



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



TAINÃ SOUZA DO LAGO

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

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2018



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



TAINÃ SOUZA DO LAGO

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

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

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

Salvador (Bahia), 2018

I. RESUMO

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

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

IX. SUMMARY

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

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

VI. RESULTADOS GERAIS

VI.1. Características clínico-epidemiológicas da população estudada

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

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

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

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

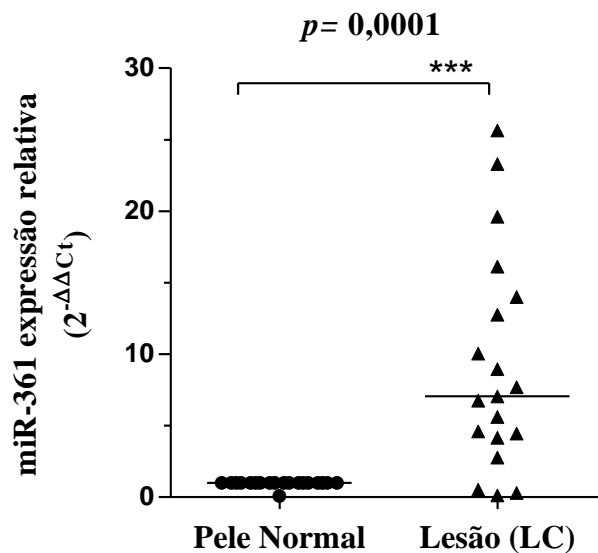
Tabela 3 – Lista dos miRNAs selecionados para análise por qPCR e seus respectivos genes alvo

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

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

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

A



B

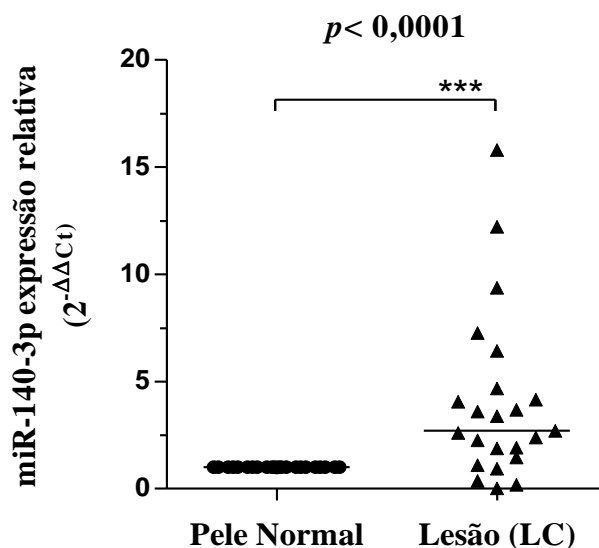
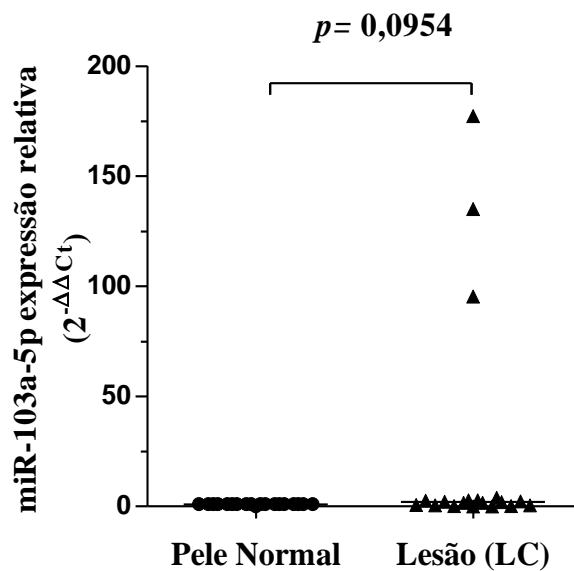


Figura 6. Comparação da expressão relativa dos miR-361-3p (A) e miR-140-3p (B) em amostras de pele lesionada e amostras de pele normal de pacientes de LC. Avaliação por qPCR. Todos os valores foram representados em unidades de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) da lesão em relação à pele normal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

