

## RESUMO

**Introdução:** A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, dermatoneurológica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* e que ainda constitui um desafio de saúde pública em muitos países, incluindo o Brasil. Embora os mecanismos imunopatológicos pelos quais o bacilo continua sendo persistente, ocasionando as formas clínicas complexas da doença e episódios reacionais não sejam totalmente compreendidos, a participação dos receptores do tipo Toll (TLRs) na mediação da resposta inflamatória é amplamente reconhecida. Neste contexto, avaliamos a expressão de miRNAs participantes no controle pós-transcricional das vias dos TLRs em indivíduos com hanseníase. **Materiais e Métodos:** Selecionamos os miRNAs em *softwares* de domínio público (TargetScanHuman e miRBase); realizamos a expressão gênica por PCR em tempo real utilizando 11 ensaios-miRs (146a-5p, 146b-5p, 147a, 155-5p, 9-3p, 125a-3p, 132-5p, 21-3p, let-7a-3p, 511-3p, 103a-3p) e o U6snRNA (RNA nucleolar) em 38 amostras sendo 28 biópsias (14 indivíduos sem reação (SR) e 14 indivíduos reacionais) e 10 amostras de células (4 indivíduos (antes e após Reação Reversa (RR)) e 6 indivíduos (antes e após eritema nodoso hansênico (ENH)); a dosagem de proteínas foi feita pela técnica ELISA sanduíche; após a normalização da expressão gênica pelos genes endógenos pelo programa RefFinder, os dados estatísticos referente as biópsias foram gerados pelo teste t de *Welch* e nas células pelo teste de *Wilcoxon*; já nas análises de citocinas/quimiocinas e do índice bacilar o teste de Correlação de *Spearman*, por meio do GraphPad Prism8. **Resultados:** Em biópsias houve um aumento significativo na expressão do miR-125a-3p em indivíduos PB e ENH, nas comparações (PB vs MB e vs RR; ENH vs MB) e uma correlação <sup>(+)</sup> entre este miR o IB em pacientes reacionais. Para o miR-147a, houve uma correlação <sup>(+)</sup> com IL-8, CXCL-10 e IB em indivíduos SR; também nos SR houve correlação entre o miR-155-5p e CXCL-9 e correlação <sup>(-)</sup> entre o miR-21-3p e IL-1 $\beta$ . Observamos também correlações <sup>(+)</sup> entre os miRs 146b-5p e 132-5p e IB em indivíduos reacionais (RR + ENH). **Conclusões:** Os miRNAs além de associados a formas clínicas, estão correlacionados a marcadores imunológicos e clínicos. Os miRs 125a-3p e 147a parecem ter um papel mais destacado na patogênese.

