



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



**AVALIAÇÃO DE MicroRNAs REGULADORES DA VIA TLR/NFKB  
EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM ISOLADOS DE *Leishmania  
braziliensis* DERIVADOS DAS FORMAS CLÍNICAS DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

**TAINÃ SOUZA DO LAGO**

**Tese – Doutorado**

**Salvador (Bahia), 2022**



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



---

**TAINÃ SOUZA DO LAGO**

**AVALIAÇÃO DE MicroRNAs REGULADORES DA VIA TLR/NFKB  
EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM ISOLADOS DE *Leishmania  
braziliensis* DERIVADOS DAS FORMAS CLÍNICAS DE  
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.**

Professora-orientadora: Léa Cristina Castellucci

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

**Salvador (Bahia), 2022**

## I. RESUMO

**Introdução:** A leishmaniose é considerada uma das principais doenças tropicais negligenciadas. Ainda não há vacinas aprovadas para imunizar populações endêmicas e as opções terapêuticas de uso corrente são ainda limitadas, o que justifica a necessidade de buscar meios para compreender e lidar com suas manifestações clínicas. Uma abordagem que tem sido explorada em leishmaniose nos últimos anos é a participação dos microRNAs (miRNAs) na regulação de vias chave da resposta imune. Os miRNAs representam uma classe de pequenos RNAs não codificantes que atuam como principais reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. São atualmente reconhecidos por seu importante papel na complexa e plástica interação entre o hospedeiro e os patógenos, seja como parte da resposta imune do hospedeiro para neutralizar a infecção ou como uma estratégia molecular empregada pelo patógeno para modular as vias do hospedeiro em seu próprio benefício. A investigação de miRNAs como agentes eficazes na regulação de tais processos podem ajudar a compreender a biologia e patogenicidade desses parasitas. **Objetivo:** Caracterizar o perfil de expressão de miRNAs de macrófagos derivados de monócitos (MDMs) infectados com isolados das formas clínicas clássicas de LTA: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD), correlacionando-os com a carga parasitária, marcadores imunológicos e genes de morte celular. **Métodos:** Foram utilizadas bases de domínio público para seleção de 12 miRNAs reguladores de genes envolvidos na via TLR/NFκB. Os macrófagos derivados de monócitos foram obtidos de doadores saudáveis e infectados com isolados das diferentes formas clínicas de *L. braziliensis* da área endêmica de Corte de Pedra, BA. O RNA total foi extraído após os tempos de 4h, 12h e 24h de infecção. A quantificação de miRNAs e mRNA foi realizada por RT-qPCR utilizando os métodos SYBR Green e TaqMan®, respectivamente. Dosagens de marcadores imunológicos foram realizados no sobrenadante das culturas pela técnica imunoenzimática ELISA sanduíche, por meio de kits comerciais e a carga parasitária definida por meio de contagem por microscopia. **Resultados:** A partir de 12hs observamos um aumento diferencial na expressão dos miRNAs 103a-3p, -21-3p e 125a-3p nas células hospedeiras infectadas com isolado de LM e dos miRNAs -155-5p, -146a-5p, -132-5p e -147a na infecção com ambos, isolados de LM e LD. Em relação a carga parasitária, nossos dados mostram uma correlação positiva entre os miRNAs -103a-3p, -21-3p, -155-5p, -146a-5p e a infecção com as cepas LM e LD, acrescidos dos -132-5p e -9-3p que foram exclusivos na forma LM. Também obtivemos correlação entre a expressão de alguns miRNAs com os marcadores TNF, CXCL-9 e CXCL-10. Em relação aos genes de morte celular, correlações dos miRNAs com os genes *CFLAR* e *BLC2* ocorreram na LM, assim como dos genes *TNFRSF10A*, *CFLAR* e *GZMB* na LD. **Conclusão:** A expressão dos miRNAs se correlaciona fortemente com carga parasitária, resposta inflamatória e isso possivelmente reflete modulagem dos eventos de morte celular, sugerindo a participação dessas moléculas na patogênese das diferentes formas clínicas da *L. braziliensis*.