A



B

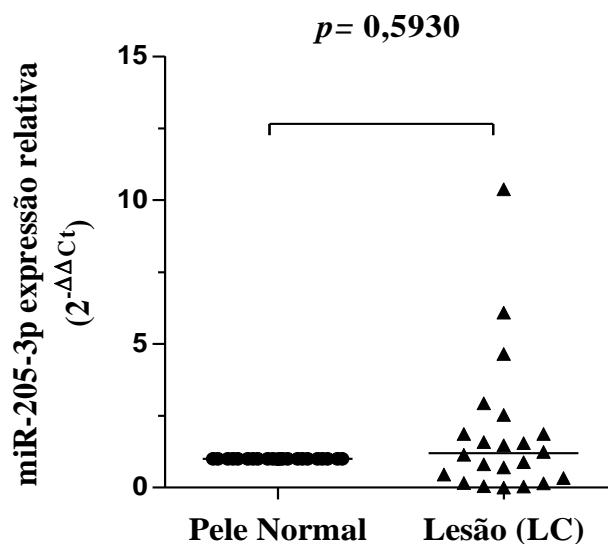


Figura 7. Comparação da expressão relativa dos miR-103a-2-5p (A) e miR-205-3p (B) em amostras de pele lesionada e amostras de pele normal de pacientes de LC. Avaliação por qPCR em tempo real. Todos os valores foram representados em unidades de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) da lesão em relação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

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

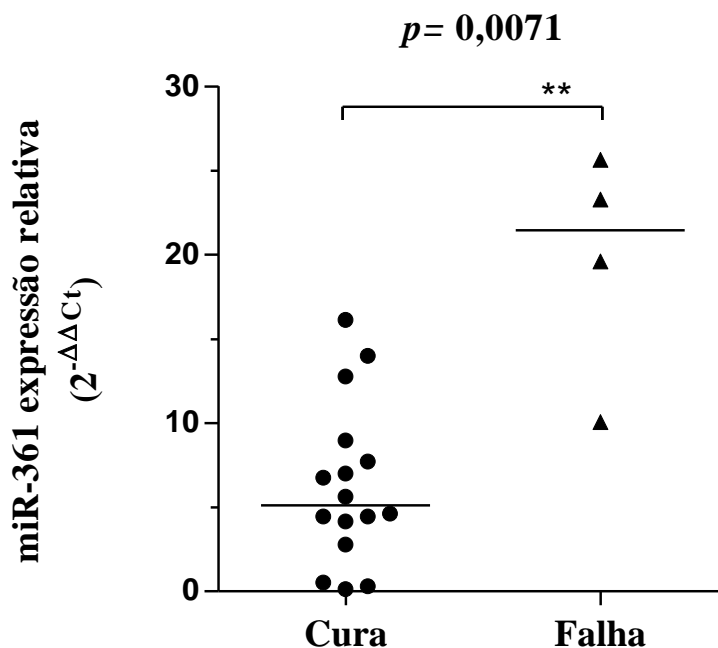


Figura 8. Associação entre o número de cursos de antimonial pentavalente e expressão do miR-361-3p. Os pacientes elencados no grupo “cura” são aqueles que tomaram apenas um curso de tratamento e cicatrizaram suas lesões em até 90 dias. Os pacientes do grupo “falha” precisaram de dois ou mais cursos de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

