

Avaliação de microRNAs (miRNAs) ligados à via dos TLRs e sua correlação com genes de morte celular em biópsias de pacientes com hanseníase.

Lucas de Oliveira Neves de Farias, Léa Cristina Castellucci, Paulo Roberto Lima Machado

RESUMO

Introdução: A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*. Cerca de 30-40% dos pacientes desenvolvem episódios inflamatórios súbitos e agudos, as chamadas reações hansênicas. Estudos anteriores mostraram uma série de miRNAs associados aos fenótipos da hanseníase, evidenciando o papel desse mecanismo epigenético na patogênese da doença. **Objetivo:** Esse trabalho teve como objetivos avaliar a correlação de miRNAs previamente associados à hanseníase com genes ligados à apoptose e autofagia em lesões de pacientes com hanseníase, comparar o padrão de expressão dos genes em biópsias de pacientes com e sem reações e descrever o perfil clínico e epidemiológico de pacientes com hanseníase, atendidos em centros de referência do estado da Bahia, HUPES-AMN e ICOM. **Métodos:** Biópsias de 28 pacientes com e sem reações hansênicas, com as diversas formas clínicas da hanseníase foram recrutados. Para fins de análise, estes pacientes foram alocados de acordo com a classificação da OMS como paucibacilares (PB) ou multibacilares (MB), e separados em pacientes com ou sem reações. Foram utilizadas amostras de RNA contidas em nosso biorepositório, extraídas pelo método do utilizando *TRIzol® Reagente* (Ambion®). A obtenção de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit comercialmente disponível High Capacity (ThermoFisher). Os genes foram escolhidos por serem importantes em processos de morte celular e serem regulados pelos miRNAs previamente analisados pelo grupo. Expressão gênica pelo método de qPCR em tempo real por TaqMan® foi realizada e os dados analisados comparando-se o ciclo limiar (Ct) entre grupos de amostras. A análise de correlação entre genes e miRNAs foi realizada por meio do teste de Correlação de Spearman, utilizando GraphPad Prism8. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p ficou abaixo de 0,05 ($p < 0,05$). O banco de dados clínico-epidemiológico dos pacientes foi analisado através do programa R para Windows, versão 4.2.3 e os dados apresentados por tabelas. **Resultados:** Foi avaliado por qPCR a expressão dos genes *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR* e *STX7* e comparada a expressão entre pacientes sem reação (PB + MB) e pacientes com reação, (RR e ENH) e não houve associação estatisticamente significativa nesta comparação. Nossos resultados mostraram uma correlação entre os miRNAs e os genes *ATG12* (miR-125a-3p), *TNFRSF10A* (miR-146b-5p), *PARK2*, *CFLAR* e *STX7* (miR-132-5p). Na análise epidemiológica, observamos que a forma MB é mais predominante no sexo masculino e que formas doença dentro deste espectro são mais propensas ao desenvolvimento de reações, assim como atinge pacientes com menor nível educacional e econômico. **Conclusão:** Reforçamos um papel para esses miRNAs na patogênese da hanseníase, influenciando mecanismos como apoptose e autofagia na pele; A forma MB da doença ocorre dentro de um contexto social de maior vulnerabilidade social se comparado aos pacientes PB.

Palavras-chave: miRNAs, Gene, hanseníase, ATG12, TNFRSF10A, PARK2, BCL2, CFLAR, STX7.

Evaluation of microRNAs (miRNAs) linked to the TLR pathway and its correlation with cell death genes in biopsies of leprosy patients.

