS2; WIPI2; TAB3; SIRT4; WWC1; LPHN2; RTF1; NLGN1; ATG14 ; CPEB3; RAB11FIP2; ESRRA; AGO4; EDA; SPRED1; AP2A1; ADRB2; CREBRF; RASGEF1B; AKAP11; IL1RAPL1; PRDM4; FERMT2; YWHAQ; PDLIM5; PDIA6; PPIF; TSPAN5; AKT3;
GO0048522; REGULAÇÃO POSITIVA DE PROCESSOS CELULARES	1,00 x 10 ⁻⁰⁴	63;3647	CLOCK; KIF23; CD28 ; ACVR2A; CCNT2; ZNF622; CCNE1; SYNJ1; NRP2 ; DIXDC1; WIBG; TAF15; SEMA6D; BTG2; YWHAH; TBP; TARBP2; SRPR; SMPD1; TSPYL2; BDNF; TGIF2; RAP2C; PTH; CYP26B1; PRKAR2A; STRADB; TMEM100; PPP2R1A; PID1; PLAG1; SUCO; PAFAH1B1; OTX1; MYB; SMAD7; LRP6; KCNN4; KCNJ2; HTR4; HOXA10; DLL1; MAMSTR; GHR; B4GALT1; TAB3; WWC1; RTF1; WAPAL; NLGN1; ATG14 ; CPEB3; ESRRA; DENND6A; EDA; SPRED1; ADRB2; IL1RAPL1; CHEK1; YWHAQ; PDIA6; PPIF; TSPAN5;
GO0048523; REGULAÇÃO NEGATIVA DE PROCESSOS CELULARES	1,04 x 10 ⁻⁰⁴	58;3267	N4BP1; CLOCK; BAG5; SOCS6 ; CD164; DIXDC1; PPM1D; CUL2; SEMA6D; BTG2; YWHAH; TARBP2; STXBP3; SPTBN2; SON; SMPD1; TSPYL2; ATXN2; BDNF; TGIF2; BCL2L2; PLEKHA1; RAP2C; PTH; CYP26B1; PRKAR2A; STRADB; PPP2R1A; PID1; PAFAH1B1; OMG; MYB; MBD1; SMAD7; LRP6; DLL1; SESN1; B4GALT1; LATS2; SIRT4; WWC1; RTF1; WAPAL; CPEB3; EZH1; ESRRA; AGO4; SPRED1; AP2A1; ADRB2; CREBRF; CPEB2; IL1RAPL1; CHEK1; PRDM4; YWHAQ; VAT1; PPIF;

Tabela 9: Principais processos biológicos e RNAm-alvos potencialmente regulados pelo miR-206

TERMO DO GO	P-VALOR	TAMANHO DO GO	GENES POR GO
GO0044267; PROCESSOS METABÓLICOS DE PROTEÍNAS CELULARES	8,98 x 10 ⁻⁰⁶	35;3661	HDAC4; UBE4A ; NRP1 ; MAP4K3; TNKS2; HSP90B1; SMARCA4; SNAI2; WNK3; CPEB1; BDNF; WDR48; SMEK2; KMT2E; OTUD5 ; BCL11A; CDK14; PTPLAD1; UBR5 ; NOTCH3; MYLK; MTX1; JARID2 ; KCTD13; TRIM2 ; EIF1AX; EDN1; SPRED1; RNF38; CREBL2; OSBPL7; MGAT4A; ADAR; CDK9; UST;
GO0036211; PROCESSO DE MODIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	1,21 x 10 ⁻⁰⁵	30;2888	HDAC4; UBE4A ; NRP1 ; MAP4K3; TNKS2; HSP90B1; SMARCA4; SNAI2; WNK3; BDNF; WDR48; SMEK2; KMT2E; OTUD5 ; BCL11A; CDK14; PTPLAD1; UBR5 ; MYLK; JARID2 ; KCTD13; TRIM2 ; EDN1; SPRED1; RNF38; CREBL2; MGAT4A; ADAR; CDK9; UST;
GO0010604; REGULAÇÃO POSITIVA DO PROCESSO METABÓLICO DE MACROMOLÉCULAS	3,68 x 10 ⁻⁰⁵	24;2127	HDAC4; NRP1 ; TNKS2; HSP90B1; SMARCB1; SMARCA4; SNAI2; WNK3; TRA2B; BDNF; KMT2E; BCL11A; PTPLAD1; NCL; MEOX2; JARID2 ; GJA1; KCTD13; EDN1; E2F5; CREBL2; OSBPL7; DDX17; CDK9;

4. Identificação de processos biológicos compartilhados pelo miR-196a e miR-30e-5p

Os miRNAs miR-30e-5p e miR-196a estão reprimidos em pacientes MB quando comparados aos contatos intradomiciliares. A presença de dois ou mais miRNAs regulados na mesma direção, neste caso, negativamente, possibilita a busca por um efeito decorrente da interação entre os mesmos. Desta forma, foi realizada uma análise em conjunto para identificação de processos no GO. Como processos relevantes foram identificados: Resposta Celular ao Estímulo de Fatores de Crescimento (GO0071363), Processo de Desenvolvimento (GO0032502) e Diferenciação Celular (GO0032502).

Dos alvos identificados, apenas um deles é compartilhado com ambos os miRNAs, o BIRC6. Estes miRNAs têm regiões-alvo na 3' UTR que se encontram bem próximas. O miR-196a interage na posição 281-287, enquanto o miR-30e-5p interage na posição 298-304. A interação RNAm-miRNA está representada na figura a seguir (figura 23). Este gene faz parte de dois BPs, Processo de Desenvolvimento (GO0032502) e Desenvolvimento Sistêmico (GO0048731).

BIRC, posição na 3'UTR	Predição de pareamento
Posição 298-304 hsa-miR-30e	<pre> 5' . . . UACCUUAGGAAAGAAUGUUUACU . . . 3' GAAGGUCAGUCCUACAAAUGU </pre>
Position 281-287 hsa-miR-196	<pre> 5' . . . UGCUAUUAAGGGAAACUACCU . . . 3' GGGUUGUUGUACUUUGAUGGAU </pre>

Figura 23: Pareamento entre a região 3'UTR do gene BIRC6 com o miR-30e-5p e miR-196. A sequência superior representa a região 3' UTR e a inferior representa o miRNA. Observa-se um pareamento perfeito entre com os nucleotídeos 2-8 (região de semente) dos miRNAs maduros. Fonte: TargetScan.

Capítulo IV – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

1. Discussão

Os microRNAs vêm sendo descritos como importantes reguladores da expressão gênica, em nível pós-transcricional, atuando em diferentes processos biológicos. A hanseníase é até hoje uma doença desafiadora pois apresenta-se de forma espectral cuja diversidade de manifestações clínicas não pode ser explicada pela variabilidade genética do seu agente etiológico. Diversos estudos têm sido realizados no sentido de identificar marcadores, seja de resistência/susceptibilidade à doença, bem como marcadores que possam ser informativos de adoecimento. Neste sentido, neste estudo foram selecionados miRNAs previamente relacionados com o controle da resposta imune para análises genético-epidemiológicas e moleculares. Os dados aqui apresentados constituem o único estudo sobre miRNAs e hanseníase com este propósito. Assim, no presente trabalho, buscou-se explorar o papel dos miRNAs na hanseníase através de duas abordagens. A primeira delas consistiu em estudar a susceptibilidade genética à hanseníase definindo alguns miRNAs como candidatos. A confirmação de associação do miR-146a (rs2910164) na susceptibilidade a hanseníase em uma população caso-controle, possibilitou a replicação do estudo a partir da utilização de um desenho de associação genética em famílias (TDT), que confirmou a participação do alelo *C* do SNP rs2910164 e o risco de desenvolvimento à hanseníase. Posteriormente, análises foram conduzidas no sentido de entender o papel funcional do miRNA e a variante polimórfica previamente associada à doença. Em seguida, análises em camundongos nocaute possibilitaram a extensão e o aprofundamento do papel de miR-146 na suscetibilidade à hanseníase. A combinação dos dados obtidos nos dois grupos de ensaios é convergente. Os carreadores do alelo *C* do rs2910164 apresentam maior expressão de miR-146a e conseqüentemente menos TNF e maior risco a doença. O oposto pode ser observado no modelo murino: a ausência de miR-146a leva ao aumento de RNAm de TNF e diminuição da viabilidade de *M. leprae* indicando uma grande importância do miRNA-146a na ativação da resposta microbicida ao *M. leprae*.

A segunda abordagem consistiu em selecionar 93 miRNAs e investigar sua abundância em amostras de sangue periférico de pacientes, contatos intradomiciliares e indivíduos saudáveis no sentido de selecionar candidatos a uma assinatura gênica e/ou vias regulatórias. Os dados sugerem que há expressão diferencial de miRNAs no sangue e a confirmação desses dados poderá, futuramente, auxiliar no diagnóstico.

1.1 Estudo de associação genética funcional de miRNAs candidatos à hanseníase: o miR-146a

A análise de associação genética partiu da escolha de 4 polimorfismos localizados em miRNAs candidatos que foram inicialmente analisados através de um modelo caso-controle. Como descrito acima, o alelo *C* do miR-146a foi caracterizado como um marcador associado à susceptibilidade genética na hanseníase através de dois desenhos de estudo de associação genética. A validação do estudo caso-controle deve, idealmente, ser confirmada com estudos de replicação em outras populações independentes ou com outro delineamento. Esta abordagem é importante para excluir a possibilidade de que as diferenças de frequência genotípicas observadas entre casos e controles possam ser em virtude de fatores populacionais intrínsecos (35). Sendo assim, foi utilizado um desenho familiar onde as famílias nucleares foram compostas por pais heterozigotos para o alelo de risco e um filho afetado. A aplicação do TDT permite avaliar se a transmissão do alelo de risco é maior do que a proporção esperada pela herança mendeliana. Os dados revelaram que o alelo de risco *C* foi transmitido 28 vezes enquanto que o alelo controle *G* foi transmitido apenas 13 vezes aos filhos afetados ($p=0,003$). Interessantemente, ao estratificarmos a análise de famílias, o resultado se manteve significativo apenas para o grupo PB. Contudo, o teste de heterogeneidade não significativo mostrou que este resultado pode ser apenas um viés relacionado ao maior número de famílias informativas deste grupo. Em conjunto, estes resultados confirmam que o alelo *C* é uma variante de risco, estando na mesma direção dos dados gerados pelo estudo caso-controle. No entanto, apesar da utilização de dois desenhos de estudo independentes, esta variante foi testada apenas na população do Rio de Janeiro. Assim, é importante que este marcador seja estudado em outras populações a fim de replicar estes dados, tornando a sua associação mais robusta.

A família gênica do miR-146 consiste em apenas dois genes, miR-146a e miR-146b. Em humanos, estes genes se encontram localizados nos cromossomos 5 e 10, respectivamente. Estes miRNAs parecem atuar em diferentes estágios e células; o miR-146a tem expressão predominante em células do sistema imune durante sua maturação/ativação (121). O pri-miR-146a é composto por 2.337 nucleotídeos e a sequência da fita madura se localiza no segundo éxon de um RNA não codificante LOC285628, já que este não apresenta ORF (137). O miR-146b é altamente expresso durante o desenvolvimento embrionário de camundongos e, na fase adulta, sua expressão ocorre de forma majoritária no pulmão (Kramer, dados não publicados). Ainda que ambos os miR-146 apresentem a mesma região de semente e, conseqüentemente, os mesmos RNAm-alvos, é possível que o miR-146a tenha papel mais relevante no controle de genes em células do sistema imune. Até o momento, não foi descrito nenhum SNP para o miR-146b. Em contrapartida, o sequenciamento do gene miR-146a e regiões adjacentes revelou novos polimorfismos além daquele anteriormente descrito. Tal sequenciamento foi realizado na população Chinesa Han e identificou 12 novas variantes, onde apenas 5 delas apresentavam MAF > 1%, e nenhuma delas foi associada à doença de lúpus eritematoso sistêmico (SLE). O mesmo trabalho apontou para outros polimorfismos em regiões adjacentes que foram usados como fonte de escolha dos SNPs rs2431697 e rs2431099 por estarem fortemente associado ao SLE (146). Embora existam algumas semelhanças entre a hanseníase e o SLE no que diz respeito a genes associados (34), é preciso levar em consideração que a composição e estrutura genética das populações brasileira e Chinesa são bastante diversas. De fato, a análise do tipo caso-controle destes polimorfismos na população brasileira mostrou que não há qualquer associação entre eles e a hanseníase. Adicionalmente, estes SNPs se encontram em LD na nossa população, o que não ocorre na população chinesa. Além disso, a análise haplotípica entre os polimorfismos rs2910164 (G>C) e rs2431099 (A>G) manteve o dado de associação do alelo C (rs2910164) apenas na combinação C/A, antes e após os ajustes para as covariáveis sexo e etnia.

O polimorfismo do gene rs2910164 G>C já foi associado de forma genética e funcional com alguns tipos de câncer (88,89) e geneticamente à tuberculose pulmonar (TBP) (91). Os Dados do polimorfismo rs2910164 quanto a sua associação genética à tuberculose são bastante conflitantes. No trabalho desenvolvido por Li e colaboradores (2011), de forma contrária aos nossos achados, os genótipos carreadores do alelo G foram associados à risco no

desenvolvimento de TBP em apenas uma das duas populações Asiáticas estudadas (Tibetana). Mais recentemente, um novo estudo conduzido em três populações Chinesas – Han, Uygur e Kazak – descreveu que somente o genótipo *CC* foi associado à risco a TBP (OR = 1,84; p = 0,013) na população Kazak (147). O estudo conduzido por Li e colaboradores (2011) carece de poder estatístico por conta da limitação do número de amostras, e ambos não apresentam nenhum tipo de estudo funcional. É muito provável que as diferenças de associação entre o alelo *C* (rs2910164) nos estudos de tuberculose e este em hanseníase sejam em virtude da composição genética das populações estudadas. As inconsistências observadas quanto ao resultado de associação e a sua direção podem ser explicadas pelas diferenças das frequências dos alelos nos grupos estudados. Isto reforça a necessidade da replicação em mais estudos sobre o SNP rs2910164 em hanseníase em outras populações brasileiras. Ainda, recentemente, o projeto EPIGEN-Brasil concluiu o sequenciamento do genoma de três coortes brasileiras (148), e estes dados poderão ser usados futuramente para compreender a distribuição destes polimorfismos na população brasileira e fornecer ferramentas para outras abordagens de análise genética, tais como a influência da ancestralidade, busca por SNPs que funcionem como etiquetas de blocos haplotípicos e padrões de LD.