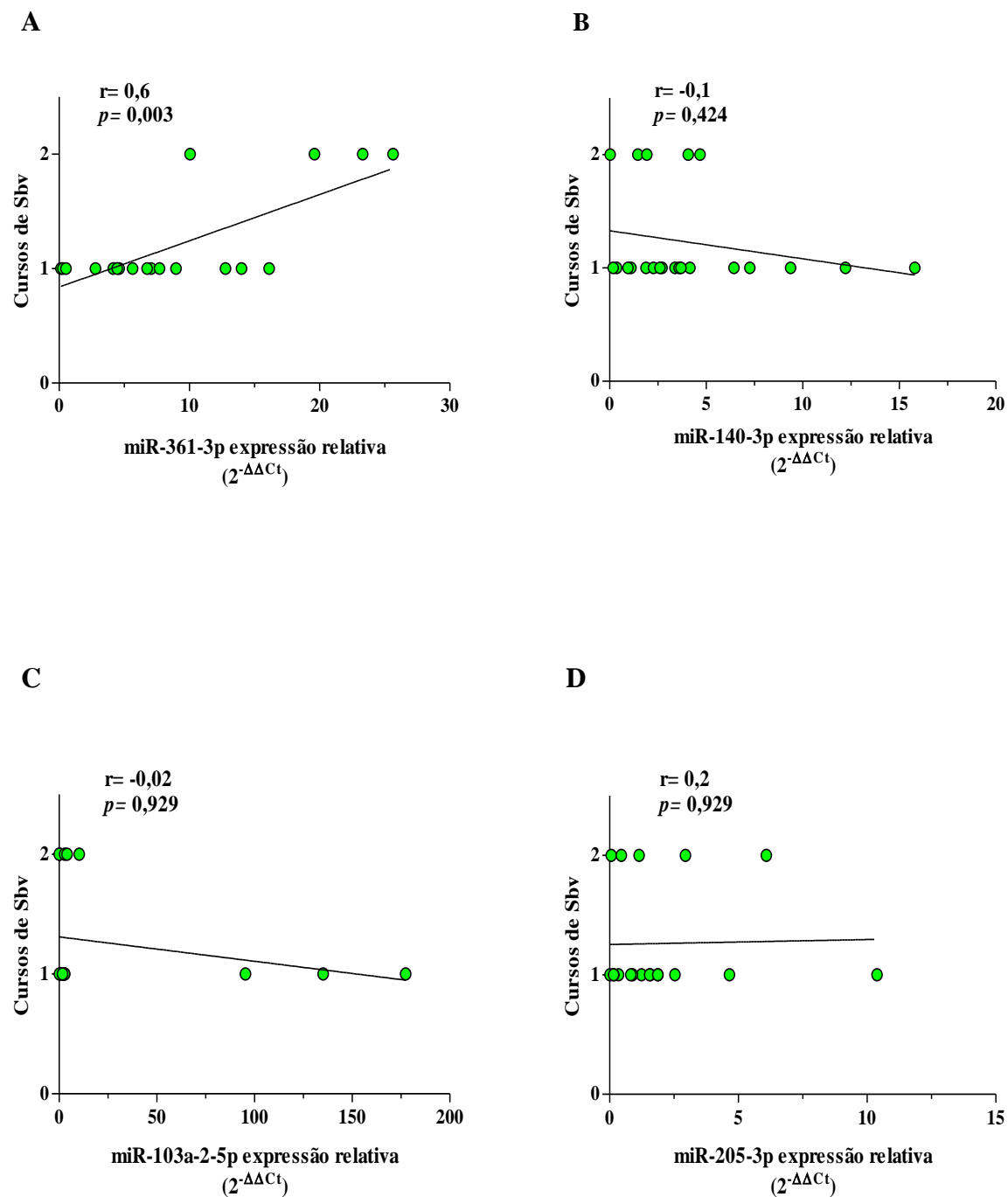


Figura 9. Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR -361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com o número de cursos de Sbv.