**Palavras-chave:** 1. Hanseníase; 2. Episódio reacional; 3. Receptores Toll-Like; 4. Expressão de miRNAs; 5. Sorologia.

---

## SUMMARY

**Introduction:** Leprosy is a chronic infectious and dermatological disease caused by the bacillus *Mycobacterium leprae* and still constitutes a public health challenge in many countries, including Brazil. Although the immunopathological mechanisms by which the bacillus continues to be persistent, causing the complex clinical forms of the disease and reaction episodes are not fully understood, the participation of Toll-like receptors (TLRs) in mediating the inflammatory response is widely recognized. In this context, we evaluated the expression of miRNAs participating in the post-transcriptional control of TLRs pathways in individuals with leprosy. **Materials and Methods:** We selected miRNAs in public domain *softwares* (TargetScanHuman and miRBase); we performed gene expression by real time PCR using 11 miR assays (146a-5p, 146b-5p, 147a, 155-5p, 9-3p, 125a-3p, 132-5p, 21-3p, let-7a-3p, 511-3p, 103a-3p) and U6snRNA (nucleolar RNA) in 38 samples, 28 biopsies (14 individuals without reaction (SR) and 14 reaction individuals) and 10 cell samples (4 individuals (before and after Reverse Reaction (RR)) and 6 individuals (before and after leprous nodular erythema (ENL))); protein dosing was performed using the sandwich ELISA technique; after normalization of gene expression using endogenous genes by the RefFinder program, the statistical data referring to biopsies were generated by the *Welch* t test and in the cells by the *Wilcoxon* test; in the analysis of cytokines / chemokines and the bacillary index, the *Spearman* Correlation test, through the GraphPad Prism8. **Results:** In biopsies there was a significant increase in the expression of miR-125a-3p in individuals PB and ENL, in the comparisons (**PB vs MB** and vs RR; **ENH vs MB**) and a correlation<sup>(+)</sup> between this miR and the BI in reactive patients. For miR-147a, there was a<sup>(+)</sup> correlation with IL-8, CXCL-10, and BI in SR individuals; also, in the SR there was a correlation between miR-155-5p and CXCL-9 and a correlation<sup>(-)</sup> between miR-21-3p and IL-1 $\beta$ . We also observed correlations<sup>(+)</sup> between miRs 146b-5p and 132-5p and BI in reactive individuals (RR + ENL). **Conclusions:** In addition to being associated with clinical forms, miRNAs are also correlated with immunological and clinical markers. MiRs 125a-3p and 147a appear to have a more prominent role in pathogenesis.

**Keywords:** 1. Hansen's disease; 2. Reaction episode; 3. Toll-Like receptors; 4. Expression of miRNAs; 5. Serology.

## RESULTADOS

**Tabela 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	UGAGAACUGAAUCCAUGGCUG
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	UUAUAGCUAAUCGUGAUAGGGGUU
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

**Fonte:** TargetScanHuman (release7.1-<http://www.targetscan.org/>) e miRBase (release 21-<http://www.mirbase.org/>). **miR**= microRNA maduro (sequência madura); **hsa**= homo sapiens. Atualizado: setembro / 2020.

**Tabela 2.** Valores normalizados de expressão gênica de amostras de biópsias de lesão de indivíduos sem reação MB (n=7) *versus* PB (n=7).

transcrito	logfc	mediaMB	mediaPB	p.value	conf.low	conf.high	método
let-7a-3p	0,64	-6,81	-7,45	0,6314	-9,14	10,42	Welch Two Sample t-test
mir-132-5p	-0,37	-6,90	-6,53	0,5960	-2,32	1,58	Welch Two Sample t-test
mir-103a-3p	0,46	-0,41	-0,87	0,6925	-2,05	2,96	Welch Two Sample t-test
mir-146b-5p	0,44	1,65	1,20	0,7121	-2,15	3,03	Welch Two Sample t-test
mir-9-3p	-0,58	-6,23	-5,65	0,4690	-2,34	1,18	Welch Two Sample t-test
mir-21-3p	-0,57	-5,56	-4,98	0,4599	-2,30	1,15	Welch Two Sample t-test
<b>mir-125a-3p</b>	<b>-1,59</b>	-6,98	-5,38	<b>0,0078</b>	-2,67	-0,51	Welch Two Sample t-test
mir-147a	0,43	-6,47	-6,90	0,6306	-1,70	2,57	Welch Two Sample t-test
mir-155-3p	0,66	-0,25	-0,91	0,5825	-1,94	3,27	Welch Two Sample t-test

**Tabela 3.** Valores normalizados de expressão gênica de amostras de biópsias de lesão de indivíduos sem reação PB (n=7) *versus* reação RR (n=6).