Um outro ponto interessante deste trabalho diz respeito à análise de associação genética considerando o fator “idade ao diagnóstico” (termo usado como tradução livre da expressão *age-at-diagnosis*). Mostramos que o efeito de associação do alelo *C* está bastante relacionado com a população composta por adultos jovens – entre 25 e 34 anos – e em menor escala na faixa de 35 a 44 anos de idade. Interessantemente, outros estudos mostraram que os genótipos *GC* e *CC* estão relacionados à risco de desenvolver câncer familiar de ovário/mama nos indivíduos mais jovens (149). Este mesmo estudo correlaciona a presença do alelo de risco no pre-miR-146a com maiores níveis de expressão da sua forma madura. Estes resultados foram corroborados por outro relato, ainda sobre câncer de ovário/mama, mostrando que indivíduos portadores do alelo *C* desenvolveram tumores numa idade mais jovem do que os indivíduos com o genótipo *GG* (150). Apesar de câncer e hanseníase serem doenças de etiologias muito distintas, parece existir um ponto de convergência – ou fator intrínseco – relativo ao alelo de risco e o evento de uma condição patológica dependente da idade que pode estar associado a padrões idade-específicos de ativação da expressão gênica. De fato, há uma hipótese de que a influência de determinados genes na susceptibilidade a doenças infecciosas pode ser idade-

dependente (37,151). Neste sentido, foi mostrado que o efeito de associação do alelo A no gene da linfotóxina- α (+80) e a hanseníase foi mais evidente em indivíduos jovens. A análise de caso-controle foi replicada em duas populações independentes, Brasileira e Vietnamita (152). O mesmo efeito idade-dependente também foi evidenciado no estudo de associação do gene parkina em uma população Vietnamita (153). A relação entre o marcador de risco do miR-146a (rs2910164) e o fator “idade ao diagnóstico” é um campo que merece ser mais explorado em outras populações.

Como explicado no capítulo de introdução, a presença de polimorfismos ao longo das fitas primária ou precursora dos miRNAs pode ter um impacto na sua biogênese, fato já demonstrado para diferentes miRNAs. A confirmação funcional da variante de risco *C* foi realizada por estudos de expressão do miR-146a em biópsias de nervo e PBMC. De forma geral, a presença do alelo *C* resultou no aumento da expressão da forma madura deste miRNA quando comparados ao genótipo *GG*. Devido a algumas discordâncias observadas na literatura, foi discutido (capítulo II) a provável existência de outros mecanismos que possam influenciar na biogênese do miR-146a. Desta forma, apenas para complementar esta ideia, dados não publicados do laboratório do Dr. Boldin mostram que o processamento do pre-miR-146a em células THP-1 (frente ao estímulo de LPS) depende da atuação de uma proteína específica ainda não identificada. Portanto, ainda há mecanismos na biogênese do miR-146a que precisam ser elucidados. Também se observa controle da biogênese deste miRNA a nível transcricional, um SNP (rs57095329 A>G) localizado na região promotora do miR-146a interfere com a afinidade do fator de transcrição Ets-1; onde a presença do alelo *G*, associado à risco em SLE em três populações chinesas, resultou na redução da expressão do miR-146a maduro (146). O efeito deste SNP na expressão do miRNA foi corroborado por outros estudos (154,155). A literatura carece de informações deste SNP na população brasileira. Infelizmente, não conseguimos realizar a genotipagem desse SNP na nossa população.

O presente trabalho associa a variante de risco *C* com o aumento da expressão do miR-146a e, conseqüentemente, com a redução dos níveis de TNF, sugerindo uma correlação genótipo-fenótipo. Por possuírem grande impacto na biogênese e função dos miRNAs, os SNPs localizados nestes genes ou em seus RNAm-alvos podem ser bastante informativos na identificação de eQTLs. Recentemente, um trabalho identificou variantes genéticas de miRNA

que influenciam na sua expressão e o correlacionaram com o impacto na regulação de RNAm-alvos. Os autores utilizaram um modelo de infecção de células dendríticas por *M.tb* e identificaram dois miRNAs, o miR-326 e o miR-1260, que até então ainda não haviam sido estudados em micobacterioses (156). Há na literatura um predomínio de estudos relativos a moléculas que participam efetivamente da resposta imune ao *M. leprae*, esquecendo-se que outras camadas de regulação podem ter impacto sobre estas variantes genéticas. Neste sentido, o trabalho de Siddle e colaboradores (2014), e também os nossos dados, evidenciam a importância de mais estudos sobre como as variantes genéticas dos miRNAs podem afetar a interação entre miRNA-RNAm-alvo, ou até mesmo em outros RNAs não codificantes. Cabendo aqui ressaltar que SNPs associados à doenças estão enriquecidos dentro de sequências não-codificantes de elementos funcionais, normalmente localizados próximos a regiões codificantes (48). Um outro ponto ainda não interrogado é o estudo do efeito de variantes genéticas nas regiões 3' UTR de RNAm-alvos. Polimorfismos nestas regiões podem levar a perda ou ganho de função de determinado miRNA, trazendo consequências para um determinado fenótipo esperado. Durante meu estágio no exterior, foi estabelecida uma cultura de clones estáveis de THP-1 que superexpressam a fita pri-miR-146a contendo o alelo C (risco) ou o alelo G (proteção). Esta ferramenta poderá ser utilizada para maiores investigações sobre o papel funcional deste polimorfismo na regulação de citocinas e fatores de transcrição durante a infecção pelo *M. leprae*, bem como a viabilidade do bacilo.

A correlação genótipo (alelo C) / fenótipo (aumento da expressão do miR-146a com redução da síntese de TNF) tem outros desdobramentos a serem analisados. O primeiro deles diz respeito ao estudo genético em episódios reacionais. Apesar da análise estatística não ter se mantido após as correções, existe a sugestão de que este alelo possa ter efeito protetor. O que faria bastante sentido, já que durante estes episódios os níveis de TNF se encontram bastante elevados (157,158). Contudo, para afirmarmos esta associação é necessária uma análise mais aprofundada, seja através do aumento do número de amostras ou com outras populações de replicação. O segundo desdobramento reside no estudo mais detalhado do fenótipo observado, o que foi uma das limitações do primeiro estudo (artigo da tese). Parte das perguntas em aberto foram respondidas com a utilização do modelo de camundongos nocaute para o miR-146a. Com esta abordagem foi possível comprovar que a expressão de TNF, induzida pela infecção do *M. leprae* está, pelo menos em parte, sob controle do miR-146a, uma vez que

BMDM nocautes para este miRNA apresentaram maior expressão de TNF. Este fato pode ser explicado como uma consequência da ativação de TLR num mecanismo de *feedback* negativo. A estimulação de TLR1/2 ou TLR4 via IRAK1/TRAF6 leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B que, por sua vez, promove a síntese de TNF (101). Entretanto, esta mesma via modula a expressão do gene miR-146a. Sendo assim, é possível que a síntese do miR-146a contribua indiretamente para a redução da síntese de TNF, pela regulação negativa das moléculas adaptadoras IRAK1/TRAF6. Curiosamente, os níveis de TNF foram indetectáveis no sobrenadante destas células, e é possível que após a transcrição esta molécula seja encontrada predominantemente na forma não solúvel (transmembranar), que mantém a sua atividade imunomoduladora (159) ou mesmo que os níveis de TNF secretados tenham sido consumidos de forma autócrina. De fato, ainda não se tem respostas para qual receptor ou via de ativação é responsável pela modulação do miR-146a induzida pelo *M. leprae*. Contudo, o fato deste fenômeno ser dependente da viabilidade do bacilo (efeito observado em THP-1 e BMDM) pode nos fornecer algumas pistas.

O efeito da dependência da viabilidade do *M. leprae* na indução de padrões de respostas específicas do hospedeiro já foi observado anteriormente. Em células de Schwann, apenas o bacilo viável induz a formação de corpúsculos lipídicos (160) de forma dependente de sua internalização e ativação de TLR6. Além disso, componentes isolados da bactéria não estão envolvidos na formação dos corpúsculos lipídicos. Em concordância, dados do nosso laboratório relatam que a indução da via de IFN tipo I em macrófagos também é dependente da viabilidade do bacilo (161). Em conjunto, estes dados sugerem que algumas das respostas induzidas pelo *M. leprae* podem ser atribuídas à liberação/produção de fatores de virulência pelo bacilo viável. Neste sentido, tanto o *M.tb* quanto o *M. leprae* possuem um sistema de secreção proteico do tipo VII/ESX, dentre estas proteínas a ESAT-6 (um acrônimo do inglês *early secreted antigenic target 6 kDa*), que representa um de seus principais componentes de virulência (162). A proteína ESAT-6 e CFP10 – uma proteína do tipo ESAT-6 – foram relacionadas com a habilidade destas micobactérias em escapar dos fagolisossomos para o citosol (163,164). Por exemplo, sabe-se que a indução do miR-155 pelo *M.tb* é dependente de ESAT-6 (100), um tipo de miRNA que também é induzido pelo *M. leprae* e se apresenta sobreexpresso em nervos de pacientes hansênicos (dados não mostrados). Deste modo, é bastante claro que ativação de vias e respostas celulares estão atreladas à viabilidade e à

virulência destas micobactérias, que estão associadas a permissividade das células e consequente estabelecimento de um nicho favorável à replicação do *M. leprae*. A ativação dessa via é dependente de DNA dupla fita que sinaliza via receptores STING/TBK1/IRF3 em micobactérias (Watson et al 2015 e Toledo-Pinto, dados não publicados). No entanto, se a indução da expressão do miR-146a e a ativação da via STING/TBK1/IRF3 é de alguma forma ligada a perfuração de fagolisossomos é uma questão que merece investigação futura e indicaria uma via de modulação deste miRNA ainda não descrita. A dependência de viabilidade é um bom indicativo da ativação via sinalização a partir do extravasamento do conteúdo fagolisossomal, embora não tenhamos conseguido ainda convergir o miR-146a e a via STING/TBK1/IRF3.

Além dos macrófagos, o miR-146a também é relevante no contexto das células T, estando relacionado particularmente com a resposta Th1. Em camundongos foi proposto que, durante a diferenciação de células T, o miR-146a está regulado positivamente em células Th1 e tendo sua expressão suprimida em células Th2 (165). Posteriormente, este mecanismo foi um pouco mais explorado ainda utilizando um modelo de camundongos. Mostrou-se que a deficiência do miR-146a levou a um aumento do fator de transcrição STAT1 que, por sua vez, induziu a produção de IFN- γ relacionado com o desenvolvimento de uma resposta autoimune dependente da resposta Th1 (166). Ainda em linfócitos, foi demonstrado que o miR-146a modula a expressão da IL-2 através da redução de expressão do fator de transcrição AP-1, protegendo os linfócitos contra a morte celular (167). Durante a resposta Th1, o IFN- γ e IL-2 desempenham um papel crucial na ativação de macrófagos e proliferação de células T antígeno-específicas, respectivamente. Na hanseníase, estas citocinas são predominantes em lesões de pacientes com formas paucibacilares e durante os episódios de RR somada a presença de TNF e IL-1 (39). A ativação da via IFN tipo I (α/β) em resposta às infecções virais é um fato bem estabelecido na literatura científica. Atualmente, propõem-se que a ativação desta via cria um ambiente propício para a sobrevivência de micobactérias. Inicialmente, foi descrita uma assinatura IFN-tipo I mediada por neutrófilos em resposta ao *M.tb* (45). Na hanseníase, foi demonstrado que o *M. leprae* também ativa esta via que, por sua vez, atua antagonizando a via IFN-tipo II, reduzindo a resposta microbicida mediada pela vitamina-D (47). Dados do laboratório corroboram a participação da via IFN-tipo I. Além disso, foi identificada uma nova proteína que participa desta via: a OASL (do inglês, 2'-5'

oligoadenylate synthetase-like), cuja transcrição é dependente da via citosólica dependente de DNA (161). A relação entre miR-146a e a produção de IFN na hanseníase ainda é uma incógnita. Em dengue, este miRNA regula negativamente o IFN-tipo I, favorecendo a replicação do DENV2 (168), o mesmo foi observado com o vírus da estomatite vesicular (169). Em SLE, a repressão do miR-146a foi correlacionada com o aumento da expressão de moléculas da via IFN-tipo I, tais como LYE6, OAS1 e Mx1, um mecanismo dependente dos fatores de transcrição STAT1 e IRF5 (170). Interessantemente, camundongos miR-146a^{-/-} apresentaram o desenvolvimento de um quadro severo de autoimunidade, tendo como consequência lesões em diferentes órgãos mediada por uma resposta exacerbada dependente de IFN-tipo II (166).