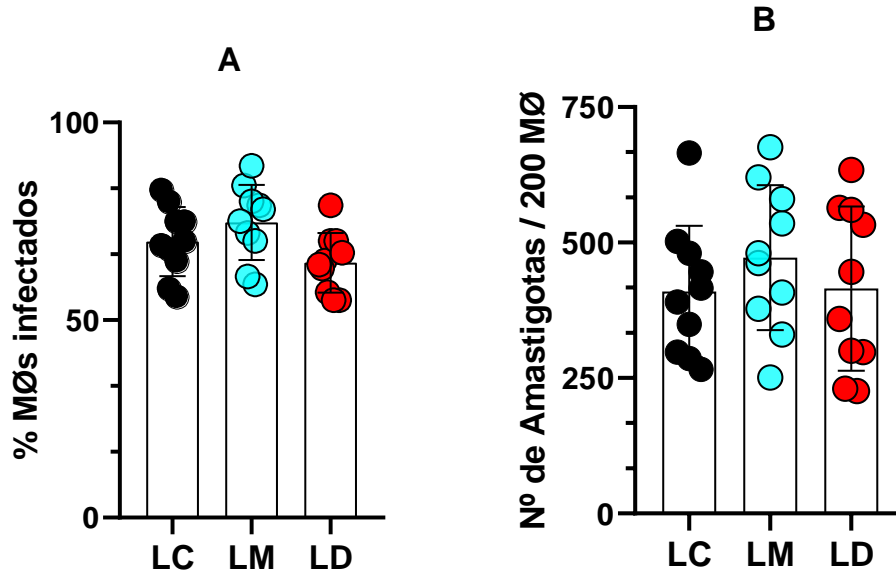
**Palavras-chave:** Leishmaniose, Macrófagos, Genes, miRNAs, Carga parasitária.

## II. ABSTRACT

**Introduction:** Leishmaniasis is considered one of the main neglected tropical diseases. There are no approved vaccines to immunize endemic populations and the current therapeutic options available are still limited, which justifies the need to develop ways to understand and deal with its clinical manifestations. An approach that has been explored in leishmaniasis in recent years is the participation of microRNAs (miRNAs) in the regulation of key pathways of the immune response. miRNAs represent a class of small non-coding RNAs that act as post-transcriptional regulators of gene expression. They are currently recognized for their important role in the complex and plastic interaction between the host and pathogens, either as part of the host's immune response to neutralize the infection or as a molecular strategy employed by the pathogen to modulate host pathways for its own benefit. The investigation of miRNAs as effective agents in the regulation of such processes can help to understand the biology and pathogenicity of these parasites. **Objective:** To characterize the miRNA expression profile of monocyte-derived macrophages (MDMs) infected with isolates of the classic clinical forms of ATL: cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML) and disseminated leishmaniasis (DL), correlating them with the parasite load, immunological markers and cell death genes. **Methods:** Public domain databases were used to select 12 miRNAs that regulate genes involved in the TLR/NF $\kappa$ B pathway. Monocyte-derived macrophages were obtained from healthy donors and infected with isolates of different clinical forms of *L. braziliensis* from the endemic area of Corte de Pedra, BA. Total RNA was extracted after 4h, 12h and 24 hours of infection. The quantification of miRNAs and mRNA was performed by RT-qPCR using the SYBR Green and TaqMan® methods, respectively. Measurements of immunological markers were performed in the culture supernatant by the immunoenzymatic sandwich ELISA technique, using commercial kits and the parasite load defined by microscopy counting. **Results:** after 12 hours infection, we observed a differential increase in the expression of miRNAs 103a-3p, -21-3p and 125a-3p in host cells infected with ML isolate and miRNAs -155-5p, -146a-5p, -132- 5p and -147a with both, ML and DL isolates. Regarding parasite load, our data show a positive correlation between miRNAs -103a-3p, -21-3p, -155-5p, -146a-5p and infection with ML and DL strains, plus -132-5p and -9-3p which were unique to the ML form. We also obtained a correlation between the expression of some miRNAs with TNF, CXCL-9 and CXCL-10. Regarding cell death genes, correlations of miRNAs with CFLAR and BLC2 genes occurred in ML, as well as TNFRSF10A, CFLAR and GZMB genes with DL. **Conclusion:** The expression of miRNAs strongly correlates with parasite load, inflammatory response and this possibly reflects modulation of cell death events, suggesting the participation of these molecules in the pathogenesis of different clinical forms of *L. braziliensis*.