ABSTRACT

Introduction: Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. About 30-40% of patients develop sudden and acute inflammatory episodes, the so-called leprosy reactions. Previous studies have shown a series of miRNAs associated with leprosy phenotypes, evidencing the role of this epigenetic mechanism in the pathogenesis of the disease. **Objective:** This study aimed to evaluate the correlation of miRNAs previously associated with leprosy with genes linked to apoptosis and autophagy in lesions of patients with leprosy, compare the expression pattern of genes in biopsies of patients with and without reactions and describe the clinical profile and epidemiological analysis of patients with leprosy treated at reference centers in the state of Bahia, HUPES-AMN and ICOM. **Methods:** Biopsies of 28 patients with and without leprosy reactions, with different clinical forms of leprosy were recruited. For analysis purposes, these patients were allocated according to the WHO classification as paucibacillary (PB) or multibacillary (MB), and separated into patients with or without reactions. RNA samples contained in our biorepository were used, extracted by the method using TRIzol® Reagent (Ambion®). Obtaining complementary DNA (cDNA) was performed using the commercially available High Capacity kit (ThermoFisher). The genes were chosen because they are important in cell death processes and are regulated by the miRNAs previously analyzed by the group. Gene expression by real-time qPCR method by TaqMan® was performed and the data analyzed by comparing the threshold cycle (Ct) between groups of samples. Correlation analysis between genes and miRNAs was performed using the Spearman Correlation test, using GraphPad Prism8. Differences were considered significant when the p-value was below 0.05 ($p < 0.05$). The patients' clinical-epidemiological database was analyzed using the R program for Windows, version 4.2.3 and the data presented in tables. **Results:** The expression of the genes ATG12, TNFRSF10A, PARK2, BCL2, CFLAR and STX7 was evaluated by qPCR and the expression between patients without reaction (PB + MB) and patients with reaction (RR and ENH) was compared and there was no statistically significant association in this comparison. Our results showed a correlation between miRNAs and ATG12 (miR-125a-3p), TNFRSF10A (miR-146b-5p), PARK2, CFLAR and STX7 (miR-132-5p) genes. In the epidemiological analysis, we observed that the MB form is more prevalent in males and that disease forms within this spectrum are more prone to the development of reactions, as well as affecting patients with lower educational and economic levels. **Conclusion:** We reinforce a role for these miRNAs in the pathogenesis of leprosy, influencing mechanisms such as apoptosis and autophagy in the skin; The MB form of the disease occurs within a social context of greater social vulnerability compared to PB patients.

Keywords: miRNAs, Gene, leprosy, ATG12, TNFRSF10A, PARK2, BCL2, CFLAR, STX7.

Tabela 1**Características clínico-epidemiológicas dos pacientes matriculados no****HUPES-UFBA e Couto Maia**

	NÃO REACIONAL (n=14)	REACIONAL (n=14)
Idade (média ± DP*)	47,78 ± 16,65	44 ± 16,35
Sexo, %		
Masculino	M* = 8/14 (57,14%)	M* = 9/14 (64,3%)
Feminino	F* = 6/14 (42,86%)	F* = 5/14 (35,7%)
Fenótipo clínico		
Paucibacilar (PB), %		
Tuberculoide (TT)	3/7 (42,86%)	0/0
<i>Borderline</i> Tuberculoide (BT)	4/7 (57,14%)	1/6 (16,7%) (RR*)
Multibacilar (MB), %		
<i>Borderline Borderline</i> (BB)	1/7 (14,3%)	4/6 (66,6%) (RR*)
<i>Borderline</i> Lepromatosa (BL)	1/7 (14,3%)	1/6 (16,7%) (RR*)
Lepromatosa (LL)	5/7 (71,4%)	1/8 (12,5%) (ENH*) 7/8 (87,5%) (ENH*)
Pacientes com reação hansênica, %		6 (RR*) 8 (ENH*)
Índice baciloscópico (Mediana, IQ*)	0 (0-4,3)	2,5 (0,2-4,7)

M*: Masculino; **F***: Feminino; **RR***: Reação Reversa; **ENH***: Eritema Nodoso Hansênico;
DP: Desvio Padrão; **IQ***: Intervalo interquartil.

FIGURA 6 - Expressão dos genes ligados a processos de morte celular avaliados no estudo.