Com relação aos antígenos isolados do *M. leprae*, apenas o PGL-1 foi testado sendo seu papel irrelevante na indução do miR-146a em macrófagos derivados de THP-1 (dados não mostrados). Também foram testados os receptores NOD2, TLR9 e TLR2, através da estimulação por ligantes sintéticos – MDP, CpG e Pam3CSK4; respectivamente. Destes, apenas a ativação do TLR2 resultou no aumento da expressão do miR-146a (dados não mostrados). Uma outra possibilidade ainda não abordada é verificar se a indução do miR-146a estimulada pelo *M. leprae* pode ser TNF-dependente; uma vez que já foi descrito que esta citocina pode levar ao aumento da expressão deste miRNA em monócitos (THP-1) (137).

Curiosamente, além da viabilidade da bactéria, o fator virulência também pode indicar a existência de diferentes mecanismos de regulação entre as micobactérias. Neste sentido uma comparação entre *M.tb* e *M. smegmatis* mostrou efeitos antagônicos na expressão do miR-125b, miR-155, miR-142-3p por macrófagos infectados (105). O mesmo tipo de efeito foi observado na comparação entre as cepas de *M.tb* virulentas (H37Rv) e avirulentas (H37Ra) (171). Resultados do nosso laboratório indicam um fenômeno semelhante na regulação do miR-146a. Dados preliminares sugerem que a infecção de macrófagos derivados de THP-1 por BCG e *M. smegmatis* resultou em maiores níveis de expressão deste miRNA do que aquele induzido pelo *M. leprae*, especialmente para *M. smegmatis* (dados não mostrados). O dado é ainda confuso pois *M. smegmatis*, mas não BCG, apresenta RD1 (região de diferenciação 1, que é responsável pela produção do sistema *esx-1/ESAT-6/CFP-10*).

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica e pró-inflamatória que durante a infecção pelo *M. leprae*, pode ser produzida pela estimulação de monócitos ou macrófagos. De modo geral, TNF- α e IFN- γ podem atuar de forma sinérgica ao promover a eliminação do bacilo através da produção de NO e ativação da via autofágica (172). Nossos dados mostram que ocorre uma drástica redução da viabilidade do *M. leprae* em células que produzem altos níveis de TNF- α na ausência do miR-146a. Isto sugere que a presença deste miRNA pode ser fundamental no sucesso da infecção ao controlar a produção de citocinas pró-inflamatórias, permitindo a sobrevivência intracelular do bacilo. Estes dados estão de acordo com o papel do miR-146a na viabilidade do BCG (173) e replicação do Dengue vírus (168); contudo estes estudos não indicam mecanismo, exceto pela modulação da produção de citocinas pró-inflamatórias. Revisitando os dados genéticos, mostramos que o alelo de risco (associado a maior expressão do miR-146a) se correlaciona com menores níveis de TNF. Deste modo, interessou-nos identificar quais mecanismos seriam responsáveis pela redução da viabilidade bacteriana nos macrófagos nocautes. Para isso, analisamos a produção de NO e a participação da via autofágica. De acordo com as condições testadas, os dados mostram não haver qualquer produção de NO pelos macrófagos murinos infectados com *M. leprae*. Já havia sido demonstrado que macrófagos ativados por IFN- γ produzem espécies reativas de nitrogênio responsáveis pelo *killing in vitro* de *M.tb* e *M. leprae* (174). Além disso, o crescimento de *M.tb* em camundongos nocaute para iNOS não foi alterado pelo tratamento com IFN- γ (175). Em contrapartida, o crescimento do *M. leprae* nestes mesmos animais não foi alterado (176), contrastando com o ocorrido em *M.tb* e com as observações *in vitro*. Estes dados sugerem que esta via microbicida talvez não seja o principal mecanismo de controle do crescimento do *M. leprae*.

Tendo em vista os resultados sobre a produção de NO, partimos para a análise do papel da via autofágica. A ativação da autofagia está entre um dos principais mecanismos que levam ao sucesso na eliminação de bactérias intracelulares, tais como as micobactérias, por uma via denominada de xenofagia (144). Este processo está sobre controle da ativação de PRR, citocinas Th1 e IRGM (177). Estudos já apontaram alguns miRNAs que regulam a via autofágica com papel modulador na eliminação do *M.tb*; são eles: miR-155 e miR-125a. Este miRNAs, contudo, apresentam efeitos antagônicos. Enquanto o miR-155 promove a

autofagia, favorecendo a eliminação da bactéria (178), o miR-125a tem um efeito pró-micobateria ao inibir este processo (179).

Os dados mostram que a infecção *per se* dos BMDM, independente da presença do miR-146a, resultou no aumento da LC3b-I sem trazer alterações relevantes nos níveis de LC3b-II. Em contrapartida, os macrófagos miR-146a^{-/-} apresentam um maior nível basal (i.e., a célula sem estímulos) de LC3b-I, que sofre novamente um aumento após a infecção. Como explicado na descrição dos resultados, a conversão da forma LC3b-I à forma LC3b-II é um marcador de ativação da via autofágica. De modo geral, a análise de autofagia pode ser avaliada pela densitometria da forma LC3b-II normalizada pelos valores do controle de carregamento de proteínas, neste caso, a β -actina. Entretanto, analisamos a variação de LC3b-I pela evidente alteração observada nos grupos testados. Este dado foi bastante surpreendente e nos permite sugerir algumas hipóteses: (a) a primeira hipótese é que as células deficientes para o miR-146a já possuem maior expressão de LC3b e isto afetaria a via autofágica de modo a torná-la mais ativa; (b) outra possibilidade seria o aumento da expressão de LC3b induzido pela infecção, e intensificando o observado nas células nocaute não estimuladas. Todavia, estas hipóteses não explicam a não observação do *shift* esperado na formação de LC3b-II como indicativo de autofagia. Para esta pergunta, podemos sugerir que (c) pode ser devido a um bloqueio na autofagia, o que contrastaria com o resultado de redução da viabilidade observada; (d) ou que a alta disponibilidade de LC3b-I provoca saturação do fluxo autofágico. É importante ressaltar que um estudo mais completo da via autofágica requer a análise da fusão autofagossomo/lisossomo, o que pode ser alcançado através do uso de inibidores específicos deste processo. Além disso, é possível que a formação de LC3b-II não seja o único mecanismo a ser considerado na ativação da via autofágica (180). Portanto, a certeza de que o aumento da autofagia em macrófagos miR-146a^{-/-} é o mecanismo que controla a viabilidade do *M. leprae* só poderá ser alcançada com um estudo mais detalhado.

Adicionalmente, alguns estudos sugerem que a LC3b pode promover a eliminação de patógenos sem se associar diretamente à dupla membrana do autofagossomo, através de estímulos como ativação de TLR, um processo denominado fagocitose associada à LC3 (LAP, do inglês *LC3-associated phagocytosis*). Neste trabalho, sugere-se que LC3 e Beclina-1 podem se associar de forma rápida à membrana do fagossomo promovendo a fusão deste com

o lisossomo, em um mecanismo independente de Atg5 e Atg7 (181,182). Um fenômeno semelhante foi descrito em *Mycobacterium marinum* (183). Apesar das limitações do resultado discutido no parágrafo anterior, é interessante destacar que o miR-146a tem os genes *ATG12* e *ATG7* como alvos putativos (ww.targetscan.org). A proteína Atg12 é essencial para formação do complexo Atg5-Atg12-Atg16L que promove a etapa inicial do alongamento da membrana do fagossomo, enquanto a Atg7 participa da conversão de LC3b-I em LC3b-II (172).

Este trabalho contribuiu para mostrar a importância de estudar outras camadas regulatórias na imunopatogênese da hanseníase, tanto no âmbito genético quanto funcional. Estas contribuições apontam para o miR-146a como regulador na imunossupressão frente à infecção pela micobactéria, atuando possivelmente na promoção de um nicho pró-sobrevivência no ambiente intracelular. Com certeza, este assunto não foi completamente esgotado e, neste sentido, o presente estudo aponta lacunas a serem preenchidas. Considerando a coletividade destes dados em adição aos conhecimentos prévios sobre a hanseníase, esquematizamos o que entendemos pelo papel desempenhado pelo miR-146a na hanseníase (figura 24). A construção do modelo foi inspirada no trabalho de Tobin e colaboradores (2012), e adaptado de Roca e Ramakrishnan (2013), mas que pode ser perfeitamente aplicável ao papel do miR-146a na hanseníase. É muito provável que exista um balanço necessário na produção do miR-146a que irá refletir em diferentes níveis de TNF e na imunossupressão, levando a um espectro de fenótipo celular que pode variar desde a incapacidade de controlar o crescimento micobacteriano, passando pelo controle moderado, até a um fenótipo onde a exacerbação de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF, pode causar danos teciduais em um quadro semelhante às reações hansênicas. Dentro do espectro de produção de TNF vs. miR-146a é possível sugerir uma localização dos polos da hanseníase, que se correlaciona com o fluxo autofágico e com o controle do crescimento bacteriano. Os genótipos do miR-146a estão propositalmente não alocados nas extremidades fenotípicas, porque acreditamos que possa existir uma interação com outros fatores genéticos ainda não estudados, sejam outros polimorfismos do miR-146a ou de outros genes.

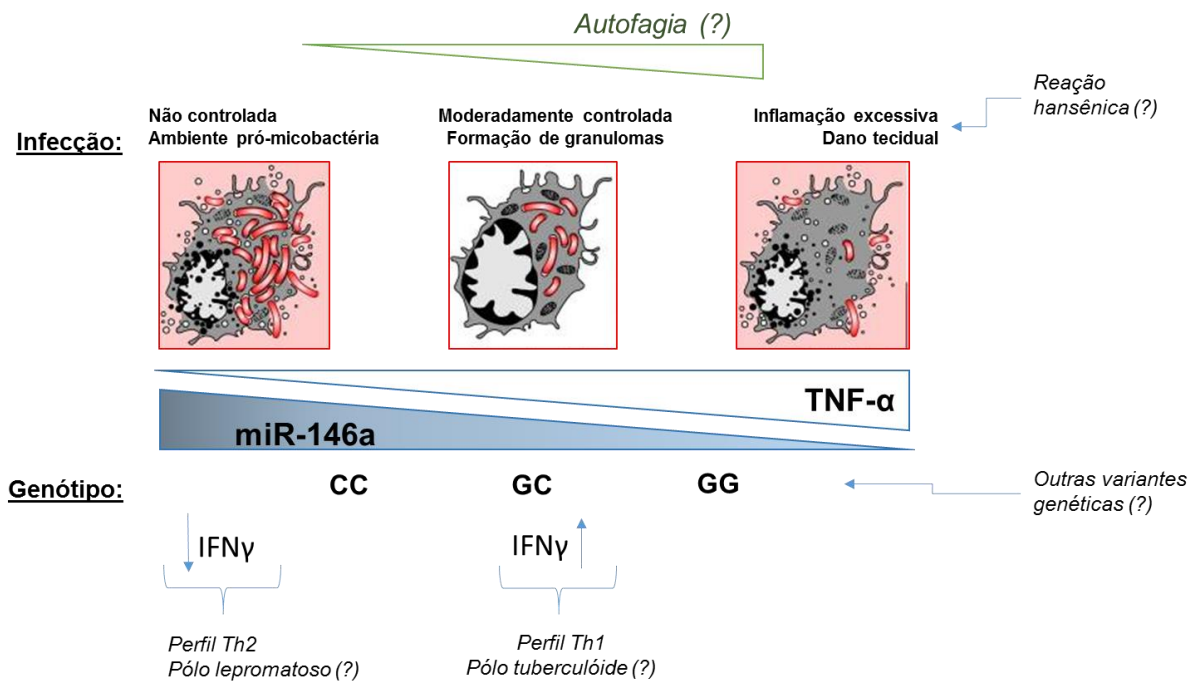


Figura 24: Modelo que representa o possível papel do miR-146a e suas variantes genéticas na infecção de macrófagos pelo *M. leprae*. As variantes genéticas do miR-146a podem influenciar o balanço de TNF- α , tendo como consequência diferentes fenótipos celulares de resistência ao *M. leprae*. O modelo ainda sugere o envolvimento do processo autofágico, e destaca a possível participação da via IFN- γ . Ao longo do espectro miR-146a vs. TNF- α , sugerimos a localização mais provável dos polos hansênicos.

1.2 Estudo da expressão de miRNAs no sangue periférico de pacientes e contatos

Nesta etapa do estudo, utilizamos um painel composto por 93 miRNAs a fim de identificar potenciais biomarcadores e vias regulatórias desreguladas durante a infecção pelo *M. leprae*. O racional deste estudo está baseado na ideia de que o padrão de expressão dos miRNAs reflete uma determinada alteração fisiológica ou condição patológica. Diversos estudos têm explorado este papel dos miRNAs em diferentes tipos de amostras, bem como, sangue, soro, escarro e até mesmo urina. Destes, a maioria é relativa a diferentes tipos de câncer e, no campo das doenças infecciosas, a tuberculose tem maior destaque. Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que visou investigar a expressão de miRNAs em amostras de sangue de pacientes e contatos hansênicos com este objetivo.

O miR-15b foi o único miRNA encontrado em altos níveis no grupo MB. Este miRNA está localizado no cromossomo 3 e está organizado em *cluster* com o miR-16-2 altamente conservado entre os mamíferos. O *cluster* tem o gene *SMC4* como hospedeiro, cuja função está associada à estabilidade cromossômica (186). Dos principais genes-alvos encontrados destacam-se a neuropilina-2 um receptor que pode ser ativado pelo fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e semaforina, e um gene envolvidos no processo de autofagia, o *ATG14* – que será discutido posteriormente. Ainda destacamos o gene *BAG5*, cuja atividade promove o sequestro da proteína parkina (*PARK2*) em agregados proteicos e, conseqüentemente, impede a sua função de ubiquitina ligase (187). Em concordância com estes dados, o *locus PARK2/PACRG* foi uma das primeiras regiões identificadas como associadas a susceptibilidade à hanseníase (188). Mais recentemente, o papel da parkina foi caracterizado e observou-se que a ubiquitinação de proteínas no fagolisossomo é necessária para autofagia e conseqüente clareamento micobacteriano. A Infecção por *M.tb* de macrófagos provenientes de camundongos nocaute para parkina demonstrou um favorecimento da infecção (189). Portanto, o miR-15b aumentado em pacientes MB é um dado que converge com os resultados anteriores pois indica que esse poderia estar inibindo a função de parkina e favorecendo o estabelecimento da infecção e progressão para a doença.