**Keywords:** Leishmaniasis, Macrophages, Genes, miRNAs, Parasite load.

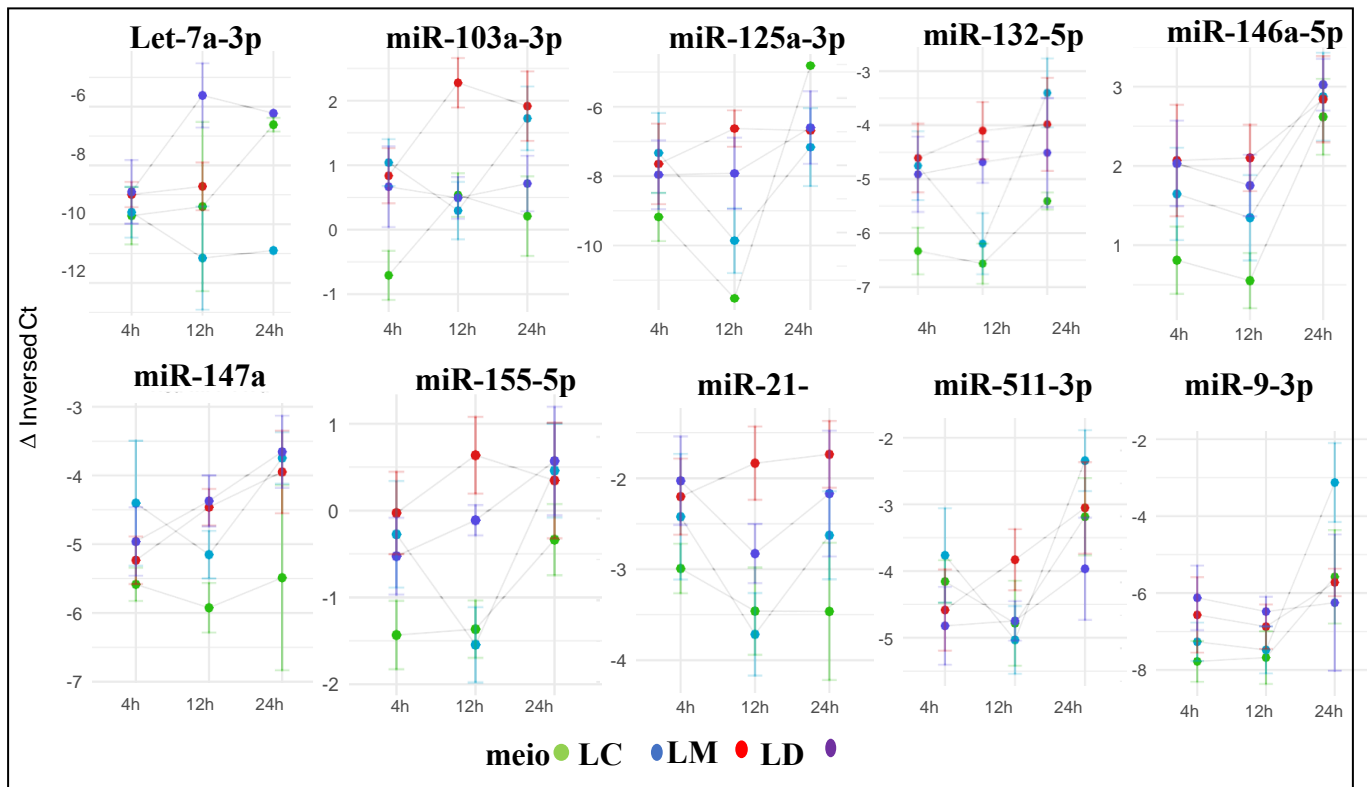
## VI.1 INFEÇÃO DE MACRÓFAGOS HUMANOS COM CEPAS DE *L. braziliensis*



**Figura 7. Carga parasitária em macrófagos infectados por 4 horas, na razão de 5 parasitos para cada célula. (A)** Percentual médio de macrófagos de 10 doadores sadios infectados com cada isolado de *L. braziliensis*. **(B)** O número médio de formas amastigotas de *L. braziliensis* por macrófago infectado. Não há diferença no percentual de Mφ infectados nem no número de amastigotas por 200 Mφ quando as células são infectadas em isolados de LC, LM e LD. Os dados mostram a média ± SD após a quantificação de 200 macrófagos.

**VI.2 Objetivo 1. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNAs EM MACRÓFAGOS INFECTADOS COM ISOLADOS DAS FORMAS CLÍNICAS LC, LM E LD**

**VI.2.1 PERFIL GERAL DE EXPRESSÃO NA AMOSTRA ANALISADA**



**Figura 8. Expressão de miRNAs em macrófagos infectados com diferentes cepas de *L. braziliensis* em diferentes tempos de infecção. Os dados são representados com os valores de  $\Delta Ct$ .**

## VI.2.2 MicroRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS ENTRE AS CEPAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

