

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Genética, Ecologia e Evolução

Programa de Pós-graduação em Genética

Marina Pimenta Braga

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO MIRNA *let-7a-5p* NO CONTROLE
DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA NA HANSENÍASE**

Belo Horizonte

2023

Marina Pimenta Braga

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO MIRNA let-7a-5p NO CONTROLE
DA RESPOSTA IMUNE E INFLAMATÓRIA NA HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Genética.

Orientador: Dr. Frederico Marianetti Soriani

Belo Horizonte

2023

043

Braga, Marina Pimenta.

Caracterização do papel do miRNA let-7a-5p no controle da resposta imune e inflamatória na hanseníase [manuscrito] / Marina Pimenta Braga. – 2023.
66 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Frederico Marianetti Soriani.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Hanseníase. 3. Mycobacterium leprae. 4. MicroRNAs. 5. Receptor 4 Toll-Like. I. Soriani, Frederico Marianetti. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575

FOLHA DE APROVAÇÃO

"Caracterização do papel do miRNA let-7a-5p no controle da resposta imune e inflamatória na hanseníase"

MARINA PIMENTA BRAGA

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Frederico Marianetti Soriani
UFMG

Renato Santana Aguiar
UFMG

Karina Braga Gomes
BorgesUFMG/Farmácia

Belo Horizonte, 07 de julho de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 08/07/2023, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 10/07/2023, às 11:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 10/07/2023, às 12:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2442784** e o código CRC **1E3FB9C4**.

AGÊNCIA DE FOMENTO



AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais e ao Instituto de Ciências Biológicas;

Ao programa de pós-graduação em genética;

As agências de fomento (Fapemig, Capes, CNPQ), pelo apoio financeiro;

Ao professor Frederico, por ter acreditado em mim e me dado a oportunidade de trabalhar ao seu lado sob sua maravilhosa orientação. Por ser um verdadeiro mentor e educador. Ser a sua aluna é um privilégio;

As “meninas” do laboratório Ana Carol, Flávia, Isabella, Isabelle e Beatriz por me acolherem com todo o carinho. Por estarem sempre apoiando, incentivando e compartilhando idéias, diariamente. E não podia de deixar de agradecer também à Thais, por ter me dado a oportunidade de compartilhar não só a bancada, mas a amizade e ensinamentos. Vocês tornaram meus dias mais leves. Obrigada por serem especiais!

Ao professor Pedro Guimarães pela imprescindível colaboração para com este trabalho;

Aos meus pais Camila e Daniel, que sempre estão ao meu lado me apoiando e incentivando a alcançar os meus sonhos. Por serem meu porto seguro e meu exemplo diário. Sem vocês eu não me tornaria a pessoa que sou hoje;

Ao meu irmão e amigo Arthur, por compartilhar da sua alegria e sabedoria. Por estar do meu lado em todos os momentos;

Enfim a todos que de alguma forma fizeram parte desta jornada, agradeço imensamente a cada um de vocês!

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano!”