transcrito	logfc	mediaPB	mediaRR	p.value	conf.low	conf.high	método
let-7a-3p	-0,37	-7,45	-7,07	0,7709	-8,20	7,45	Welch Two Sample t-test
mir-132-5p	-0,44	-6,53	-6,09	0,6809	-4,34	3,46	Welch Two Sample t-test
mir-103a-3p	0,98	-0,87	-1,85	0,5815	-3,03	4,99	Welch Two Sample t-test
mir-146b-5p	2,56	1,20	-1,36	0,2535	-2,24	7,37	Welch Two Sample t-test
mir-9-3p	0,24	-5,65	-5,89	0,8724	-3,72	4,21	Welch Two Sample t-test
mir-21-3p	0,34	-4,98	-5,32	0,5309	-0,85	1,53	Welch Two Sample t-test
<b>mir-125a-3p</b>	<b>1,66</b>	-5,38	-7,04	<b>0,0050</b>	0,63	2,69	Welch Two Sample t-test
mir-147a	0,72	-6,90	-7,62	0,6920	-4,42	5,86	Welch Two Sample t-test
mir-155-3p	0,55	-0,91	-1,47	0,7171	-2,79	3,90	Welch Two Sample t-test

**Tabela 4.** Valores normalizados de expressão gênica de amostras de biópsias de lesão de indivíduos com reação ENH (n=8) *versus* sem reação MB (n=7)

transcrito	logfc	mediaENH	mediaMB	p.value	conf.low	conf.high	método
let-7a-3p	-0,75	-7,55	-6,81	0,2543	-2,17	0,68	Welch Two Sample t-test
mir-132-5p	1,29	-5,61	-6,90	0,2837	-1,35	3,92	Welch Two Sample t-test
mir-103a-3p	0,24	-0,17	-0,41	0,8684	-2,88	3,37	Welch Two Sample t-test
mir-146b-5p	0,66	2,31	1,65	0,6147	-2,17	3,49	Welch Two Sample t-test
mir-9-3p	1,06	-5,17	-6,23	0,3264	-1,24	3,35	Welch Two Sample t-test
mir-21-3p	1,25	-4,30	-5,56	0,3271	-1,46	3,97	Welch Two Sample t-test
<b>mir-125a-3p</b>	<b>1,73</b>	-5,25	-6,98	<b>0,0028</b>	0,75	2,71	Welch Two Sample t-test
mir-147a	0,53	-5,94	-6,47	0,6778	-2,36	3,41	Welch Two Sample t-test
mir-155-3p	0,06	-0,19	-0,25	0,9487	-1,98	2,11	Welch Two Sample t-test

**Tabela 5.** Valores normalizados de expressão gênica de amostras de biópsias de lesão de indivíduos sem reação PB + MB (n=14) *versus* com reação RR + ENH (n=14)

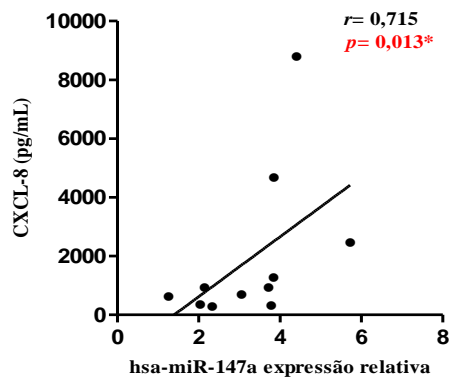
transcrito	logfc	PB_MB	RR_ENL	p.value	conf.low	conf.high	método
let-7a-3p	0,40262	-6,99095	-7,39357	0,416959	-0,63026	1,435498	Welch Two Sample t-test
mir-132-5p	-0,94862	-6,73833	-5,78972	0,212662	-2,52983	0,632595	Welch Two Sample t-test
mir-103a-3p	0,272368	-0,66918	-0,94154	0,800329	-1,94818	2,492916	Welch Two Sample t-test
mir-146b-5p	0,658753	1,393471	0,734718	0,605333	-1,95543	3,272932	Welch Two Sample t-test
mir-9-3p	-0,50568	-5,94141	-5,43572	0,532155	-2,19001	1,178643	Welch Two Sample t-test
mir-21-3p	-0,54304	-5,26978	-4,72674	0,457444	-2,04641	0,960325	Welch Two Sample t-test
<b>mir-125a-3p</b>	-0,1236	-6,11831	-5,9947	0,79324	-1,08796	0,840756	Welch Two Sample t-test
mir-147a	-0,22013	-6,66453	-6,44439	0,829186	-2,39432	1,954047	Welch Two Sample t-test
mir-155-3p	0,113393	-0,6068	-0,72019	0,893774	-1,62429	1,851072	Welch Two Sample t-test

**Tabela 6.** Valores de expressão gênica de miRNAs normalizados de amostras de células (PBMCs) de indivíduos sem reação (PB e MB) e episódio reacional (RR e ENH).