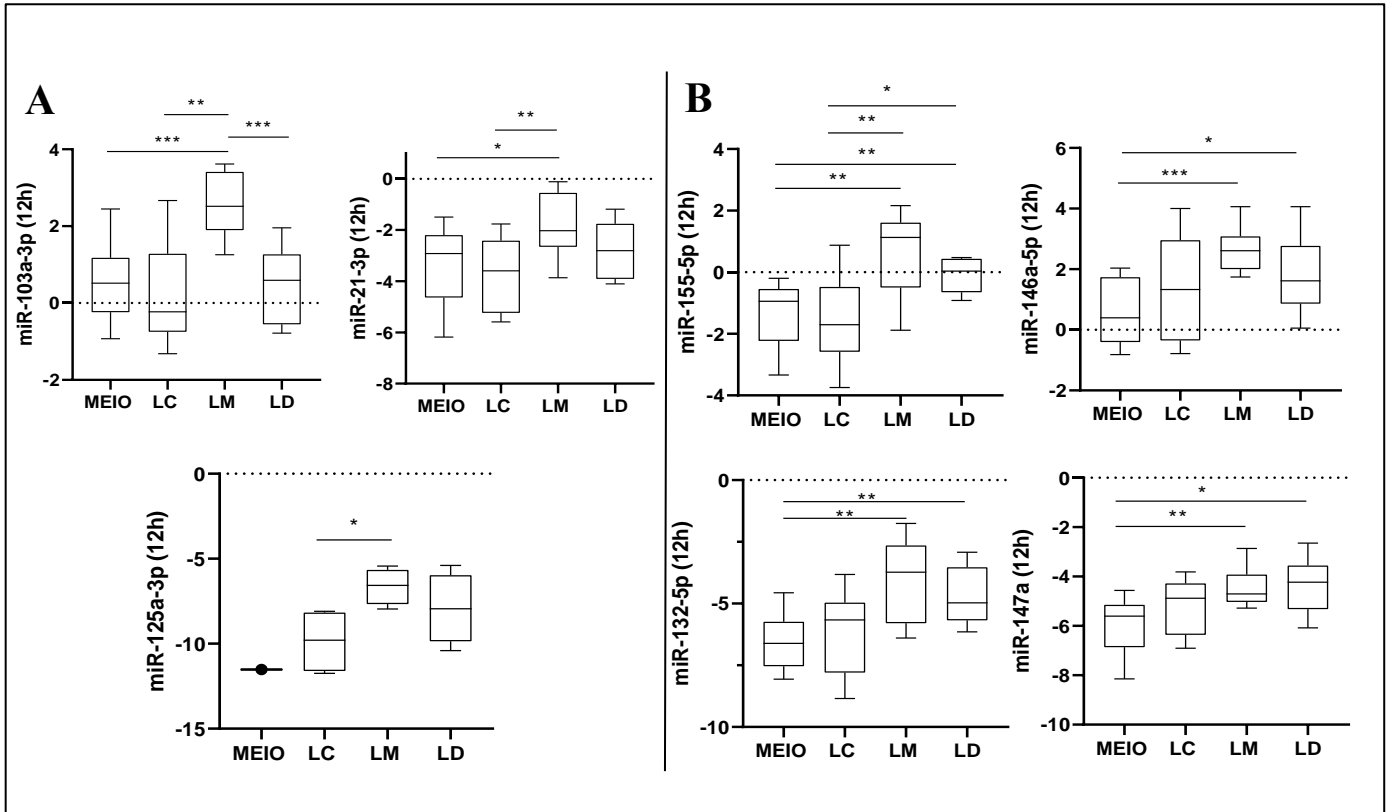
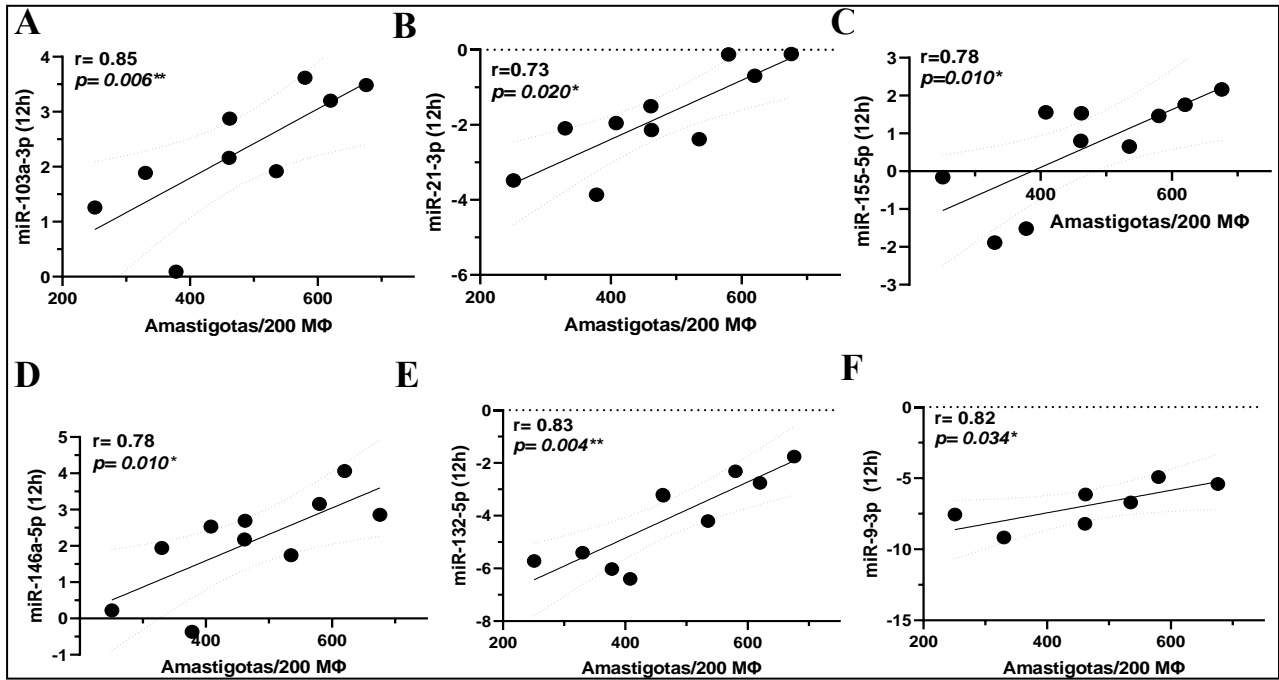