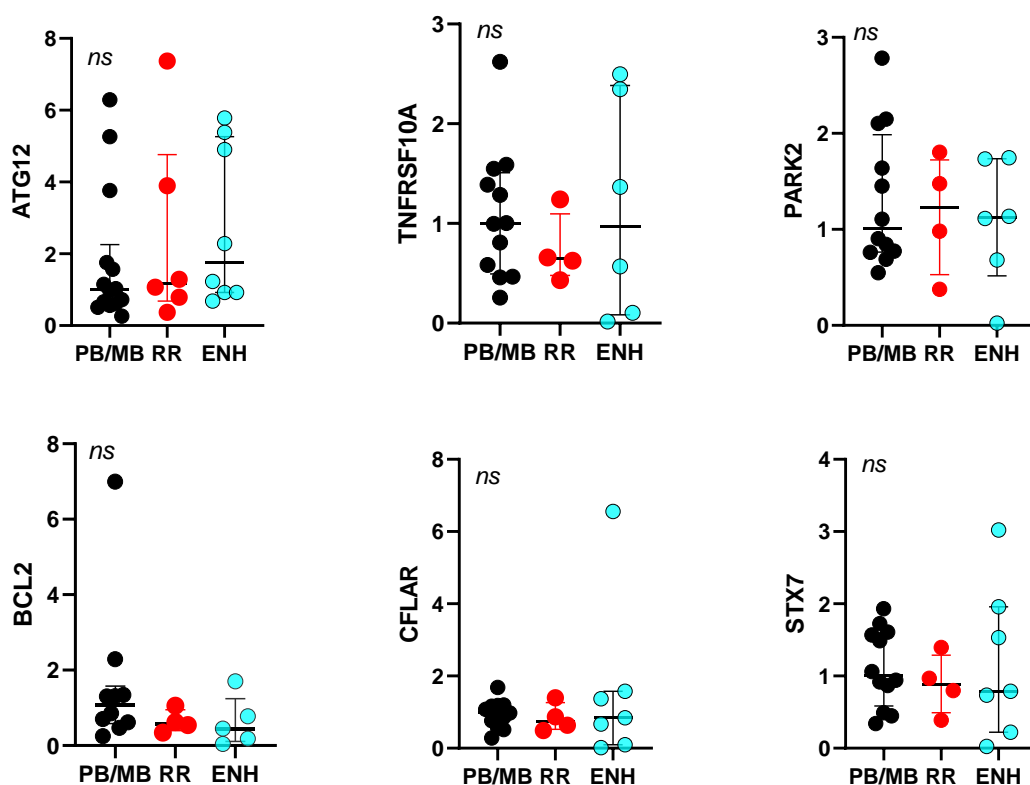


Figura 6 - *Boxplots* representando os valores de expressão dos genes *ATG12*, *TNFRSF10A*, *PARK2*, *BCL2*, *CFLAR* e *STX7* em biópsias. Os grupos analisados foram os indivíduos sem reação (PB/MB) contra indivíduos com RR e ENH. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p \geq 0,05$, *GraphPad Prism 8*.

Figura 7 Correlação entre os miRNAs e os genes

Figura 7. A

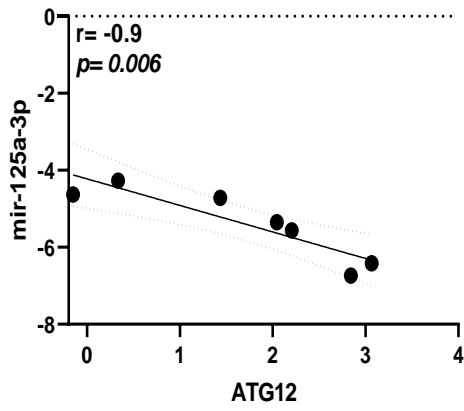


Figura 7. B

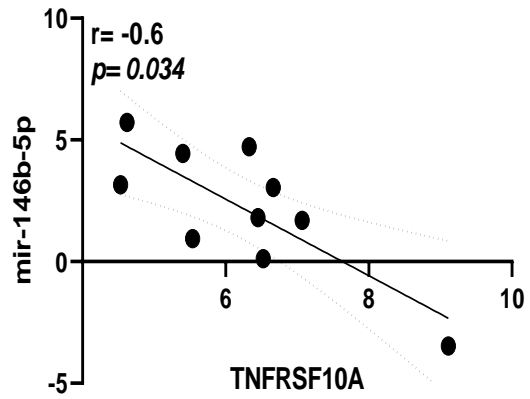


Figura 7. C

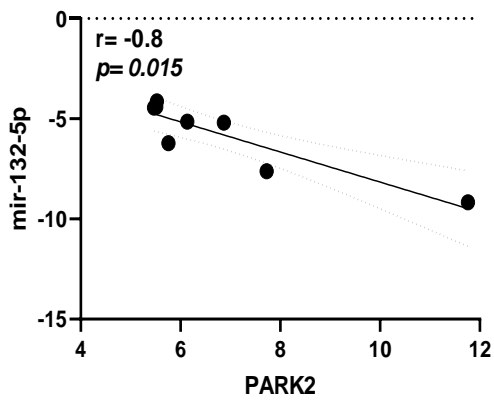


Figura 7. D

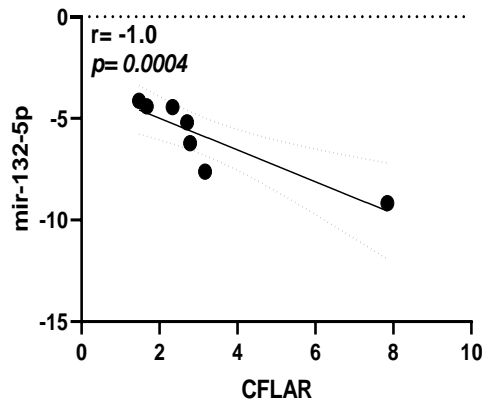


Figura 7. E

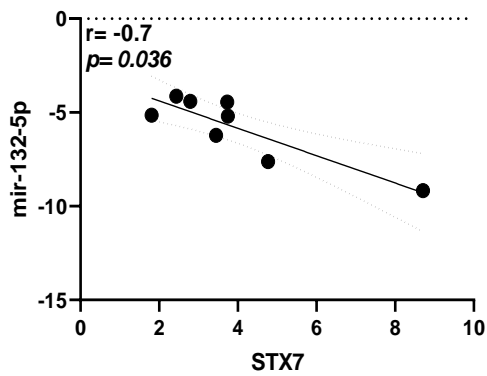


Tabela 2

Características clínico-epidemiológicas do banco de dados dos pacientes matriculados no