A comparação do grupo MB tanto com contatos quanto com PB indicou dois miRNAs diferencialmente expressos, porém em direções opostas; o miR-15b (induzido) e o miR-30e-5p (reprimido) em pacientes MB. Ao contrário dos nossos achados, Liu e colaboradores (2012), ao conduzirem um estudo de expressão gênica global com biópsias de pele dos polos TT e LL, mostraram que o miR-30e estava sobre expresso em pacientes LL. Além destes, outros genes da mesma família foram identificados, tais como o miR-30a e o miR-30b. No presente estudo, os miR-30a, miR-30b e o miR-30c estavam presentes nas nossas análises, porém não se mostraram informativos. É compreensível que os dados sejam, a princípio, contraditórios. Neste caso, deve ser levado em consideração que além de serem tecidos diferentes, as biópsias de pele apresentam uma oportunidade de entender mecanismos imunoinflamatórios locais enquanto que o sangue oferece a possibilidade de identificar marcadores da doença ou alterações sistêmicas. Na literatura, consta apenas mais um trabalho sobre o miR-30e e micobactérias. Os autores compararam a expressão diferencial de diversos miRNAs de acordo com a virulência de duas cepas de *M.tb*, onde a cepa virulenta se apresentou como um indutor mais potente, mas não sugeriram nenhum mecanismo associado a estas observações ou ao papel deste miRNA (171). Há também um trabalho que mostra que a expressão deste miRNA pode ser reprimida em células *natural killer* ativadas por IFN- α (190).

A análise de ontogenia relativa ao miR-30e-5p apontou um único processo biológico associado ao desenvolvimento cardíaco. É interessante mencionar que uma das limitações de utilizarmos bancos públicos é estarmos limitados apenas ao que já foi anotado para determinada função, o que abre a possibilidade da existência de outros processos. Uma outra questão é o repertório de expressão gênica das células analisadas em comparação com os RNAm-alvos identificados *in silico*; é preciso levar em consideração que nem todos os RNAm associados aos BPs devem fazer parte do contexto do tipo de amostra aqui utilizada. A análise associada dos alvos do miR-30e-5p e miR-196a permitiu identificar apenas um alvo em comum destes miRNAs, o *BIRC6*. De acordo com a regulação atribuída aos miRNAs, espera-se que este gene seja sobreexpresso nas amostras de pacientes MB, o que será testado brevemente tanto em culturas de células estimuladas por *M.leprae* como em amostras de biópsias de pele ou nervo. A proteína codificada pelo *BIRC6* é descrita como uma inibidora do processo de apoptose e, além disso, o seu respectivo gene hospeda o miR-558. Este

miRNA ainda é pouco estudado e o mesmo não estava presente no grupo de miRNAs escolhidos para este estudo. Curiosamente há um trabalho que comprova experimentalmente que o miR-558 tem a enzima cicloxigenase-2 como alvo (COX-2) (191). A atividade catalítica da COX-2 gera uma gama de metabólitos lipídicos a partir do ácido araquidônico que, de acordo com o tipo celular e a participação de outras enzimas, pode gerar eicosanoides com função pró ou anti-inflamatória. Recentemente, Amaral e colaboradores (2013) demonstraram a ocorrência de eicosanoides circulantes no soro de pacientes BT e LL, mostrando que há perturbações no metabolismo lipídico durante a hanseníase. Dos alvos exclusivamente identificados para o miR-196a, pode-se destacar o gene *CALM3*, que codifica a proteína calmodulina, uma proteína ligante de cálcio e importante durante o processo de sinalização intracelular.

O miR-196a-2 foi um dos genes candidatos escolhidos para o estudo genético (caso-controle), conforme explicado ao longo desta tese. Curiosamente, dos SNPs testados, o miR-196a-2 não está associado geneticamente à hanseníase. Portanto, não foram realizados experimentos funcionais com este miRNA e a análise do miR-146a assumiu o foco da primeira parte do trabalho. Como o miR-196a é um dos genes que se encontra diferencialmente expresso na comparação entre pacientes MB e contatos, seria interessante analisar em mais detalhes o papel deste miRNA também em biópsias de pele e nervo. É interessante que o miR-196a já foi previamente associada ao processo autofágico via controle da proteína IRGM (141) e que por sua vez SNPs em IRGM já foram associados a hanseníase e TB (193–195). Ainda, o *M. leprae* é capaz de regular positivamente a expressão de IRGM em monócitos e em macrófagos derivados de monócitos, mas não em células T CD4⁺. A análise do sangue periférico de pacientes revelou que os níveis proteicos de IRGM estão aumentados apenas nos monócitos de pacientes, incluindo todos as formas clínicas e também pacientes que sofreram algum tipo de reação hansênica. Ao estratificar a análise por forma clínica, foi sugerido que os níveis de IRGM se correlacionam de forma inversa com a severidade da doença, ou seja, observa-se maior expressão da proteína nas formas mais brandas da hanseníase (196). Diferente dos nossos achados, não observamos diferença significativa nos níveis do miR-196a entre os grupos PB e MB, no sangue total, embora não tenhamos testado pele e nervo. Isto sugere que a regulação pelo miR-196a não seja o único mecanismo que influencia na expressão de IRGM. Além disso, este mesmo grupo aponta um polimorfismo do IRGM associado à doença

na população chinesa, o SNP rs13361189 (T>C), onde o alelo de risco C se associa com a maior produção de IL-4 e IFN- γ (193). Estas evidências sugerem que o miR-196a pode exercer um papel relevante na regulação da carga bacilar das células infectadas. Ainda, pode-se sugerir que a análise genética-epidemiológica do polimorfismo do *IRGM* na população brasileira e sua relação com o miR-196a pode ser de interesse no entendimento da influência genética do hospedeiro na gravidade da doença.

Apesar da hanseníase ser uma doença com manifestações clínicas bastante heterogêneas, foi possível identificar um único miRNA que se encontra reprimido no grupo de pacientes, independente da forma clínica, quando comparados aos indivíduos saudáveis, o miR-206. A partir deste miRNA, três processos biológicos e seus respectivos RNAm foram identificados. Observa-se uma grande interseção entre eles, pois a maioria dos genes identificados são compartilhados por estes processos. Interessantemente, o mecanismo de ubiquitinação foi bastante representado, 4 dos genes identificados atuam na sua promoção, são eles: *UBE4A*, *UBR5*, *TRIM2* e *OTUD5*. O resultado esperado é que estes genes se encontrem sobre-representados e possivelmente a sua atividade, dado que há uma menor expressão do miR-206. Ao invadir o citoplasma das células hospedeiras, as micobactérias sofrem ubiquitinação, o que sinaliza seu direcionamento para organelas do tipo autofagossomos (197). A autofagia constitui um importante mecanismo de controle do crescimento de patógenos intracelulares como as micobactérias. Outros genes considerados interessantes foram: neuropilina-1 (*NRP1*), um co-receptor do VEGF e *JARID2*, que codifica uma proteína membro da família Jumonji, que contém um motivo que permite sua ligação ao DNA funcionando como um modificador da cromatina através da sua atividade desmetilase. Da literatura, sabe-se que o aumento de *JARID2* é responsável pela redução da síntese de IL-17 em camundongos deficientes do miR-155 (198). A IL-17 é uma interleucina pró-inflamatória produzida por células CD4⁺ Th17 e é um mediador da inflamação crônica e autoimune. Foi especulado que esta desempenhe um efeito protetor na resposta imune contra o *M.tb* no pulmão (199). Em contrapartida, um estudo realizado com 43 pacientes hanseníacos evidenciou que os níveis séricos (sistêmicos) de IL-17 foram baixos quando comparados com o soro de indivíduos saudáveis, não existindo diferença entre os diferentes subgrupos de pacientes estudados (TT, borderlines, LL, forma neural pura, reação reversa tipo I e eritema nodoso hanseníacos) (200). Tendo em vista estas informações, pode-se especular que os baixos

níveis de miR-206 em pacientes se correlacionem com os níveis séricos de IL-17. Seria interessante explorar, futuramente, a relação entre o miR-206/JARID2/IL-17 na infecção pelo *M. leprae*.

Além das vias e alvos que foram indicados neste estudo, cabe também especular a possibilidade destes miRNAs serem utilizados como biomarcadores. Para isso, será necessário aumentarmos o número de amostras e a realização de testes adicionais. De modo geral, de todos os miRNAs e alvos identificados, os processos que se relacionam com a atividade de ubiquitinação, que está intimamente relacionado com a autofagia, foram os mais consistentes. Em resumo, foi possível identificar 4 miRNAs diferencialmente expressos. Destes, 3 miRNAs diferenciam os pacientes MB e os contatos domiciliares, onde o miR-30e-5p e miR-196a estão reprimidos ao passo que o miR-15b está induzido em MB. Este resultado abre uma nova perspectiva no acompanhamento do estado clínico dos contatos. O monitoramento deste miRNA no sangue dos contatos pode ser um campo de investigação no prognóstico de adoecimento desta parcela da população. Este estudo também contribui para a melhor compreensão dos miRNAs na Hanseníase e aponta novas possibilidades de explorar novos alvos terapêuticos.

2. Conclusões

O presente trabalho destacou o papel dos miRNAs na hanseníase e contribuiu para um maior entendimento sobre o tema. Em conjunto, os dados deste estudo nos permitem concluir que:

- O miRSNP-146a C (rs2910164) confere susceptibilidade à hanseníase *per se*;
- O alelo de risco resulta em maior expressão do miR-146a;
- A indução de TNF pelo *M. leprae* é regulada pelo miR-146a;
- A viabilidade intracelular do *M. leprae* depende da expressão do miR-146a;
- Os miR-30e-5p e miR-15b são diferencialmente expressos em pacientes paucibacilares e multibacilares.
- Os miR-30e-5p e miR-15b e miR-196a são diferencialmente expressos entre pacientes multibacilares e contatos domiciliares;
- O miR-206 está reprimido no sangue de pacientes hansênicos em comparação aos indivíduos saudáveis;
- O miR-484 está induzido no sangue de pacientes hansênicos em comparação aos contatos intradomiciliares

3. Referências Bibliográficas

1. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The Continuing Challenges of Leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19(2):338–81.
2. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(6):856–64.
3. Han XY, Sizer KC, Thompson EJ, Kabanja J, Li J, Hu P, et al. Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. *J Bacteriol.* 2009;191(19):6067–74.
4. Gillis TP, Scollard DM, Lockwood DNJ. What is the evidence that the putative *Mycobacterium lepromatosis* species causes diffuse lepromatous leprosy? *Lepr Rev.* 2011;82(3):205–9.
5. Long GW. The Paleoepidemiology of Leprosy: an Overview. *International J Lepr.* 1999;(4):460–70.
6. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet.* 2009;41(12):1282–9.
7. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Soc.* 2004;13(2):76–88.
8. Avelleira JCR, Quaresma MV, Filho FB, Vianna FR. History of leprosy in Rio de Janeiro *. *An Bras Dermatol.* 2014;89(3):515–8.
9. Who. Global leprosy update 2013. *Wkly Epidemiol Rec.* 2014;89(36):389–400.
10. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966;34(3):255–73.
11. Fava V, Orlova M, Cobat A, Alcaïs A, Mira M, Schurr E. Genetics of leprosy reactions: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Dec;107 Suppl:132–42.
12. Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010 Dec;74(4):589–620.
13. Coates E, Judd J, Gisjbers K, Scott L, Krause V. Guidelines for the Control of Leprosy in the Northern Territory 2010. 2010;
14. Hacker MDA, Duppre NC, Nery JAC, Sales AM, Sarno EN. Characteristics of leprosy diagnosed through the surveillance of contacts: a comparison with index cases in Rio de Janeiro, 1987-2010. *Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet].* 2012 Dec;107 Suppl:49–54.
15. Sarno EN, Duppre NC, Sales AM, Hacker MA, Nery JA, Matos HJ De. Leprosy exposure , infection and disease : a 25-year surveillance study of leprosy patient contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012;107(July):1054–9.
16. Martinez TS, Figueira MMNR, Costa A V, Gonc MA. Oral mucosa as a source of

- Mycobacterium leprae infection and transmission , and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. Clin Microbiol Infect. 2011;
17. Borowsky F, Souza VC De, Amaral T, Almeida P De, Alves V. Detection of Mycobacterium leprae in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(August):572–7.
 18. Silva C a M, Danelishvili L, McNamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, et al. Interaction of Mycobacterium leprae with human airway epithelial cells: Adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis. Infect Immun. 2013;81(7):2645–59.
 19. Truman R, Fine PEM. “Environmental” sources of Mycobacterium leprae: issues and evidence. Lepr Rev. 2010;81(2):89–95.
 20. Frota CC, Lima LNC, Rocha ADS, Suffys PN, Rolim BN, Rodrigues LC, et al. Mycobacterium leprae in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107(SUPPL.1):209–13.
 21. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. N Engl J Med. 2011;364(17):1626–33.
 22. Bühner-sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, Leeuwen J Van, Amador S, Fujiwara T, et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. J Clin Microbiol. 2003;41(5):1991–5.
 23. Bühner-sékula S, Illarramendi X, Teles RB, Lucia M, Penna F, Augusto J, et al. Acta Tropica The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. Acta Trop. 2009;111:172–6.
 24. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO, Britto CFPC, Nery JAC, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. J Clin Microbiol. 2006;44(9):e1354.
 25. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Oct;5(10):e1354.
 26. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(4):1–8.
 27. CUNHA FMB DA, MAURICIO C. M. WERNECK RHS, WERNECK LC. PURE NEURAL LEPROSY: DIAGNOSTIC VALUE OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION. Muscle Nerve. 2006;409–14.
 28. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. Microbiol Mol Biol Rev. 2008;72(1):126–56.
 29. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable M. leprae as a research reagent. Int J Lepr other