Figura 9. Perfil de expressão de miRNAs reguladores das vias de ativação do TLR/NFkB em MDMs infectados com isolados de *L. braziliensis*. (A) miR-103a-3p, miR-21-3p, miR-125a-3p; (B) miR-155-5p, miR-146a-5p, miR-132-5p e miR-147<sup>a</sup>

**VI.3 Objetivo 2. CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS microRNAs AVALIADOS COM A CARGA PARASITÁRIA DOS MACRÓFAGOS**



**Figura 10. Correlação entre a expressão de miRNAs e carga parasitária em macrófagos derivados de monócitos infectados com isolados de leishmaniose mucosa. (A) miR-103a-3p, (B) miR-21-3p, (C) miR-155-5p, (D) miR-146a-5p, (E) miR-132-5p e (F) miR-9-3p.**



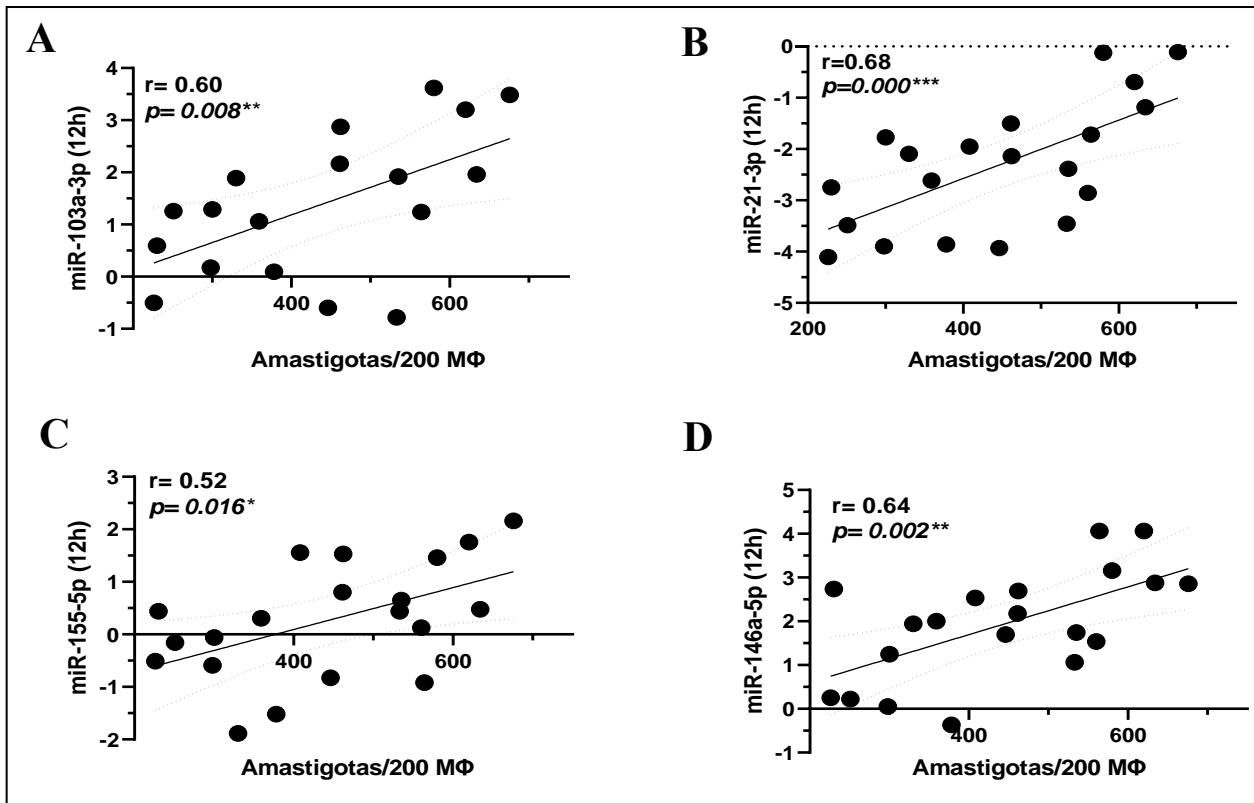
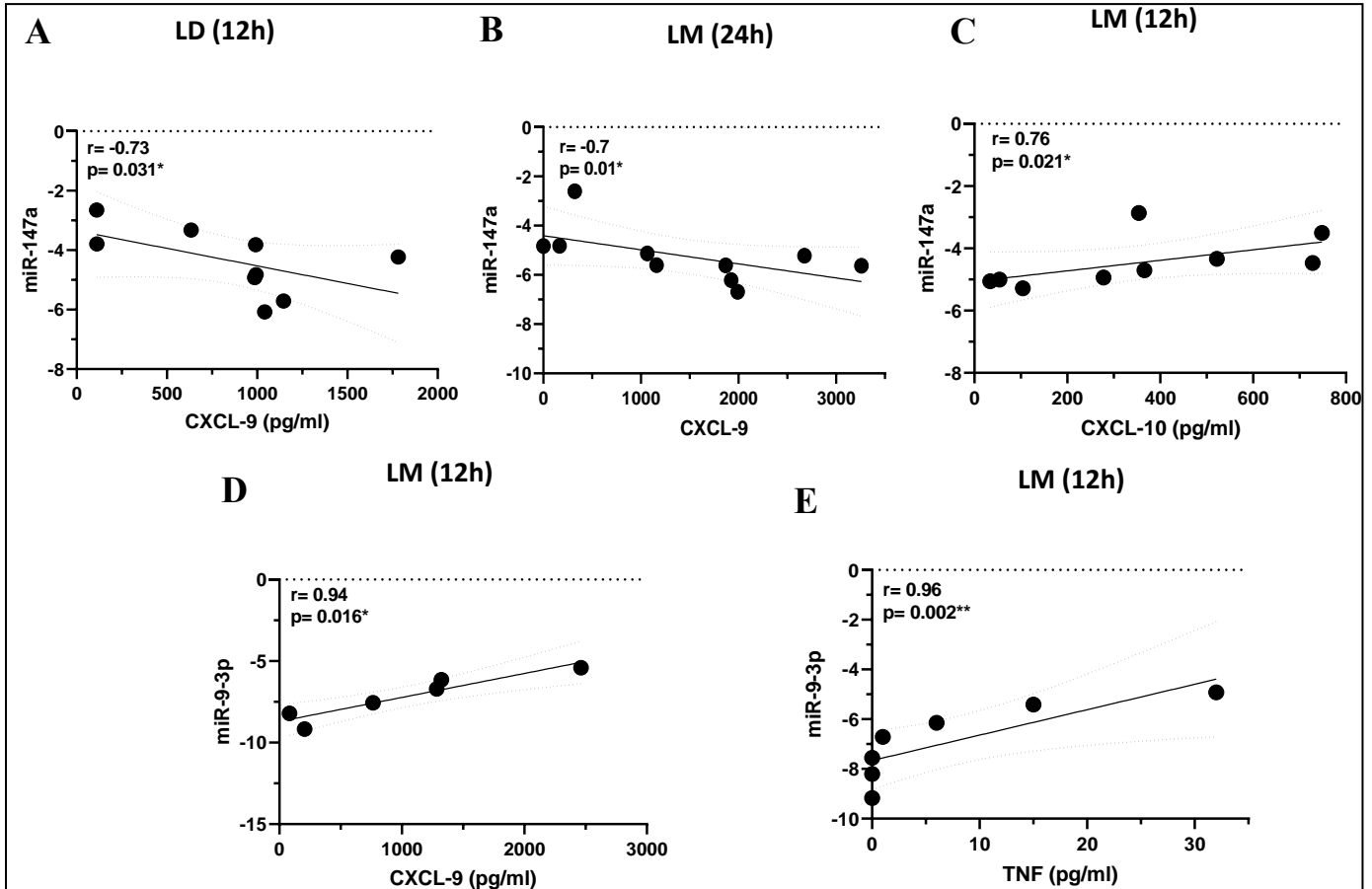