Issac Newton

RESUMO

A Hanseníase é uma doença crônica e infecto contagiosa, tendo como agente etiológico a *Mycobacterium leprae*. Atualmente, é uma doença que, apesar de ter tido um grande progresso na diminuição de sua transmissão, ainda acomete um número consideravelmente grande de pessoas. É caracterizada por um amplo espectro clínico que varia entre a forma de resistência (tuberculóide -TT) e a forma de susceptibilidade (virchowiana – VV), que se manifestam sob diferentes perfis de resposta imune. O controle da resposta imune envolve uma miríade de processos celulares e teciduais e, dentre eles, o controle da expressão gênica é fator essencial. Resultados prévios demonstram que existe um papel importante de miRNAs, pequenos RNAs não codificantes, nas formas polares da hanseníase. Previamente, identificamos o perfil de expressão de miRNAs diferencial em pacientes com as formas polares da hanseníase (TT e VV) e indivíduos controle não doentes, e estes perfis foram utilizados para identificar, *in silico*, vias celulares enriquecidas e que pudessem estar relacionadas à fisiopatologia da doença. Dentre essas vias, destacam-se as vias de reconhecimento de patógenos ou de PAMPs, como a sinalização mediada por TLR4 (Toll-like receptor 4). Esta via possui um regulador central, o let-7a-5p, que possui como alvo o próprio receptor TLR4 e apresenta-se diferencialmente expresso nas formas clínicas da doença. Nesse sentido, considerando que let-7a-5p pode ter uma função importante na regulação do reconhecimento do patógeno por TLR4, nas formas clínicas polares da hanseníase, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a função do miRNA let-7a-5p no controle da sinalização celular mediada por TLR4 e correlacionar com a fisiopatologia da hanseníase. Para tanto foram padronizados sistemas *in vitro*, em cultura de células HEK293T e L929. Os resultados demonstram que TLR4 é um alvo do miRNA e pode ter sua expressão controlada, pelo menos em parte, por let-7a-5p. Além disso, a presença do mimico de let-7a-5 é capaz de inibir parcialmente o aumento de CXCL1, após o estímulo de fibroblastos L929 com LPS, e observamos também a alteração da expressão do miRNA após o estímulo das células com LPS e a alteração de mRNA de TLR4 em células tratadas com o mimico do miRNA. Os resultados gerados neste trabalho demonstram que let-7a-5p é um controlador da resposta inflamatória mediada por TLR4 na hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase, *Mycobacterium leprae*, miRNAs, TLR4.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic and contagious infectious disease, whose etiological agent is *Mycobacterium leprae*. Currently, it is a disease that, despite having made great progress in reducing its transmission, still affects a considerably large number of people. It is characterized by a wide clinical spectrum that varies between the form of resistance (tuberculoid -TT) and the form of susceptibility (virchowian -VV), which manifest in different profiles of immune response. The control of the immune response involves a myriad of cellular and tissue processes and, among them, the control of gene expression is an essential factor. Previous results demonstrate that there is an important role for miRNAs, small non-coding RNAs, in the polar forms of leprosy. Previously, we identified the differential expression profile of miRNAs in patients with the polar forms of leprosy (TT and VV) and non-ill control subjects, and these profiles were used to identify, *in silico*, enriched cellular pathways that could be related to the pathophysiology of the disease. Among these pathways, the recognition pathways of pathogens or PAMPs stand out, such as signaling mediated by TLR4 (Toll-like receptor 4). This pathway has a central regulator, let-7a-5p, which targets the TLR4 receptor itself and is differentially expressed in the clinical forms of the disease. In this sense, considering that let-7a-5p may play an important role in regulating the recognition of the pathogen by TLR4, in the polar clinical forms of leprosy, the objective of this work was to characterize the function of the miRNA let-7a-5p in the signaling control cell mediated by TLR4 and correlate with the pathophysiology of leprosy. For this purpose, *in vitro* systems were standardized in HEK293T and L929 cell cultures. The results demonstrate that TLR4 is a miRNA target and may have its expression controlled, at least in part, by let-7a-5p. Furthermore, the presence of the let-7a-5 mimic is capable of partially inhibiting the increase in CXCL1 after stimulating L929 fibroblasts with LPS, and we also observed changes in miRNA expression after stimulating cells with LPS and TLR4 mRNA alteration in cells treated with the miRNA mimic. The results generated in this work demonstrate that let-7a-5p is a controller of the TLR4-mediated inflammatory response in leprosy.

Key words: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, miRNAS, TLR4.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO – Proteínas argonautas
COX-2 – Ciclooxigenase 2
CT – Limiar de ciclo
DEFBI – β - defensina
DGCR8 – Proteína de ligação ao RNA
DROSHA – enzima ribonuclease III
hRluc – Gene da luciferase Renilla
IL – interleucina
INF- γ – Interferon gama
Inos – Óxido nítrico sintase induzida
IPA – Ingenuity pathway analysis
LNP – Nanopartícula lipídica
LPS – Lipopólissacarídeo
MB – Multibacilar
MDT – Multi-droga-Terapia
M. leprae – *Mycobacterium leprae*
M. Tuberculoide – *Mycobacterium Tuberculoide*
OMS – Organização mundial da saúde
PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos
PB - Paucibacilar
PCR – Reação da cadeia em polimerase
PQT – Poliquimioterapia
RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA
RR – Reação reversa
RT-Qpcr – Reação da cadeia em polimerase em tempo real
SNPs- Polimorfismos de nucleotídeos únicos
TGF- β – Fator transformador de crescimento
TIRAP – Proteína adaptadora
TLDA – Taqman low density array
TLR4 – Receptor Toll-like 4 do inglês (Toll-like receptor 4)
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TRAF-6 – Receptor TNF fator 6