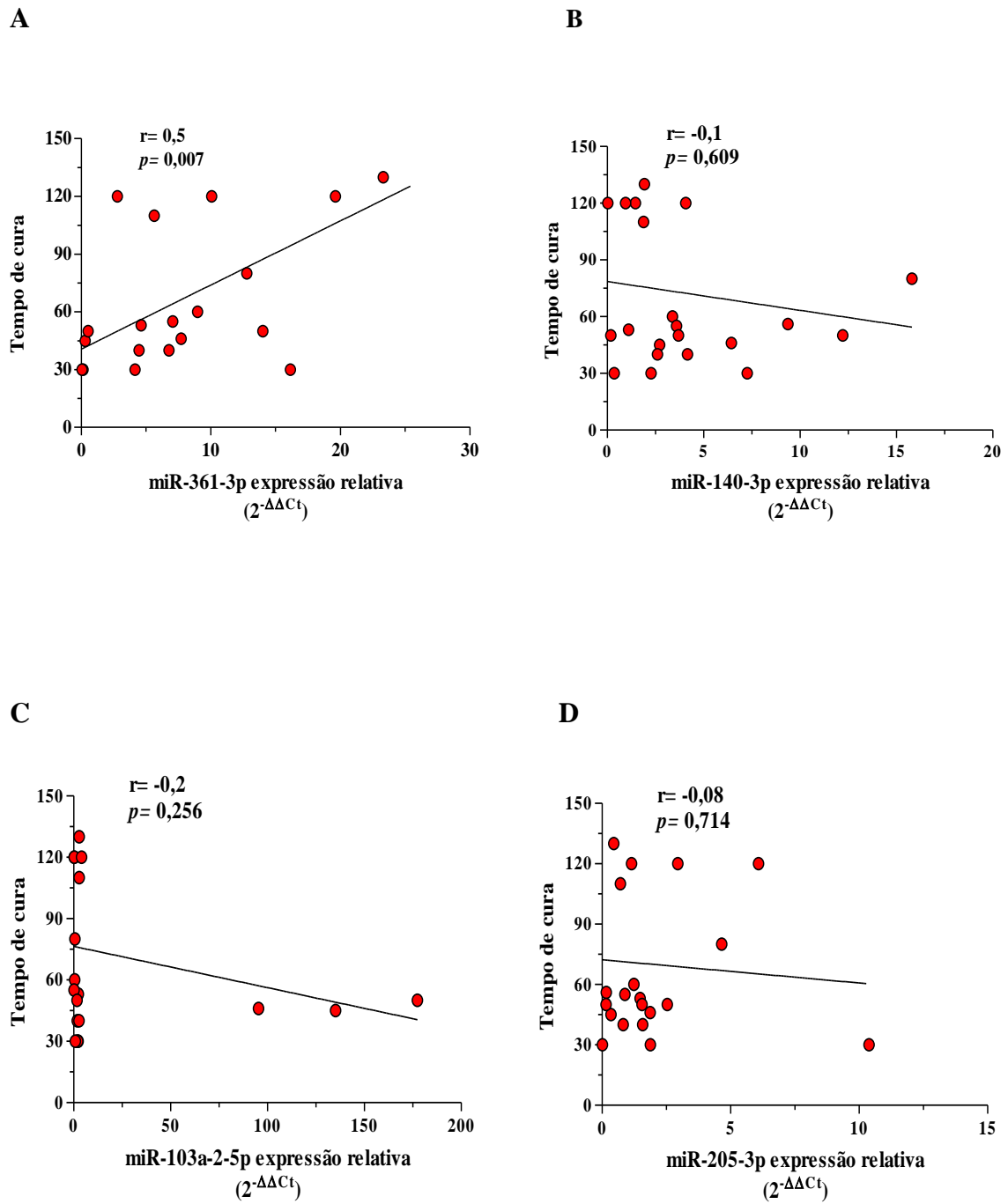


Figura 10. Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR -361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com o tempo de cura após o início do tratamento.