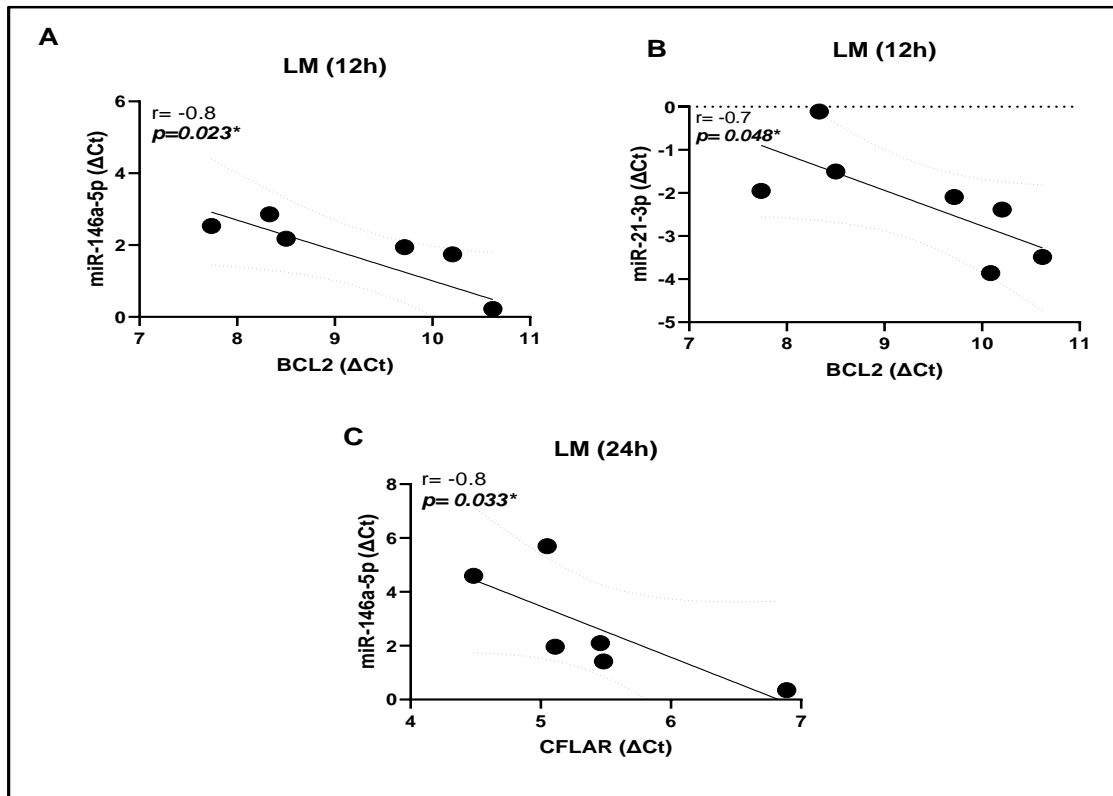
Figura 11. Correlação entre a expressão de miRNAs e carga parasitária em macrófagos derivados de monócitos infectados com isolados de leishmaniose mucosa e disseminada. (A) miR-103a-3p, (B) miR-21-3p, (C) miR-155-5p, (D) miR-146a-5p.

**VI.4 Objetivo 3. CORRELAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS NOS MDMs INFECTADOS COM A EXPRESSÃO DOS microRNAs**