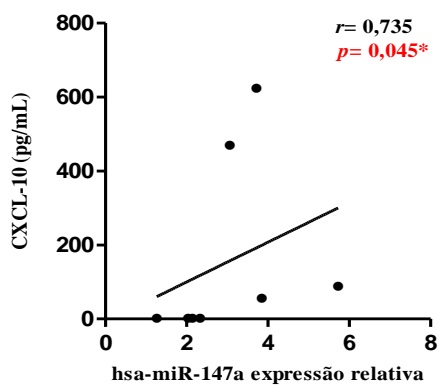
miRNA	p.value	Método	Alternativa
miR-103a-3p	0,193359375	Wilcoxon signed rank test	two.sided
miR-146b-5p	0,193359375	Wilcoxon signed rank test	two.sided
miR-155-3p	0,130859375	Wilcoxon signed rank test	two.sided
miR-146a-5p	0,10546875	Wilcoxon signed rank test	two.sided

**Figura 1 (a, b, c, d)** - Análise no soro por ELISA com indivíduos (PB + MB).

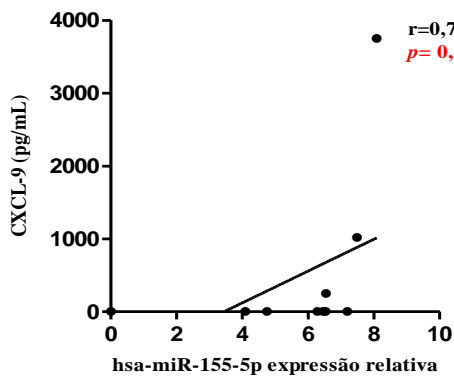
**a)**



b)

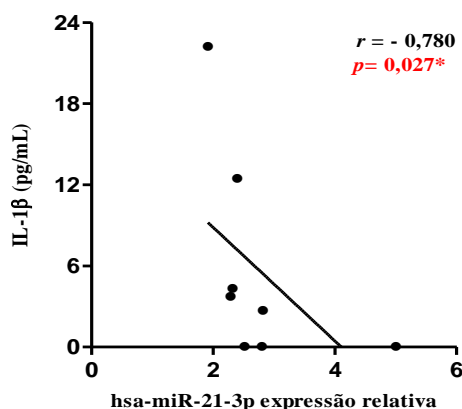


c)