- Mycobact Dis. 2001;69(1):1–12.
30. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001 Feb 22;409(6823):1007–11.
 31. Singh P, Cole ST. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiol*. 2011;6(1):57–71.
 32. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of *Mycobacterium lepromatosis*. *Proc Natl Acad Sci*. 2015;112(14):201421504.
 33. Mira MT. Genetic host resistance and susceptibility to leprosy. *Microbes Infect*. 2006;8(4):1124–31.
 34. Alter A, Grant A, Abel L, Alca??s A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome*. 2011;22(1–2):19–31.
 35. Pacheco AG, Moraes MO. Genetic polymorphisms of infectious diseases in case-control studies. *Dis Markers*. 2009 Jan;27(3):173–86.
 36. Terwilliger JD, Ott J. A haplotype-based “haplotype relative risk” approach to detecting allelic associations. *Hum Hered*. 1992;42:337–46.
 37. Casanova J-L, Abel L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2013;14:215–43.
 38. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht CIAR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev*. 2006;77:189–202.
 39. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol*. 1992;149(4):1470–5.
 40. Hennessy EJ, Parker AE, O’Neill L a J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9(4):293–307.
 41. Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med*. 2005;11(6):653–60.
 42. KRUTZIK SR, OCHOA MT, SIELING PA, UEMATSU S, NG YW, LEGASPI A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 2003;525–32.
 43. Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Teresa M, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2010;6(4):343–53.
 44. Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl JL. Infection of mouse macrophages with viable *Mycobacterium leprae* does not induce apoptosis. *J Infect Dis*. 2010; 201(11):1736–42
 45. Berry MPR, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SAA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*. 2010;466(7309):973–7.

46. Guerreiro LTA, Robottom-ferreira AB, Ribeiro-alves M, Rosa PS, Sandoval FG, Toledo-pinto TG, et al. Gene Expression Profiling Specifies Chemokine , Mitochondrial and Lipid Metabolism Signatures in Leprosy. *PLoS One*. 2013;8(6):e64748.
47. Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, Schenk M, Lee DJ, Komisopoulou E, et al. Type I Interferon Suppresses Type II Interferon – Triggered Human Anti- Mycobacterial Responses. *Sci Express*. 2013;(February):1–7.
48. Dunham I, Kundaje A, Aldred SF, Collins PJ, Davis C a., Doyle F, et al. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 2012;489(7414):57–74.
49. Palazzo AF, Gregory TR. The Case for Junk DNA. *PLoS Genet*. 2014;10(5).
50. Lee R, Feinbaum R, Ambros V. A short history of a short RNA. *Cell*. 2004;116(2 Suppl):S89–S92, 1 p following S96.
51. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell [Internet]*. 1993 Dec 3;75(5):843–54.
52. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855–62.
53. Ruvkun G, Wightman B, Ha I, Horvitz B, Sulston J, Waterston B, et al. The 20 Years It Took to Recognize the Importance of Tiny RNAs Commentary along a Xerox of one paper , a 1981 *Cell* paper by Marty. *Cell*. 2004;93–6.
54. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901–6.
55. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86–9.
56. Dai R, Ahmed SA. MicroRNA, a new paradigm for understanding immunoregulation, inflammation, and autoimmune diseases. *Transl Res*. 2011;157(4):163–79.
57. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. *Cell*. 2004;116:281–97.
58. Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet*. 2009;10(2):94–108.
59. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051–60.
60. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006;13(12):1097–101.
61. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415–9.

62. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*. 2006;125(5):887–901.
63. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011–6.
64. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;15(8):509–24.
65. Lau P-W, MacRae IJ. The molecular machines that mediate microRNA maturation. *J Cell Mol Med*. 2009 Jan;13(1):54–60.
66. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008;9(2):102–14.
67. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003;277–9.
68. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006;34:D140-4.
69. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*. 2003;115(7):787–98.
70. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):e85. Available
71. Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: Biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol*. 2008;18(1):113–21.
72. Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today*. 2007;12(11–12):452–8.
73. Chan S-P, Slack FJ. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol*. 2006;3(3):97–100.
74. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. Regulation of microRNA biogenesis , function and degradation. *Nature*. 2010;1:20–20.
75. Place RF, Li L-C, 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(5):1608–13.
76. Cipolla G a. A non-canonical landscape of the microRNA system. *Front Genet*. 2014;5(September):1–6.
77. Shin C, Nam J-W, Farh KK-H, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell*. Elsevier Ltd; 2010;38(6):789–802.
78. Fabbri M, Paone A, Calore F, Galli R, Gaudio E, Santhanam R, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A. 2012 Jul 31;109(31):E2110-6.
79. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang C-Y. microRNAs are ligands of Toll-like receptors. *RNA*. 2013;19(6):737–9.
 80. KA F, DG B, DR C, DA H, LL S, RA G, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851–61.
 81. Mishra PJ, Bertino JR. MicroRNA polymorphisms: the future of pharmacogenomics, molecular epidemiology and individualized medicine. *Pharmacogenomics*. 2009;10(3):399–416.
 82. Hu Z, Bruno AE. The Influence of 3'UTRs on MicroRNA Function Inferred from Human SNP Data. *Comp Funct Genomics*. 2011:910769.
 83. Abelson JF, Kwan KY, O'Roak BJ, Baek DY, Stillman AA, Morgan TM, et al. Sequence variants in *SLITRK1* are associated with Tourette's syndrome. *Science*. 2005. p. 317–20.
 84. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(6):389–402.
 85. Rukov JL, Shomron N. MicroRNA pharmacogenomics: Post-transcriptional regulation of drug response. *Trends Mol Med*. Elsevier Ltd; 2011;17(8):412–23.
 86. Li J, Zhang Z. miRNA regulatory variation in human evolution. *Trends Genet*. Elsevier Ltd; 2012;29(2):116–24.
 87. Saunders M a, Liang H, Li W-H. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3300–5. t
 88. Permuth-Wey J, Thompson RC, Burton Nabors L, Olson JJ, Browning JE, Madden MH, et al. A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma. *J Neurooncol*. 2011;3:639–46.
 89. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 20;105(20):7269–74.
 90. Xu T, Zhu Y, Wei Q-K, Yuan Y, Zhou F, Ge Y-Y, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2008 Nov;29(11):2126–31.
 91. Li D, Wang T, Song X, MeiLang Q, Yang B, Zhang J, et al. Genetic Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis with Two Nucleotide Variations within Corresponding MicroRNAs Regulating Toll-like Receptors-Mediated Signal Pathway. *Hum Immunol*. 2011;72(7):598–602.
 92. Sheedy FJ, O'Neill L a J. Adding fuel to fire: microRNAs as a new class of mediators of inflammation. *Ann Rheum Dis*. 2008 Dec;67 Suppl 3:iii50-5.
 93. Yang CH, Yue J, Fan M, Pfeffer LM. IFN induces miR-21 through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway as a suppressive negative feedback

- on IFN-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2010;70(20):8108–16.
94. O’Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(5):1604–9.
 95. Kumar S, Naqvi RA, Khanna N, Rao DN. Disruption of HLA-DR raft, deregulations of Lck-ZAP-70-Cbl-b cross-talk and miR181a towards T cell hyporesponsiveness in leprosy. *Mol Immunol.* Elsevier Ltd; 2011 May;48(9–10):1178–90.
 96. Liu PT, Wheelwright M, Teles R, Komisopoulou E, Edfeldt K, Ferguson B, et al. MicroRNA-21 targets the vitamin D-dependent antimicrobial pathway in leprosy. *Nat Med.* Nature Publishing Group; 2012 Mar;18(2):267–73.
 97. Kumar S, Naqvi RA, Ali R, Rani R, Khanna N, Rao DN. FoxP3 provides competitive fitness to CD4+CD25+ T cells in leprosy patients via transcriptional regulation. *Eur J Immunol.* 2014;44(2):431–9.
 98. Abel L, El-Baghdadi J, Bousfiha AA, Casanova J-L, Schurr E. Human genetics of tuberculosis: a long and winding road. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014;369(1645):20130428.
 99. Rajaram MVS, Ni B, Morris JD, Brooks MN, Carlson TK, Bakthavachalu B, et al. Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(42):17408–13.
 100. Kumar R, Halder P, Sahu SK, Kumar M, Kumari M, Jana K, et al. Identification of a novel role of ESAT-6-dependent miR-155 induction during infection of macrophages with Mycobacterium tuberculosis. *Cell Microbiol.* 2012 ;14(10):1620–31.
 101. Quinn SR, O’Neill L a. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *Int Immunol.* 2011;23(7):421–5.
 102. Dorhoi A, Iannaccone M, Farinacci M, Faé KC, Schreiber J, Moura-Alves P, et al. MicroRNA-223 controls susceptibility to tuberculosis by regulating lung neutrophil recruitment. *J Clin Invest.* 2013;123(11):4836–48.
 103. Iwai H, Funatogawa K, Matsumura K, Kato-Miyazawa M, Kirikae F, Kiga K, et al. MicroRNA-155 knockout mice are susceptible to Mycobacterium tuberculosis infection. *Tuberculosis.* 2015;95(3):246–50.
 104. Harapan H, Fitra F, Ichsan I, Mulyadi M, Miotto P, Hasan NA, et al. The roles of microRNAs on tuberculosis infection: meaning or myth? *Tuberculosis.* 2013;93(6):596–605.
 105. Mehta MD, Liu PT. microRNAs in mycobacterial disease: friend or foe? *Front Genet.* 2014;5(July):231.
 106. Ma R, Jiang T, Kang X. Circulating microRNAs in cancer : origin , function and application. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;
 107. Etheridge A, Lee I, Hood L, Galas D, Wang K. Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res.* 2011 Mar 23 [cited 2011 Jul 27];1–6.

108. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvald JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654–9.
109. Ohshima K, Inoue K, Fujiwara A, Hatakeyama K, Kanto K, Watanabe Y, et al. Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One.* 2010;5(10):1–10.
110. Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011;2:282.
111. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin G a. MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(8):467–77.
112. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997–1006.
113. Chen G, Wang J, Cui Q. Could circulating miRNAs contribute to cancer therapy? *Trends Mol Med.*; 2012;19(2):71–3.
114. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10513–8.
115. Wu J, Lu C, Diao N, Zhang S, Wang S, Wang F, et al. Analysis of microRNA expression profiling identifies miR-155 and miR-155* as potential diagnostic markers for active tuberculosis: a preliminary study. *Hum Immunol.* 2012;73(1):31–7.
116. Fu Y, Yi Z, Wu X, Li J, Xu F. Circulating microRNAs in patients with active pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4246–51.
117. Qi Y, Cui L, Ge Y, Shi Z, Zhao K, Guo X, et al. Altered serum microRNAs as biomarkers for the early diagnosis of pulmonary tuberculosis infection. *BMC Infect Dis. BMC Infectious Diseases*; 2012;12(1):384.
118. Yi Z, Fu Y, Ji R, Li R, Guan Z. Altered microRNA signatures in sputum of patients with active pulmonary tuberculosis. *PLoS One.* 2012;7(8):e43184. t
119. Maertzdorf J, Weiner J, Mollenkopf H-J, Bauer T, Prasse A, Müller-Quernheim J, et al. Common patterns and disease-related signatures in tuberculosis and sarcoidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(20):7853–8.
120. Wang H, Peng W, Ouyang X, Li W, Dai Y. Circulating microRNAs as candidate biomarkers in patients with systemic lupus erythematosus. *Transl Res.* 2012;160(3):198–206.
121. Boldin MP, Taganov KD, Rao DS, Yang L, Zhao JL, Kalwani M, et al. miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J Exp Med.* 2011 Jun 6;208(6):1189–201.
122. Levy L, Ji B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*.