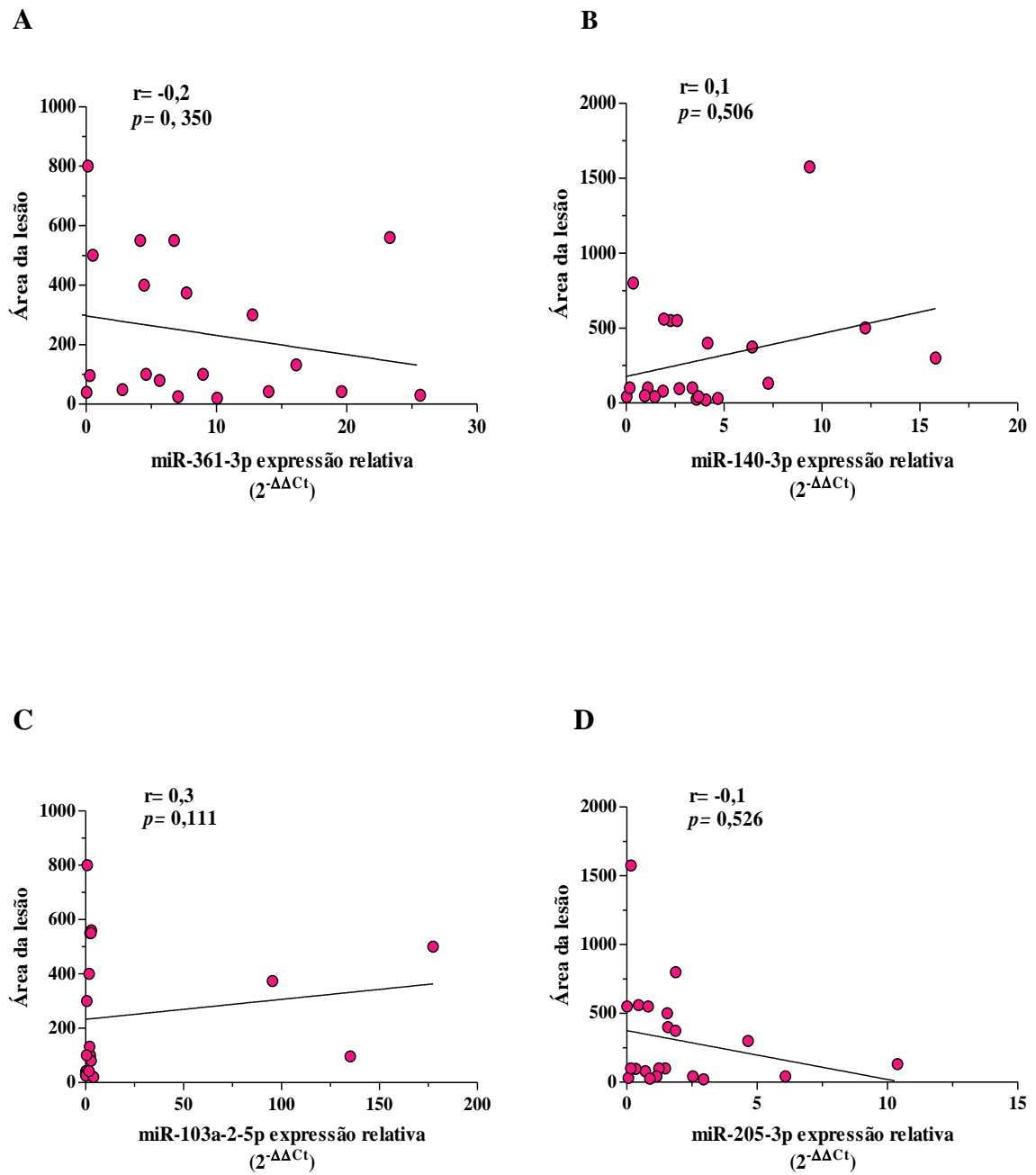


Figura 11. Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR -361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com a área da lesão.