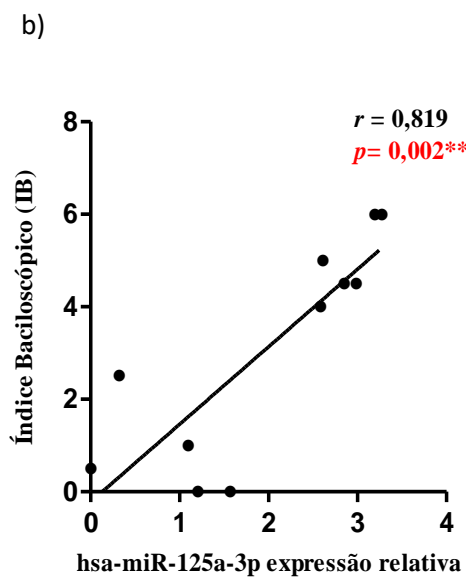
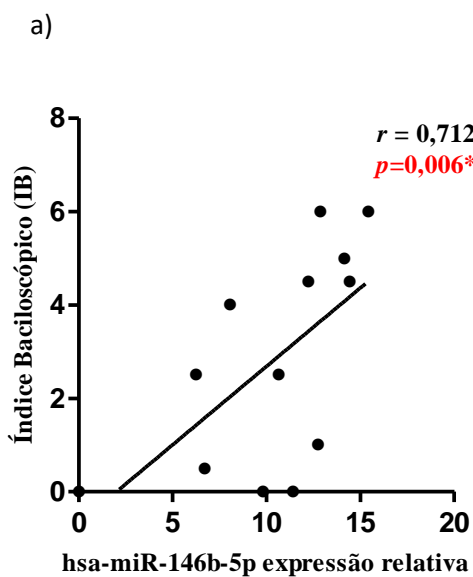
**Figuras 11 (a, b e c).** Análise de correlação positiva em amostras de biópsias de lesão de indivíduos sem reação (PB + MB) entre a expressão relativa do miR-147a e as quimiocinas CXCL-8 e CXCL-10 (a e b), respectivamente; e entre o miR-155-5p e a quimiocina CXCL-9 (c). Os dados foram analisados utilizando o teste de correlação de *Spearman*, pelo software GraphPad Prism, onde o  $r \geq 0,7$  foi considerado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

d)

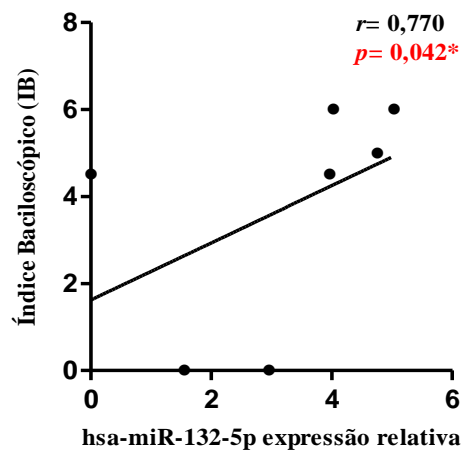


**Figura 11d.** Análise de correlação negativa em amostras de biópsias de lesão ativa de indivíduos sem reação (PB +MB) entre a expressão relativa do miR-21-3p e a IL-1 $\beta$ . Os dados foram analisados utilizando o teste de Correlação de *Spearman*, pelo software GraphPad Prism, onde o  $r \geq 0,7$  foi considerado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

**Figuras 2 (a, b e c).** Análise de correlação entre expressão de miRNAs e índice bacilar de amostras de biópsias.

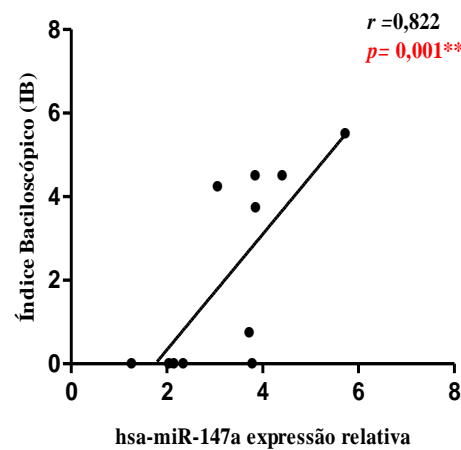


c)



**Figuras 12 (a, b e c).** Análise de correlação positiva em amostras de biópsias de lesão ativa de indivíduos reacionais (RR + ENH) entre o índice bacilar e a expressão relativa do miR-146b-5p (a), miR-125a-3p (b) e miR-132-5p (c). Os dados foram analisados utilizando o teste de Correlação de *Spearman*, pelo software GraphPad Prism, onde o  $r \geq 0,7$  foi considerado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

d)



**Figura 12d.** Análise de correlação positiva em amostras de biópsias de lesão ativa de indivíduos sem reação (PB + MB) entre o índice bacilar e a expressão relativa do miR-147a (d). Os dados foram analisados utilizando o teste de Correlação de *Spearman*, pelo software GraphPad Prism, onde o  $r \geq 0,7$  foi considerado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