- Lepr Rev. 2006;77:5–24.
123. Fukutomi Y, Matsuoka M, Minagawa F, Toratani S, McCormick G, Krahenbuhl J. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2004;72(1):16–26.
 124. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2009 Jul;47(7):2124–30.
 125. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131–8.
 126. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
 127. Ritz C, Spiess A-N. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics.* 2008;24(13):1549–51.
 128. R Development Core Team R. R: A Language and Environment for Statistical Computing [Internet]. Team RDC, editor. R Foundation for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing; 2011. p. 409. Available from: <http://www.r-project.org>
 129. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;10(6):R64.
 130. Berger VW. Permutation Tests for Stochastic Ordering and ANOVA: Theory and Applications with R by BASSO, D., PESARIN, F., SALMASO, L., and SOLARI, A. *Biometrics.* 2010;66(1):319–21.
 131. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *JR Stat Soc B.* 1995;57(1):289–300.
 132. Alexa A, Rahnenführer J, Lengauer T. Improved scoring of functional groups from gene expression data by decorrelating GO graph structure. *Bioinformatics.* 2006;22(13):1600–7.
 133. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25–9.
 134. Gene T, Consortium O, Gene T, Go O. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* 2014;43(D1):D1049–56.
 135. Cezar-de-Mello PFT, Toledo-Pinto TG, Marques CS, Arnez LE a., Cardoso CC, Guerreiro LT a., et al. Pre-miR-146a (rs2910164 G>C) Single Nucleotide Polymorphism Is Genetically and Functionally Associated with Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9):e3099.
 136. Li Y, Shi X. MicroRNAs in the regulation of TLR and RIG-I pathways. *Cell Mol*

- Immunol. Nature Publishing Group; 2013 Jan;10(1):65–71.
137. Taganov KD, Boldin MP, Chang K, Baltimore D. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *PNAS*. 2006;6–11.
 138. So AYL, Zhao JL, Baltimore D. The Yin and Yang of microRNAs: Leukemia and immunity. *Immunol Rev*. 2013;253(1):129–45.
 139. Zhang F, Huang W, Chen S, Sun L, Liu H, Li Y. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*. 2010 Apr 15;362(15):1447; author reply 1447-8.
 140. Schurr E, Gros P. A Common Genetic Fingerprint in Leprosy and Crohn ' s Disease ? *N Engl J Med*. 2009;2666–8.
 141. Brest P, Lapaquette P, Souidi M, Lebrigand K, Cesaro A, Vouret-Craviari V, et al. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2011 Mar;43(3):242–5.
 142. Liu Z, Zhou G, Deng X, Yu Q, Hu Y, Sun H, et al. Analysis of miRNA expression profiling in human macrophages responding to Mycobacterium infection: induction of the immune regulator miR-146a. *J Infect*. 2014 Jan 23;
 143. Sharbati J, Lewin A, Kutz-Lohroff B, Kamal E, Einspanier R, Sharbati S. Integrated microRNA-mRNA-analysis of human monocyte derived macrophages upon Mycobacterium avium subsp. hominissuis infection. *PLoS One*. 2011;6(5):e20258.
 144. Jo EK, Yuk JM, Shin DM, Sasakawa C. Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. *Front Immunol*. 2013;4:1–9.
 145. Mizushima N, Yoshimori T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy*. 2007,4–7.
 146. Luo X, Yang W, Ye D-Q, Cui H, Zhang Y, Hirankarn N, et al. A functional variant in microRNA-146a promoter modulates its expression and confers disease risk for systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet*. 2011;7(6):e1002128.
 147. Zhang X, Li Y, Li X, Zhang W, Pan Z, Wu F, et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2 and miR-499 polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis in the Chinese Uygur, Kazak and Southern Han populations. *BMC Infect Dis*. 2015;15(1):41.
 148. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, Mambrini J, et al. Genomic ancestry and ethnorracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep*. 2015;5:9812.
 149. Shen J, Ambrosone CB, Dicioccio R a., Odunsi K, Lele SB, Zhao H. A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*. 2008;29(10):1963–6.
 150. Pastrello C, Polesel J, Puppa L Della, Viel A, Maestro R. Association between hsa-mir-146a genotype and tumor age-of-onset in BRCA1/BRCA2-negative familial breast and ovarian cancer patients. *Carcinogenesis*. 2010;31(12):2124–6.

151. Casanova J-L, Abel L, Quintana-Murci L. Immunology Taught by Human Genetics. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2013;
152. Alcaïs A, Alter A, Antoni G, Orlova M, Nguyen VT, Singh M, et al. Stepwise replication identifies a low-producing lymphotoxin-alpha allele as a major risk factor for early-onset leprosy. Nat Genet. 2007 Apr;39(4):517–22.
153. Alter A, Fava VM, Huong NT, Singh M, Orlova M, Van Thuc N, et al. Linkage disequilibrium pattern and age-at-diagnosis are critical for replicating genetic associations across ethnic groups in leprosy. Hum Genet. 2013;132(1):107–16.
154. Cui L, Li Y, Ma G, Wang Y, Cai Y, Liu S, et al. A functional polymorphism in the promoter region of microRNA-146a is associated with the risk of alzheimer disease and the rate of cognitive decline in patients. PLoS One. 2014;9(2).
155. Shao Y, Li J, Cai Y, Xie Y, Ma G, Li Y, et al. The Functional Polymorphisms of miR-146a Are Associated with Susceptibility to Severe Sepsis in the Chinese Population. Mediators Inflamm. 2014;2014:1–10.
156. Siddle KJ, Deschamps M, Tailleux L, Nedelec Y, Pothlichet J, Lugo-Villarino G, et al. A genomic portrait of the genetic architecture and regulatory impact of microRNA expression in response to infection. Genome Res. 2014;11(3) e1005064
157. Sarno EN, Graut GE, Vieiraj LMM, Unit JANL, Cruz O. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-11 during leprosy reactional states. Clin Exp Immunol. 1991;84:103–8.
158. Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged Treatment with Recombinant Interferon 3, Induces Erythema Nodosum Leprosum in Lepromatous Leprosy Patients. J Exp Med. 1992;175:1729–37.
159. Saunders BM, Tran S, Ruuls S, Sedgwick JD, Briscoe H, Britton WJ. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of Mycobacterium tuberculosis infection. J Immunol. 2005;174(8):4852–9.
160. Mattos K a, Oliveira VGC, D’Avila H, Rodrigues LS, Pinheiro RO, Sarno EN, et al. TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. J Immunol. 2011 Sep 1;187(5):2548–58.
161. Gomes-Pinto T, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Guerreiro L, Salles-Marques C, Britto T. Mycobacterium leprae infection triggers a cytoplasmic DNA sensing-dependent type-I interferon pathway and an oligoadenylate synthetase-like antimicrobial gene response. 2013.
162. Feltcher ME, Sullivan JT, Braunstein M. Protein export systems of Mycobacterium tuberculosis: novel targets for drug development? Future Microbiol. 2010;5(10):1581–97.
163. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, et al. M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. Cell. 2007 Jun 29;129(7):1287–98.

164. Houben D, Demangel C, van Ingen J, Perez J, Baldeón L, Abdallah AM, et al. ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol.* 2012 Aug;14(8):1287–98.
165. Monticelli S, Ansel KM, Xiao C, Socci ND, Krichevsky AM, Thai T-H, et al. MicroRNA profiling of the murine hematopoietic system. *Genome Biol.* 2005;6(8):R71.
166. Lu L, Boldin MP, Chaudhry A, Lin L, Konstantin D, Hanada T, et al. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell.* 2010;142(6):914–29.
167. Curtale G, Citarella F, Carissimi C, Goldoni M, Carucci N, Fulci V, et al. An emerging player in the adaptive immune response: microRNA-146a is a modulator of IL-2 expression and activation-induced cell death in T lymphocytes. *Blood.* 2010;115(2):265–73.
168. Wu S, He L, Li Y, Wang T, Feng L, Jiang L, et al. miR-146a facilitates replication of dengue virus by dampening interferon induction by targeting TRAF6. *J Infect.* 2013;67(4):329–41.
169. Hou J, Wang P, Lin L, Liu X, Ma F. MicroRNA-146a Feedback Inhibits RIG-I-Dependent Type I IFN Production in Macrophages by Targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol.* 2009;183:2150–8.
170. Tang Y, Luo X, Cui H, Ni X, Yuan M, Guo Y, et al. MicroRNA-146A contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis Rheum.* 2009 Apr;60(4):1065–75.
171. Das K, Saikolappan S, Dhandayuthapani S. Differential expression of miRNAs by macrophages infected with virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 2013;93(SUPPL.).
172. Delgado M, Singh S, Haro S De, Master S, Ponpuak M, Ornatowski W, et al. Autophagy and Pattern Recognition Receptors in Innate Immunity. *Immunol Rev.* 2009;227(1):189–202.
173. Li S, Yue Y, Xu W, Xiong S. MicroRNA-146a represses mycobacteria-induced inflammatory response and facilitates bacterial replication via targeting IRAK-1 and TRAF-6. *PLoS One.* 2013;8(12):e81438.
174. Adams LB, Franzblau SG, Vavrin Z, Hibbs JB, Krahenbuhl JL. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol.* 1991;147(5):1642–6.
175. Adams LB, Dinauer MC, Morgenstern DE, Krahenbuhl JL. Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice. *Tuber Lung Dis.* 1997;78(5–6):237–46.
176. Adams LB, Job CK, Krahenbuhl JL. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Resistance to *Mycobacterium leprae* in Mice. *Infect Immun.* 2000;68(9):5462–5.
177. Deretic V, Delgado M, Vergne I, Master S, Haro S De. Autophagy in Infection and

- Immunity. Levine B, Yoshimori T, Deretic V, editors. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;335:1–18.
178. Wang J, Yang K, Zhou L, Wu M, Wu Y, Zhu M, et al. MicroRNA-155 Promotes Autophagy to Eliminate Intracellular Mycobacteria by Targeting Rheb. *PLoS Pathog*. 2013;9(10).
 179. Kim JK, Yuk J-M, Kim SY, Kim TS, Jin HS, Yang C-S, et al. MicroRNA-125a Inhibits Autophagy Activation and Antimicrobial Responses during Mycobacterial Infection. *J Immunol*. 2015;194: 5355–5365.
 180. Giménez-Xavier P, Francisco R, Platini F, Pérez R, Ambrosio S. LC3-I conversion to LC3-II does not necessarily result in complete autophagy. *Int J Mol Med*; 2008;22(6):781–5.
 181. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*. 2007;450(7173):1253–7.
 182. Sanjuan M a., Milasta S, Green DR. Toll-like receptor signaling in the lysosomal pathways. *Immunol Rev*. 2009;227(1):203–20.
 183. Collins C a., De Mazière A, Van Dijk S, Carlsson F, Klumperman J, Brown EJ. Atg5-independent sequestration of ubiquitinated mycobacteria. *PLoS Pathog*. 2009;5(5).
 184. Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, McFarland R, Vickery TW, Ray JP, et al. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell*. 2012;148(3):434–46.
 185. Roca F, Ramakrishnan L. TNF Dually Mediates Resistance and Susceptibility to Mycobacteria Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell*. 2013;153(3):521–34.
 186. Yue J, Tigyi G. Conservation of miR-15a/16-1 and miR-15b/16-2 clusters. *Mamm Genome*. 2010;21:88–94.
 187. Kalia SK, Lee S, Smith PD, Liu L, Crocker SJ, Thorarinsdottir TE, et al. BAG5 Inhibits Parkin and Enhances Dopaminergic Neuron Degeneration. *Neuron*. 2004;44:931–45.
 188. Mira MT, Alcaïs A, Moraes MO, Flumeri C Di, Thai VH, Khoa PX, et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Lett to Nat*. 2004;427(February):636–40.
 189. Manzanillo PS, Ayres JS, Watson RO, Collins AC, Souza G, Rae CS, et al. The ubiquitin ligase parkin mediates resistance to intracellular pathogens. *Nature*; 2013;501(7468):512–6.
 190. Wang P, Gu Y, Zhang Q, Han Y, Hou J, Lin L, et al. Identification of Resting and Type I IFN-Activated Human NK Cell miRNomes Reveals MicroRNA-378 and MicroRNA-30e as Negative Regulators of NK Cell Cytotoxicity. *J Immunol*. 2012;189:211–21.
 191. Park SJ, Cheon EJ, Kim HA. MicroRNA-558 regulates the expression of cyclooxygenase-2 and IL-1 b -induced catabolic effects in human articular

- chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* 2013;21(7):981–9.
192. Amaral JJ, Antunes LCM, de Macedo CS, Mattos K a., Han J, Pan J, et al. Metabonomics Reveals Drastic Changes in Anti-Inflammatory/Pro-Resolving Polyunsaturated Fatty Acids-Derived Lipid Mediators in Leprosy Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8).
 193. Yang D, Chen J, Shi C, Jing Z, Song N. Autophagy Gene Polymorphism is Associated with Susceptibility to Leprosy by Affecting Inflammatory Cytokines. *Inflammation.* 2014;37(2):2–7.
 194. Che N, Li S, Gao T, Zhang Z, Han Y, Zhang X, et al. Identification of a novel IRGM promoter single nucleotide polymorphism associated with tuberculosis. *Clin Chim Acta.* 2010;411(21–22):1645–9.
 195. Song JH, Kim SY, Chung KS, Moon CM, Kim SW, Kim EY, et al. Association between genetic variants in the IRGM gene and tuberculosis in a Korean population. *Infection.* 2014;655–60.
 196. Yang D, Chen J, Zhang L, Cha Z, Han S, Shi W, et al. *Mycobacterium leprae* Upregulates IRGM Expression in Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages. *Inflammation.* 2014;37(4):1028–34.
 197. Huynh KK, Joshi S a, Brown EJ. A delicate dance: host response to mycobacteria. *Curr Opin Immunol.* Elsevier Ltd; 2011 Aug;23(4):464–72.
 198. Escobar TM, Kanellopoulou C, Kugler DG, Kilaru G, Nguyen CK, Nagarajan V, et al. Article miR-155 Activates Cytokine Gene Expression in Th17 Cells by Regulating the DNA-Binding Protein Jarid2 to Relieve Polycomb-Mediated Repression. *Immunity.* 2014;40(6):865–79.
 199. Chatterjee S, Dwivedi VP, Singh Y, Siddiqui I, Sharma P, Van Kaer L, et al. Early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protective T helper 17 cell responses in a toll-like receptor-2-dependent manner. *PLoS Pathog.* 2011;7(11):e1002378.
 200. Attia E, Abdallah M, El-Khateeb E, Saad A, Lotfi R, Abdallah M, et al. Serum Th17 cytokines in leprosy: correlation with circulating cytokines. *Arch Dermatol Res.* 2014;306:793–801.
 201. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(2):126–39.