TRBP – Elemento resposta a transativação

TT – pólo tuberculóide

VV – pólo virchowiano

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disseminação mundial da Hanseníase.....	12
Figura 2. Representação do número de novos casos de hanseníase em 2020	13
Figura 3. Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase	15
Figura 4. Padrão de Resposta na Hanseníase	18
Figura 5. Biogênese canônica de microRNAs	21
Figura 6. Visão geral da sinalização LPS/TLR4	24
Figura 7. Comparação de sequências de membros da família let-7 em diversas espécies animais	26
Figura 8. <i>Heatmap</i> dos valores de expressão ($2^{-\Delta Ct}$) dos mediadores inflamatórios e receptores diferencialmente expressos entre o grupo de pacientes com hanseníase e o grupo controle	28
Figura 9. <i>Heatmap</i> dos valores de expressão ($2^{-\Delta Ct}$) dos mediadores inflamatórios e receptores diferencialmente expressos entre o grupo de pacientes virchowianos e tuberculóides.....	29
Figura 10. Diagrama de Venn do número de miRNAs diferencialmente expressos (a) e alvos preditos (b) nas formas polares da hanseníase	30
Figura 11. TOP 15 vias canônicas enriquecidas potencialmente moduladas pelos miRNAs diferencialmente nas formas clínicas polares da hanseníase	31
Figura 12. Predição de modulação da via de sinalização por TLRs na forma Virchowiana	32
Figura 13. Predição de modulação da via de sinalização por TLRs na forma Tuberculóide	33
Figura 14. Mapa do plasmídeo TOPO-TA (Thermo Fisher).....	37
Figura 15 A. Sequência do fragmento 3'UTR de TLR4.....	38
Figura 15 B. Sequência de let-7a-5p com pareamento na 3'UTR de TLR4.	38
Figura 15 C – Sequência do Scramble. Controle negativo do mímico de let-7a-5p.....	38
Figura 16. Mapa do plasmídeo PsiCHECK -2.	39
Figura 17. Clonagem dos fragmentos em plasmídeo TOPO	42
Figura 18. Clonagem dos fragmentos em plasmídeo psiCHECK	43
Figura 19. Transfecção do plasmídeo (psiCHEK+3'UTR TLR4) e do plasmídeo + mímico let-7a-5p.....	44
Figura 20. Produção da quimiocina CXCL1, por fibroblastos L929 após estímulo com antígenos de <i>M. leprae</i> e LPS	46

Figura 21. Expressão de let-7a-5p por fibroblastos L929 após estímulo com LPS	47
Figura 22. Produção da quimiocina CXCL1, por fibroblastos L929 após estímulo com LPS e mímico do let-7a-5p+LPS	49
Figura 23. Expressão do mediador inflamatório TLR4 por fibroblastos L929 após estímulo com LPS e tratamento com o mímico do let-7a-5p	50

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
I.1. Epidemiologia da Hanseníase	13
I.1.2. Agente etiológico <i>Mycobacterium leprae</i>	14
I.1.3. Aspectos clínicos e classificação	15
I.1.4. Transmissão e imunopatologia	17
I.1.5. Diagnóstico e tratamento.	20
I.1.6. microRNAs	21
I.1.7. TLR4.	23
I.1.8. miRNA let-7.	24
II - JUSTIFICATIVA	28
III – RELEVÂNCIA	34
IV.1. OBJETIVOS	34
IV.1.1. Objetivo Geral.....	34
IV.1.2. Objetivos específicos	34
V.1 - MATERIAIS E MÉTODOS	36
IV.1.1. Avaliação da expressão de miRNA e seu alvo	36
IV.1.2. Cultivo da linhagem celular de fibroblastos murinos L929.	36
IV.1.3. Estímulo dos fibroblastos L929.....	36
IV.1.4. Quantificação de citocinas por ELISA	36
IV.1.5. Extração de RNA.....	37
IV.1.6. Avaliação da expressão de miRNA por RT-qPCR.....	37
IV.1.7. Transfecção do mímico do miRNA	38
V.2 Validação do miRNA e monitoramento da expressão gênica	38
V.2.1 Clonagem dos fragmentos no plasmídeo TOPO-TA	38
V.2.2 Sequencia do miRNA e 3’UTR do alvo	39
V.2.3 Clonagem dos fragmentos no plasmídeo psiCHECK2.....	39
V.2.4 Transformação em <i>E. Coli</i>	40
V.2.5 Transfecção do mímico do miRNA	41
V.2.6 Formulação plasmídeo/nanopartícula	41