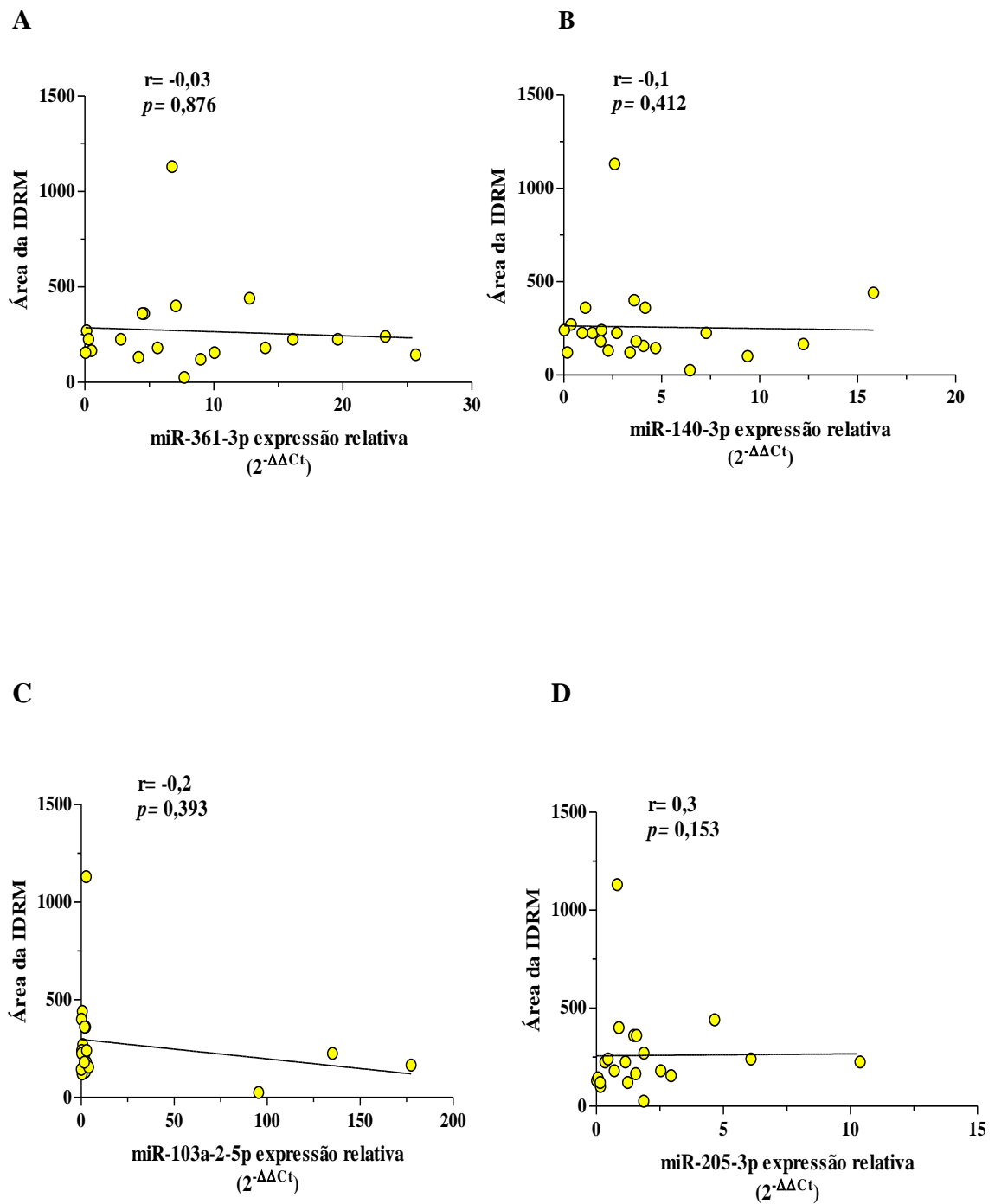


Figura 12. Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR -361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com a área da IDRMs.