4. Anexos

4.1 miRNAs candidatos para o estudo do perfil de expressão em sangue periférico

ID / Nome do ensaio	Código do ensaio	Número de acesso miRBase
hsa-let-7a	000377	MIMAT0000062
hsa-let-7b	002619	MIMAT0000063
hsa-let-7c	000379	MIMAT0000064
hsa-let-7d	002283	MIMAT0000065
hsa-let-7e	002406	MIMAT0000066
hsa-let-7f	000382	MIMAT0000067
hsa-miR103	000439	MIMAT0000101
hsa-miR-125b	000449	MIMAT0000423
hsa-miR-126-5p	000451	MIMAT0000444
hsa-miR-134	001186	MIMAT0000447
hsa-miR-140	000462	MIMAT0000431
hsa-miR-142-3p	000464	MIMAT0000434
hsa-miR-144-3p	002676	MIMAT0000436
hsa-miR-146a	000468	MIMAT0000449
hsa-miR-155	002623	MIMAT0000646
hsa-miR-16	000391	MIMAT0000069
hsa-miR-17	002308	MIMAT0000070
hsa-miR-181a	000480	MIMAT0000256
hsa-miR-185	002271	MIMAT0000455
hsa-miR-195	000494	MIMAT0000461
hsa-miR-198	002273	MIMAT0000228
hsa-miR-199a	000498	MIMAT0000231
hsa-miR-576-3p	002351	MIMAT0004796
hsa-mir-21	000397	MIMAT0000076
hsa-miR-223	002098	MIMAT0004570
hsa-miR-23a-5p	002439	MIMAT0004496
hsa-miR-23b	002126	MIMAT0004587
hsa-miR-24	000402	MIMAT0000080
hsa-miR-25	000403	MIMAT0000081
hsa-miR-26a	000405	MIMAT0000082
hsa-miR-27a	002445	MIMAT0004501
hsa-miR-29a	002447	MIMAT0004503
hsa-miR-29b	000413	MIMAT0000100
hsa-miR-29c	000415	MIMAT0000681
hsa-miR-30a-5p	000417	MIMAT0000087
hsa-miR-30e-5p	002223	MIMAT0000692
hsa-miR-31	002279	MIMAT0000089
hsa-miR-451a	001141	MIMAT0001631
hsa-miR-499a-5p	001352	MIMAT0002870
hsa-miR-92a	000431	MIMAT0000092
hsa-miR-93	000432	MIMAT0000093
hsa-miR-106a	002169	MIMAT0000103
hsa-miR-125a-3p	002198	MIMAT0000443
hsa-miR-142-5p	002248	MIMAT0000433
hsa-miR-146b	001097	MIMAT0002809
hsa-miR-132	002132	MIMAT0004594
hsa-miR-181b	001098	MIMAT0000257

hsa-miR-181c	000482	MIMAT0000258
hsa-miR-184	000485	MIMAT0000454
hsa-miR-2909	241794_mat	MIMAT0013863
hsa-miR-34a	000426	MIMAT0000255
hsa-miR-30b	000602	MIMAT0000420
hsa-miR-422a	002297	MIMAT0001339
hsa-miR-638	001582	MIMAT0003308
hsa-miR29a-3p	002112	MIMAT0000086
hsa-miR-335	000546	MIMAT0000765
hsa-miR-423-5p	002340	MIMAT0004748
hsa-miR-576-3p	002351	MIMAT0004796
hsa-miR-889	002202	MIMAT0004921
hsa-miR-361	000554	MIMAT0000703
hsa-miR-203	000507	MIMAT0000264
hsa-miR-9	000583	MIMAT0000441
hsa-miR-196a	241070_mat	MIMAT0000226
hsa-miR-196b	002215	MIMAT0001080
hsa-miR-484	001821	MIMAT0002174
hsa-miR-192	000491	MIMAT0000222
hsa-miR-137	001129	MIMAT0000429
hsa-miR-20a	000580	MIMAT0000075
hsa-miR-1	002222	MIMAT0000416
hsa-miR-100	000437	MIMAT0000098
hsa-miR-122	002245	MIMAT0000421
mmu-miR-124a	001182	MIMAT0000422
hsa-miR-125a-5p	002198	MIMAT0000443
hsa-miR-1291	002838	MIMAT0005881
hsa-miR-130a	002131	MIMAT0004593
hsa-miR-133a	002246	MIMAT0000427
hsa-miR-133b	002247	MIMAT0000770
hsa-miR-135a	000460	MIMAT0000428
hsa-miR-143	002146	MIMAT0004599
hsa-miR-145	002278	MIMAT0000437
hsa-miR-150	000473	MIMAT0000451
hsa-miR-15b	000390	MIMAT0000417
hsa-miR-18b	002217	MIMAT0001412
hsa-miR-182-5p	002334	MIMAT0000259
hsa-miR-197	000497	MIMAT0000227
hsa-miR-19b	000396	MIMAT0000074
hsa-miR-206	000510	MIMAT0000462
hsa-miR-208	000511	MIMAT0000241
hsa-miR-208b	002290	MIMAT0004960
hsa-miR-221	000524	MIMAT0000278
hsa-miR-30c	000419	MIMAT0000244
hsa-miR-320	002277	MIMAT0000510
hsa-miR-455	001280	MIMAT0003150
cel-miR-39-3p	000200	MIMAT0000010
cel-miR-54-5p	462123_mat	MIMAT0020773
cel-miR-238-5p	243546_mat	MIMAT0015114

4.2 Processos Biológicos sobre representados no GO relacionados com o miR-15b

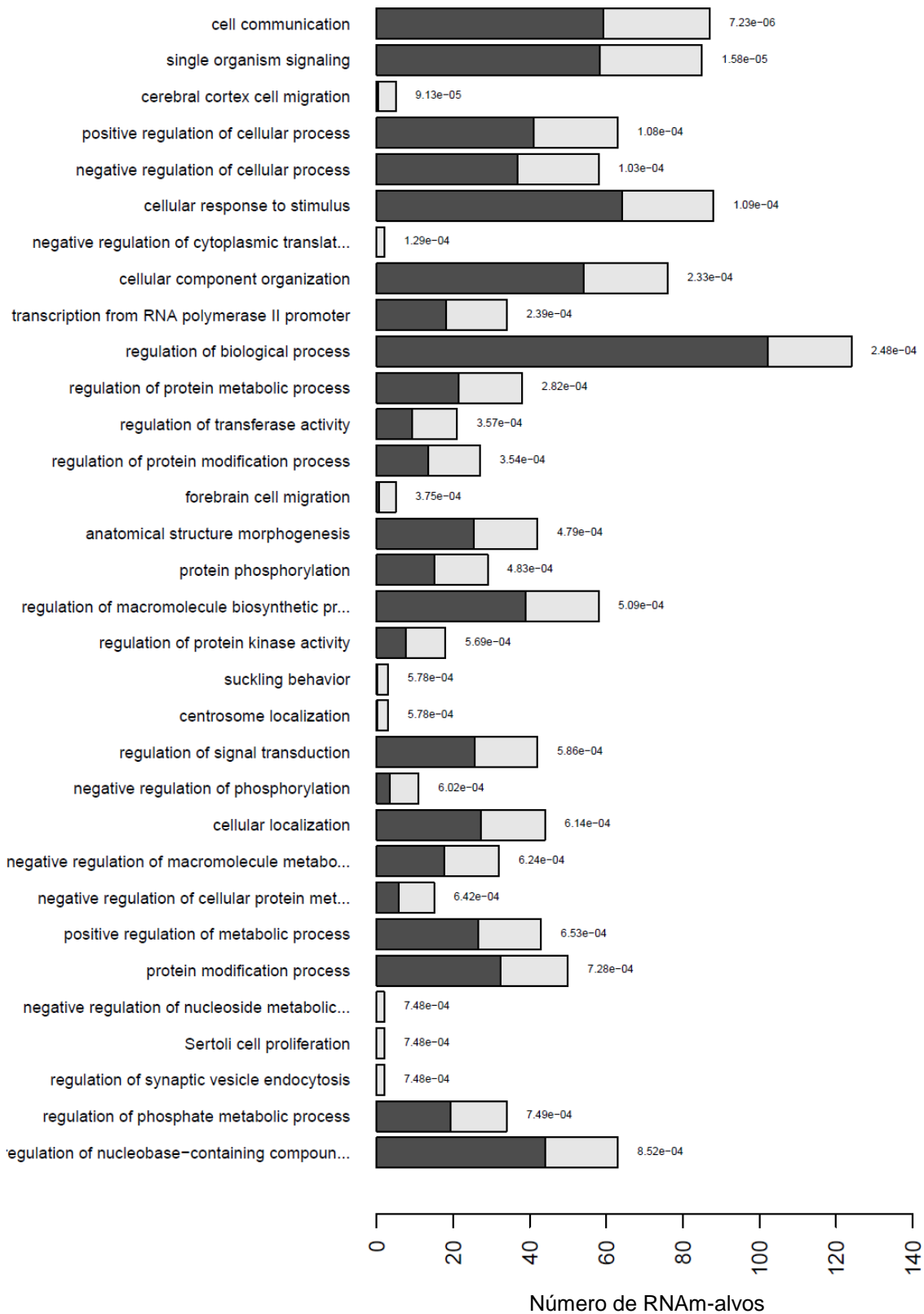


Figura 4.2: Processo Biológico sobre representados em pacientes MB. Os processos biológicos (BP) identificados estão representados pelas barras. A região cinza clara representa a quantidade de RNAm-alvos encontrados e a cinza escura representa a quantidade de RNAm esperada para o BP representado. P-valor ≤ 0.001 , teste hipergeométrico.

4.3 Processos Biológicos sobre representados no GO relacionados com o miR-30e-p

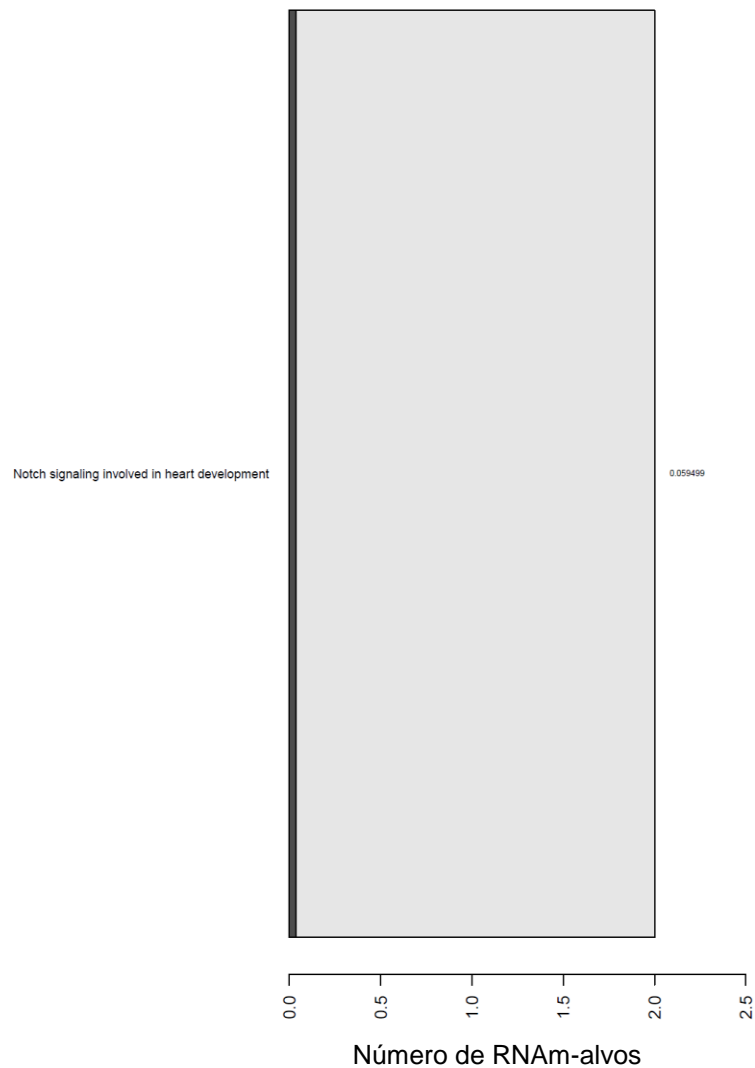


Figura 4.3: Processo Biológico sobre representado em pacientes MB. Os processos biológicos (BP) identificados está representado pela barra. A região cinza clara representa a quantidade de RNAm-alvos encontrados e a cinza escura representa a quantidade de RNAm esperada para o BP representado. P-valor ≤ 0.001 , teste hipergeométrico.