V.2.7 Sistema de ensaio Luciferase	41
VI.1 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
V.1.1. Validação do miRNA let-7a-5p.....	42
V.1.2. Avaliação do papel do miRNA let-7 ^a -5p in vitro e da expressão de TLR4 e do miRNA após estímulos pró-inflamatórios.....	46
VII - CONCLUSÕES.....	52
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

INTRODUÇÃO

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1 – Epidemiologia da Hanseníase

Hanseníase é uma doença crônica e infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que afeta a pele, mucosas e nervos periféricos (White, C *et.al.*, 2015). Apesar de ser uma doença muito antiga (primeira descrição: 600 A.C na Índia), ainda continua sendo um problema de saúde pública em países tropicais (Reibel, F. *et.al.*, 2015). A hanseníase provavelmente teve a sua origem na África Oriental se espalhando para o Oriente (Ásia) e o Ocidente (Europa antes de chegar nas Américas através de ondas de migração humana devido ao colonialismo e ao comércio de escravos) (Figura 1). Durante os séculos XII e XIII a hanseníase foi endêmica na Europa, mas hoje em dia quase não existem casos nesta região. (Reibel, F. *et.al.*, 2015).

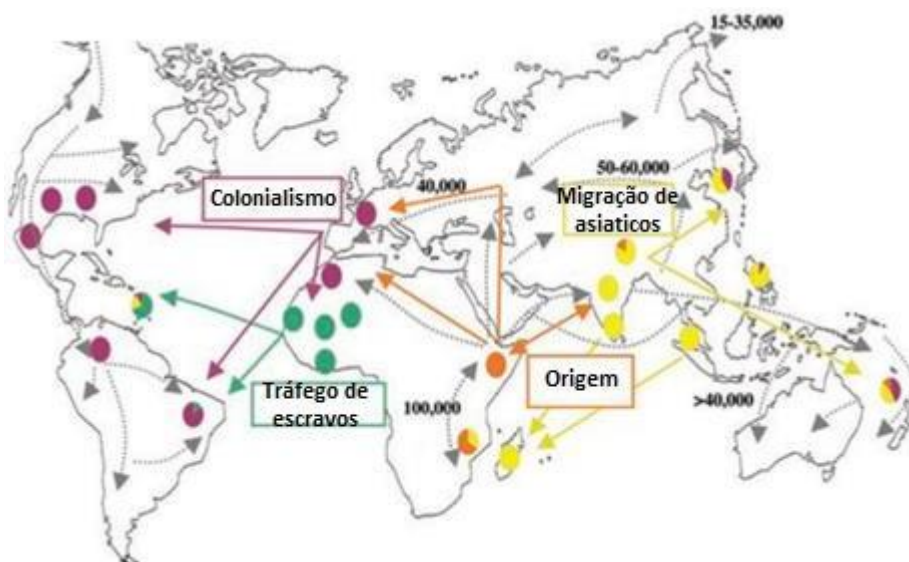


Figura 01: Disseminação mundial da Hanseníase. As setas coloridas indicam a direção de migrações humanas. Setas cinzas indicam as rotas de migração humana derivadas de estudos genéticos, arqueológicos e antropológicos. (Adaptado de Reibel, F. *et.al.*, 2015)

A última atualização da Organização Mundial da Saúde (OMS) trás dados de 2021, onde 135 países compartilharam informações sobre a hanseníase, contabilizando 140.546 novos casos e uma prevalência registrada de 133.781 casos. A aprovação e o grande uso da poliquimioterapia de 1982 em diante contribuiu para a redução drástica do número de casos (Rao *et.al.*, 2017). O primeiro comitê de especialistas em hanseníase se reuniu em 1952 no Rio de Janeiro, mas somente em 1966 que os primeiros dados globais sobre a prevalência da doença foram publicados. Na época a OMS estimou um número global de casos em 10.786.000, mesmo ciente de que este número foi provavelmente subestimado (Reibel, F. *et.al.*, 2015.).