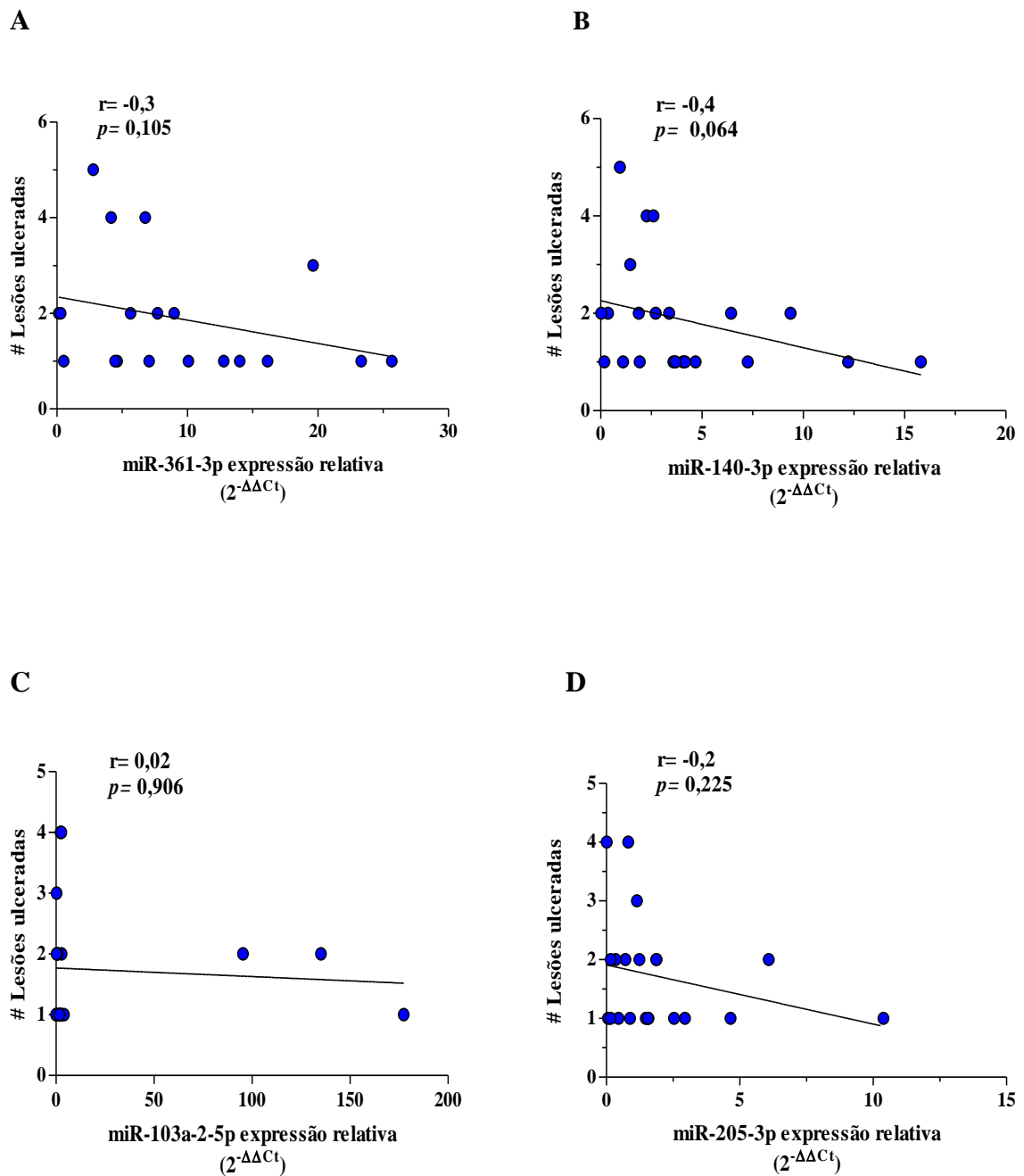


Figura 13. Análise de correlação de *Spearman* entre a expressão relativa do miR-361-3p, -140-3p, -103a-2-5p, 205-3p com o número de lesões ulceradas.