Figura 7.A a E - Análise de correlação entre a expressão relativa de miR-125a-3p e ATG12 (A), miR-146b-5p e TNFRSF10A (B) e miR-132-5p com PARK2 (C), CFLAR (D) e STX7(E) em biópsias de indivíduos LR (RR + ENH). Dados analisados pelo teste de Correlação de Spearman, utilizando o software GraphPad Prism, onde foi considerado $r \geq 0,7$. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

HUPES-UFBA e Couto Maia

	MB	PB
Sexo, %; p = 2.338e-15		
Masculino	224/323 (69,3%)	87/242 (36%)
Feminino	99/323 (30,7%)	155/242 (64%)

Doenças associadas a hanseníase

	MB	PB
Alergia, %; p = 0,03021		
Sim	51/312 (16,3%)	57/238 (23,9%)
Não	261/312 (83,7%)	181/238 (76,1%)
Diabetes, %; p = 0,663		
Sim	32/316 (10,1%)	21/238 (8,8%)
Não	284/316 (89,9%)	217/238 (91,2%)
Has, %; p = 0,0701		
Sim	66/315 (21%)	66/238 (27,7%)
Não	249/315 (79%)	172/238 (72,3%)

Índice Bacilar (IB)

	MB	PB
Baixo, %; p = 0,0109		
Negativo	1/19 (5,3%)	9/22 (40,9%)
Baixo (IB < 2)	18/19 (94,7%)	13/22 (59,1%)
Médio, %; p = 0,0001191		
Negativo	1/10 (10%)	9/9 (100%)
Médio (IB 2,1 - 4)	9/10 (90%)	0/9 (0%)
Alto, %; p = 0,0004114		
Negativo	1/9 (11,1%)	9/9 (100%)
Alto (IB > 4)	8/9 (88,9%)	0/9 (0%)

Reações Hansenícas

	MB	PB
RR, %; p = 0,001106		
Sem Reação	102/170 (60%)	182/241 (75,5%)
Reação Reversa	68/170 (40%)	59/241 (24,5%)
ENH, %; p = 2.2e-16		
Sem Reação	102/232 (44%)	182/183 (99,5%)
ENH	130/232 (56%)	1/183 (0,5%)

RR e ENH, %; p = 2.849e-10

Sem Reação	102/125 (81,6%)	182/182 (100%)
RR e ENH	23/125 (18,4%)	0/182 (0%)

Uso de Corticoides durante as reações hansenícas

	MB	PB
Prednisona, %; p = 0,00001358		
Sim	103/320 (32,2%)	38/236 (16,1%)
Não	217/320 (67,8%)	198/236 (83,9%)
Talidomida, %; p = 2.2e-16		
Sim	73/319 (22,9%)	1/237 (0,4%)
Não	246/319 (77,1%)	236/237 (99,6%)

Dados Familiares

	MB	PB
Escolaridade, %; p = 0,000001608		
SE a 2°GI	223/316 (70,6%)	119/237 (50,2%)
2°GC a 3°GC	93/316 (29,4%)	118/237 (49,8%)
Renda Familiar, %; p = 0,01276		
≤ 1 SM	133/313 (42,5%)	75/236 (31,8%)
> 1SM	180/313 (57,5%)	161/236 (68,2%)
Hanseníase na Família, %; p = 0,03914		
Sim	80/313 (25,6%)	43/238 (18,1%)
Não	233/313 (74,4%)	195/238 (81,9%)
Número de casos na Família, %; p = 1		
0 a 1	50/74 (67,6%)	27/40 (67,5%)
2 a 6	24/74 (32,4%)	13/40 (32,5%)
Hanseníase Residência, %; p = 1		
Sim	45/314 (14,3%)	34/237 (14,3%)
Não	269/314 (85,7%)	203/237 (85,7%)
Número de casos na Residência, %; p = 0,3037		
0 a 1	27/41 (65,9%)	25/32 (78,1%)
2 a 6	14/41 (34,1%)	7/32 (21,9%)

MB: Multibacilar; **PB:** Paucibacilar; **RR:** Reação Reversa; **ENH:** Eritema Nodoso Hansênico; **IB:** Índice Bacilar
SM: Salário Mínimo; **HAS:** Hipertensão Arterial Sistêmica; **SE:** Sem Escolaridade; **GI:** Grau Incompleto;
GC: Grau Completo