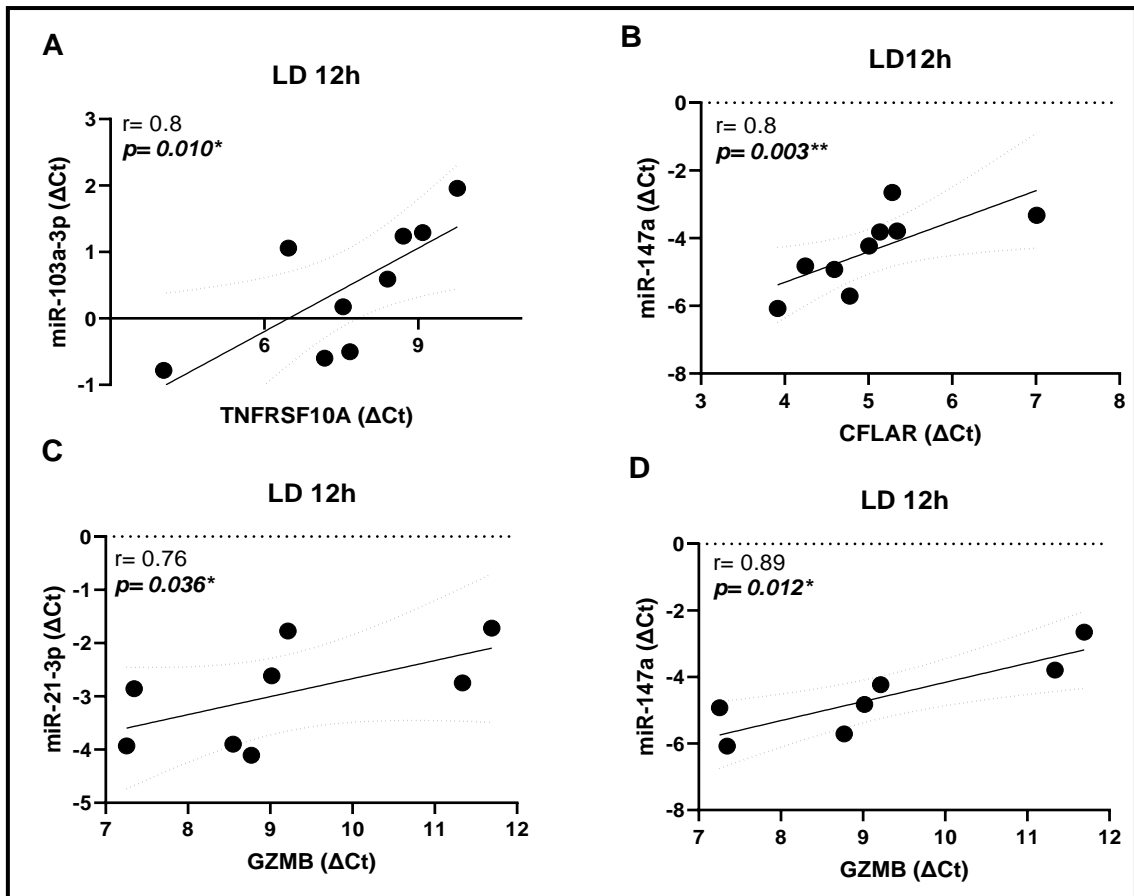


**Figura 12.** Análise de correlação de *Spearman* com 95% de intervalo de confiança referente aos miRNAs 147a e 9-3p e a produção de moléculas pro-inflamatórias.

**VI.5 Objetivo 4. CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES DE MORTE CELULAR E miRNAs NOS MDMs INFECTADOS.**



**Figura 13.** Análise de Correlação de *Spearman* com 95% de intervalo de confiança referente aos miRNAs 146a-5p e 21-3p e a expressão dos genes de morte celular (*BCL2* e *CFLAR*).



**Figura 14.** Análise de Correlação de *Spearman* com 95% de intervalo de confiança referente aos miRNAs 103a-3p, 147a e 21-3p e a expressão dos genes de morte celular (*TNFRSF10A*, *CFLAR* e *GZMB*).

**Anexo 1.** Lista dos miRNAs selecionados para expressão gênica por RT-qPCR e seus respectivos genes alvo.

MiRNA	miRBase	Genes regulados	Sequência do miRNA maduro
hsa-miR-146a-5p	<u>MIMAT0000449</u>	IRAK1 e TRAF6	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
hsa-miR-146b-5p	<u>MIMAT0002809</u>	IRAK1 e TRAF6	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCUG
hsa-miR-147a	<u>MIMAT0000251</u>	TLRs (3, 4 e 7), MYD88, IRAK3, CXCL9, CXCL10, IL6ST, IL17RD, IL17RA e IL17A	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGC
hsa-miR-155-5p	<u>MIMAT0000646</u>	TRAF3, IL6ST, IL6R e IL17RB	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGUU
hsa-miR-9-3p	<u>MIMAT0000442</u>	IRAK3, IL17A, IL17RA e IL6ST	AUAAAGCUAGAUACCGAAAGU
hsa-miR-125a-3p	<u>MIMAT0004602</u>	TLRs (4, 6 e 9), IRF5, IRAK4, IL17RA e IL17RD	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC
hsa-miR-132-5p	<u>MIMAT0004594</u>	TLR4, TRAF3, TRAF6, IL17RB e IL6R	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU
hsa-miR-21-3p	<u>MIMAT00004494</u>	TLRs (3 e 4), IL6ST, IL6R, IL17RD, IL17RA	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
hsa-let-7a-3p	<u>MIMAT00004481</u>	TLR3, IRF5 e CXCL9	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC
hsa-miR-511-3p	<u>MIMAT0026606</u>	TLRs (1,4, 5 e 8), TRAF6, MYD88, IL17RA, IL17RD, IL6ST e CXCL10	AAUGUGUAGCAAAAAGACAGA
hsa-miR-103a-3p	<u>MIMAT0000101</u>	TRAF3	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA

miR= microRNA maduro (sequência madura); hsa= homo sapiens.

**Anexo 3.** Genes envolvidos em vias de morte celular que são regulados pelos miRNAs diferencialmente expressos.

miRNA	GENE	VIAS
103a-3p	CFLAR, MAPK8, <b>ATG12, PIK3C3, BCL2</b>	Apoptose, <b>autofagia</b> , outras vias de morte celular
21-3p	CFLAR, TNFRSF10A, <b>ATG12, BCL2</b>	Apoptose, <b>autofagia</b> , outras vias de morte celular
125a-3p	TRAF2, CFLAR, TNFRSF1B, <b>PIK3C3, GABARAPL1</b>	Apoptose, <b>autofagia</b>
155-5p	TRAF2, CFLAR, XIAP, TNFRSF10A, <b>ULK2, ATG3, PIK3C3, LAMP2</b>	Apoptose, <b>autofagia</b>
146a-5p	CFLAR, TNFRSF1A, TNFRSF10A, TNFRSF10D, <b>ATG7, ATG12</b>	Apoptose, <b>autofagia</b>
147a	CFLAR, TNFRSF10A, <b>ATG12, PIK3C3</b>	Apoptose, <b>autofagia</b>
9-3p	CFLAR, TNFRSF10D, <b>PIK3C3,</b>	Apoptose, <b>autofagia</b>