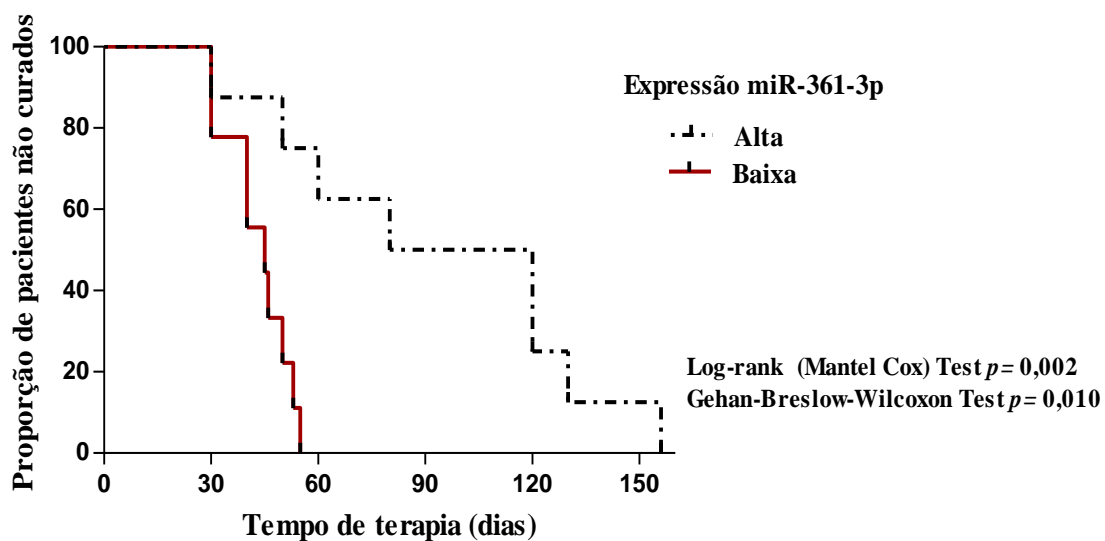


Figura 14. Análise de sobrevida de *Kaplan-Meier* diferenciando o tempo de cicatrização de acordo com os valores de expressão do miR-361-3p.

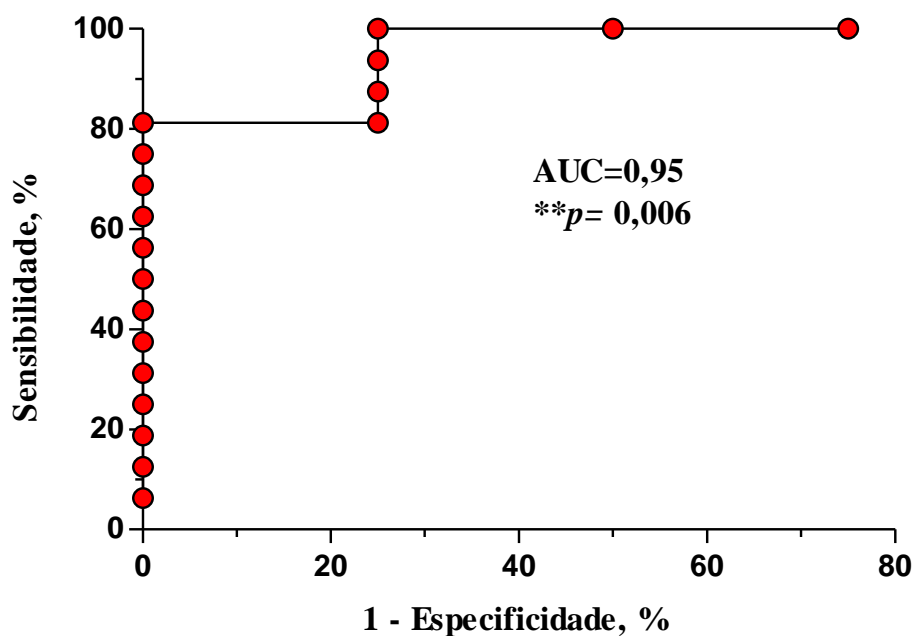


Figura 15. Expressão relativa do miR-361-3p na lesão prediz falha terapêutica em pacientes com LC. Os valores de expressão do miR-361-3p discriminam significativamente os indivíduos que não responderam ao tratamento com um curso de Sbv e são refratários (área sob a curva ROC [0,95; $p = 0,006$]).

Tabela 5. Valores obtidos na análise de curva ROC

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