4.4 Processos Biológicos sobre representados no GO relacionados com o miR-196a

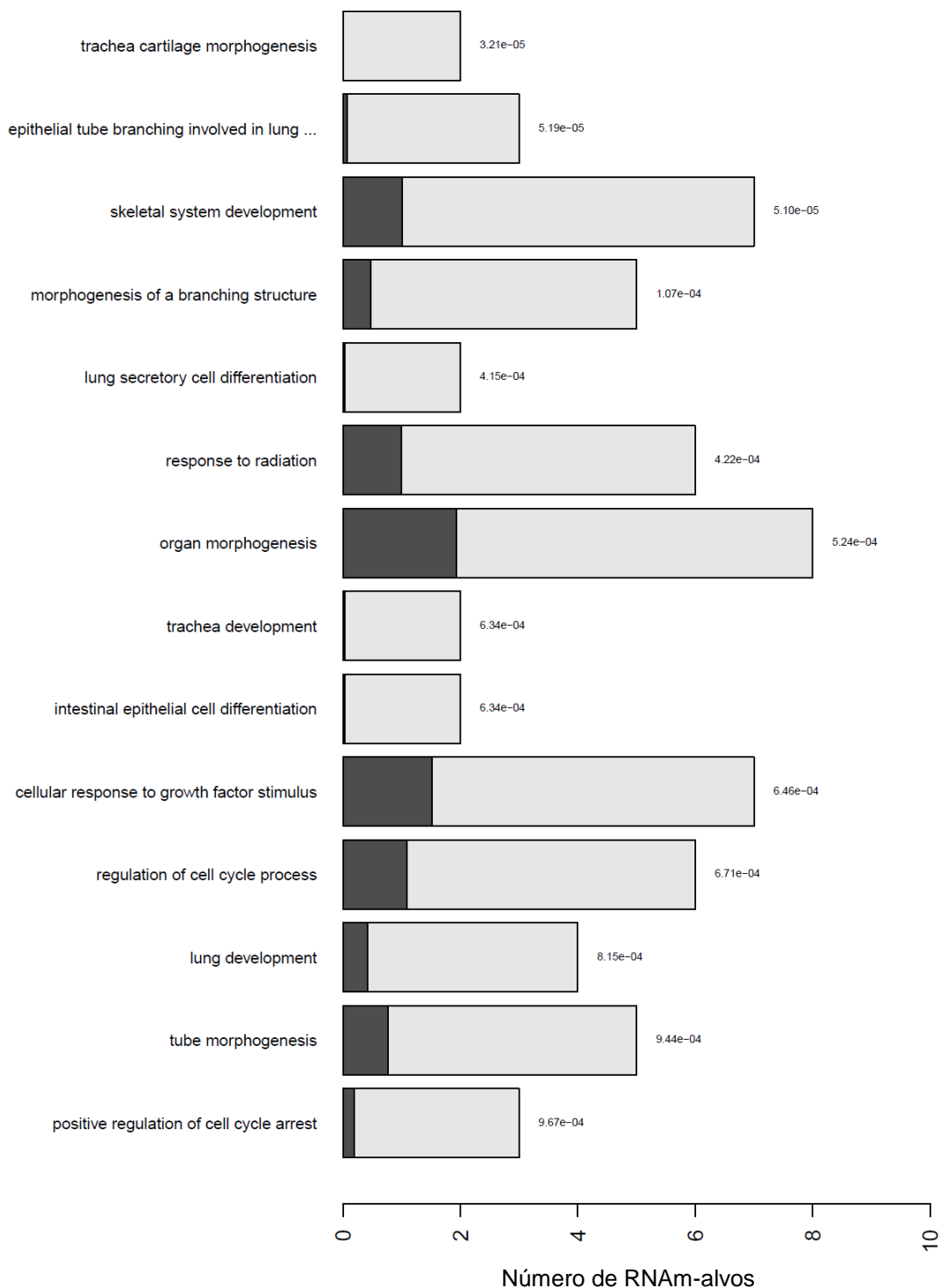


Figura 4.4: Processo Biológico sobrerrepresentado em pacientes MB. Os processos biológicos (BP) identificados estão representados pelas barras. A região cinza clara representa a quantidade de RNAm-alvos encontrados e a cinza escura representa a quantidade de RNAm esperada para o BP representado. P-valor ≤ 0.001 , teste hipergeométrico.

4.5 Processos Biológicos sobre representados no GO relacionados com o miR-206

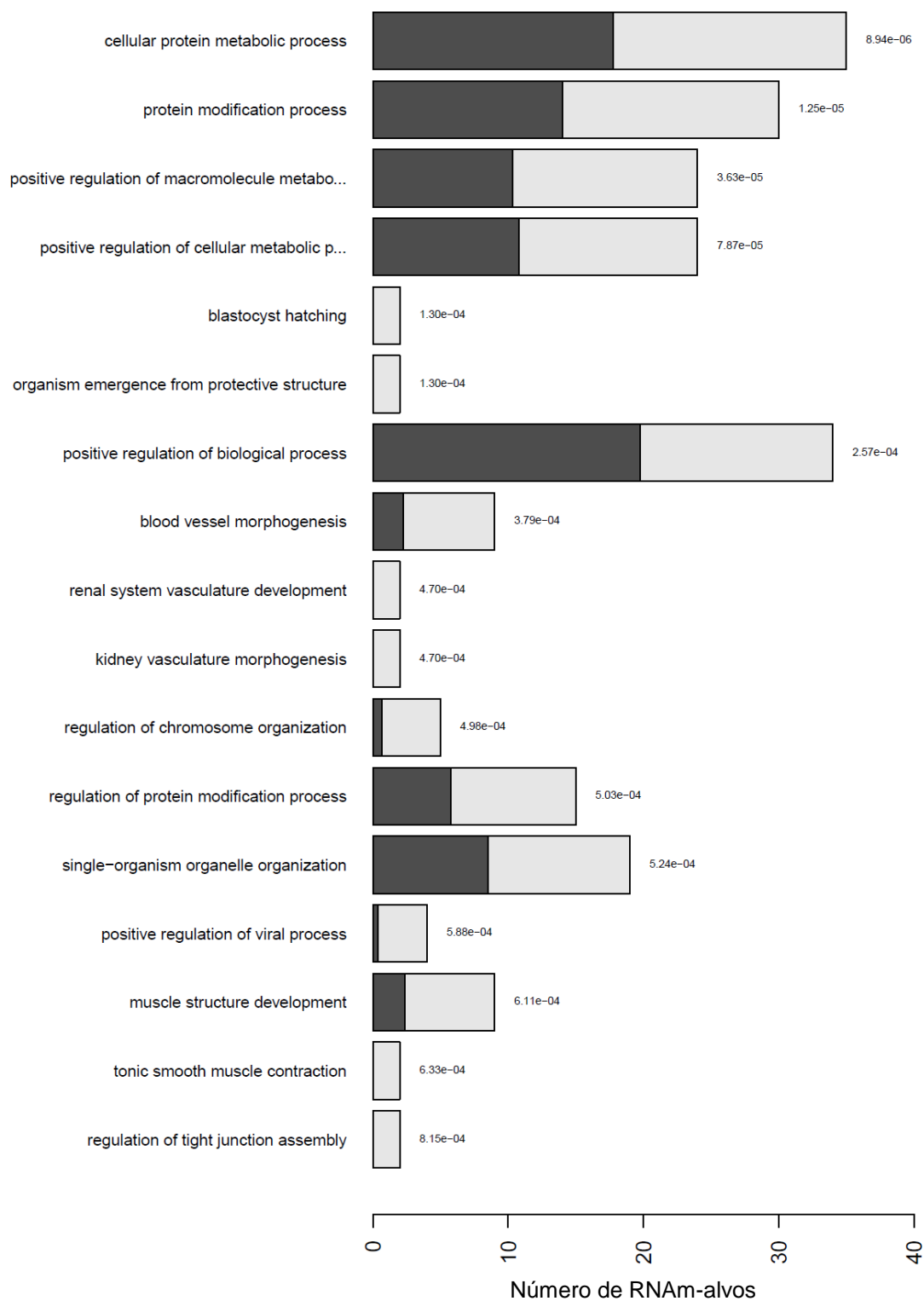


Figura 4.5: Processo Biológico sobre representado em pacientes com hanseníase. Os processos biológicos (BP) identificados estão representados pelas barras. A região cinza clara representa a quantidade de RNAm-alvos encontrados e a cinza escura representa a quantidade de RNAm esperada para o BP representado. P-valor ≤ 0.001 , teste hipergeométrico.

4.6 Processos Biológicos sobre representados no GO decorrentes da interação entre miR-30e-5p e miR-196a

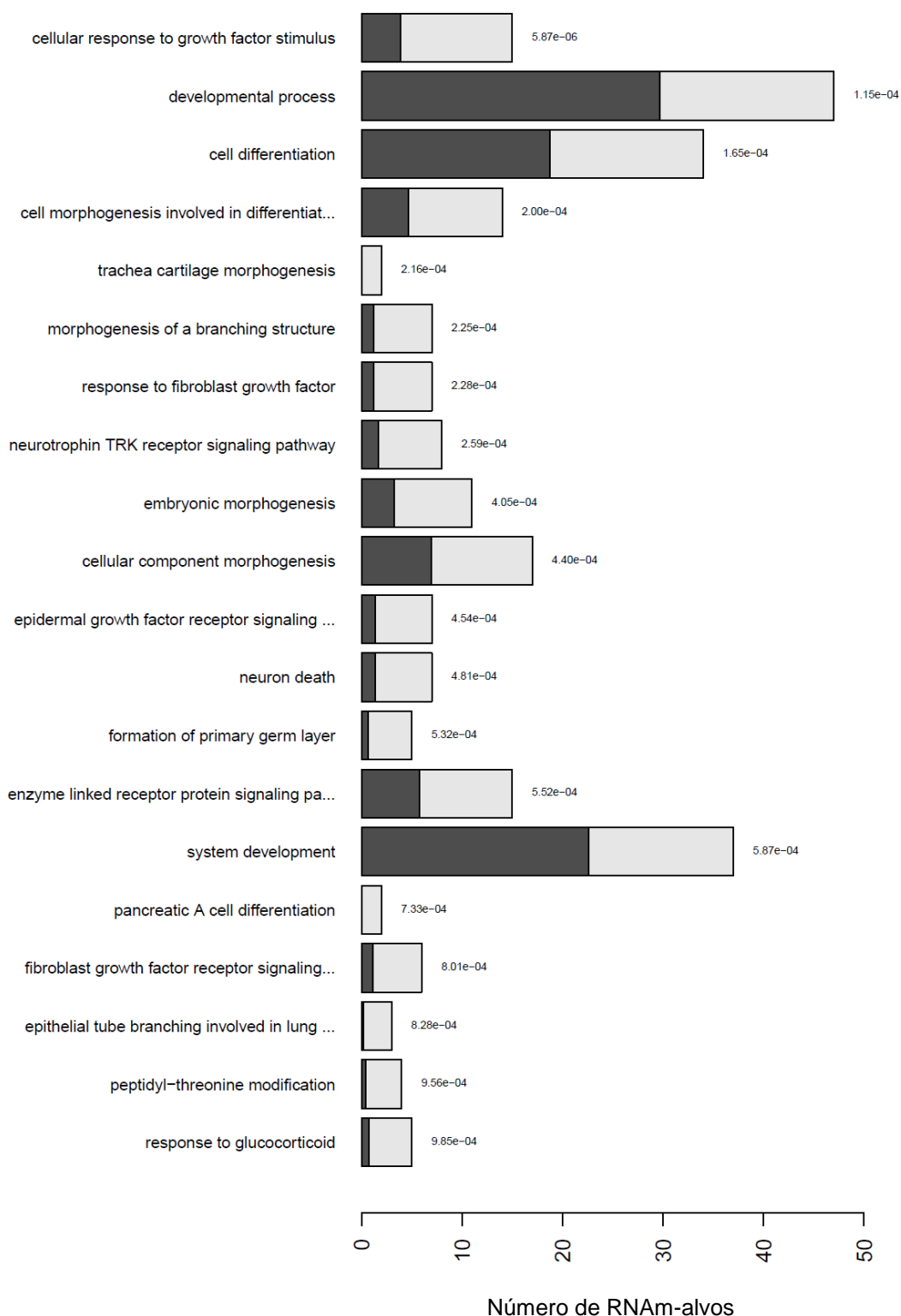



Figura 4.6: Processo Biológico sobrerrepresentado em pacientes MB. Os processos biológicos (BP) identificados estão representados pelas barras. A região cinza clara representa a quantidade de RNAm-alvos encontrados e a cinza escura representa a quantidade de RNAm esperada para o BP representado. P-valor ≤ 0.001 , teste hipergeométrico.

4.7 Parecer de Aprovação do Comitê de Biossegurança e Risco Biológico do *Beckman Research Institute of the City of Hope*

**CITY OF HOPE NATIONAL MEDICAL CENTER
BECKMAN RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF HOPE**

**NOTICE OF
OCCUPATIONAL SAFETY AND BIOHAZARD COMMITTEE (OSBC) ACTION**

TO: Mark Boldin, Ph.D.
Principal Investigator

FROM: Rick Gulizia, B.Sc. 
Director, Office of Laboratory Research Subjects Protection

DATE: March 17, 2014

OSBC PROTOCOL NO.	12014
OSBC PROTOCOL TITLE:	REGULATION OF GENE EXPRESSION IN INFLAMMATION AND CANCER – Continuation with Amendment

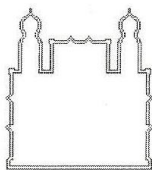
On March 14, 2014, the OSBC reviewed the study named above and took the following action:

DECISION: Protocol Continuation and Amendment Dated 2/15/2014 Approved with Condition.

CONDITION: The TBD lab staff need to complete all safety trainings prior to hands-on involvement in the project.

Provide the Office of Laboratory Research Subjects Protection with an electronic copy of the revised protocol (OSBCeSubmit@coh.org) and a scanned copy with your signature and date of revision.

4.8 Parecer de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 18 de julho de 2005.

PARECER

Título do Projeto: "Novas Abordagens no estudo molecular e genético para compreender a Lesão de Nervo na Hanseníase"

Protocolo CEP: 151/01

Pesquisador Responsável: Euzenir Nunes Sarno

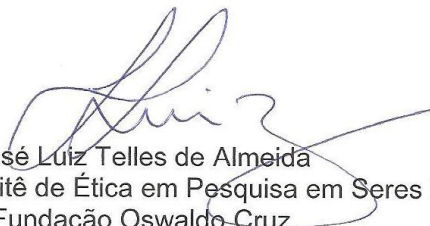
Instituição: IOC

Deliberação: APROVADO

Foi submetido à apreciação do CEP/FIOCRUZ, adendo do projeto supra mencionado.

Por se tratar da continuidade de um projeto com significativa contribuição científica e por não apresentar fatos novos que indiquem desacordos com a Resolução 196/96, foram aprovados o relatório e a emenda.

Informamos, outrossim, que deverão ser apresentados relatórios parciais anuais e relatório final do projeto de pesquisa. Além disso, qualquer modificação ou emenda ao protocolo de pesquisa, deve ser submetida à apreciação do CEP/FIOCRUZ.


José Luiz Telles de Almeida
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
Fundação Oswaldo Cruz