De acordo com os dados de 2021 a maioria dos países com altas taxas de detecção de novos casos estão nas regiões da África e no Sudeste Asiático. E países como Brasil (17.979 novos casos), Índia (75.394 novos casos) e Indonésia (10.976 novos casos) continuam relatando uma grande parcela de hanseníase em 2021 (Figura 2) (OMS,2021).

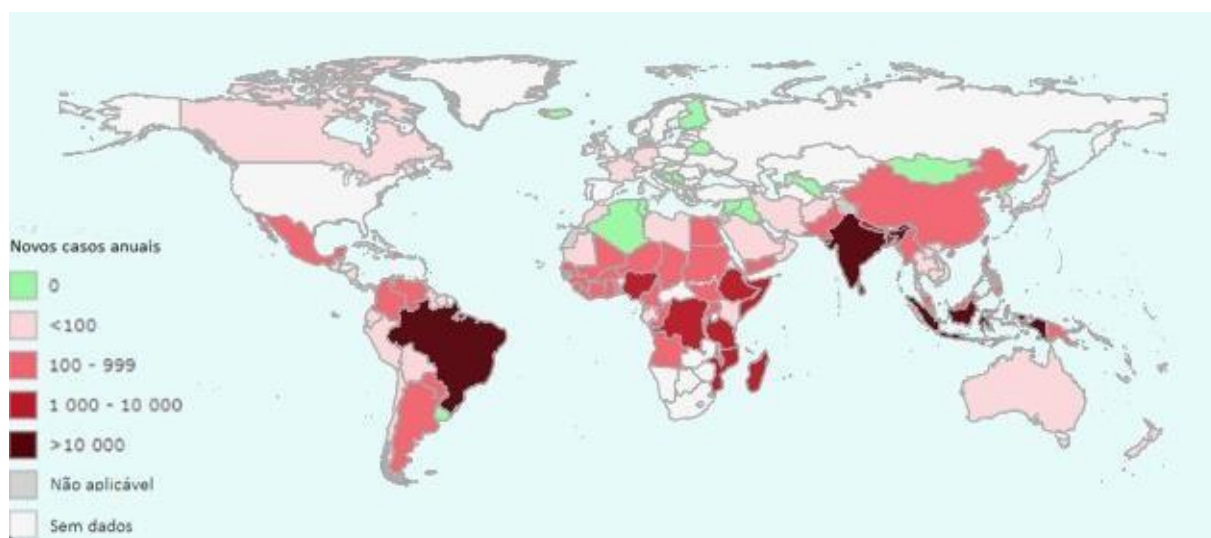


Figura 02: Representação do número de novos casos de hanseníase em 2021. As cores mais escuras apresentam um número maior que 10.000 novos casos ao ano e as mais claras um número menor que 100 novos casos. (OMS,2021)

1.1.2 – Agente etiológico – Mycobacterium leprae

Mycobacterium leprae é o agente etiológico da hanseníase, pertencente ao gênero *Mycobacteria*, família *Mycobacteriaceae* e ordem *Actinomycetales* (Rastogi *et.al.*, 200; Sola, *et.al.*, 2001). São bactérias intracelulares obrigatórias que apresentam uma morfologia

ligeiramente curva e medem de 1 a 8 μm de comprimento e 0,3 a 0,5 μm de diâmetro. O *M. leprae* é um bacilo ácido-álcool-resistente, imóvel e microaerófilo, portanto, não podem ser classificadas segundo a coloração de gram (Mikami *et al.*, 2022). Além disso, a identificação da *M. leprae* foi realizada pelo médico norueguês Gerhard Hansen em 1873, e seu genoma sequenciado em 2001 (Kowalska *et.al.*, 2012).

M. leprae difere de outros bacilos humanos, pelo fato de não ser cultivável *in vitro*, ter um tempo de geração extremamente lento (14 dias), e temperatura ótima de crescimento entre 27 e 30°C (Kowalska *et.al.*, 2012). O fato de ser inviável cultivar este bacilo *in vitro*, dificulta o estudo da patogênese e do seu genoma (Visca *et.al.*, 2002). Apesar destas limitações, atualmente não existe alternativa a não ser a técnica de inocular a bactéria na pata de camundongos. No entanto, apesar da importância histórica da técnica de cultivo em patas de camundongos para o avanço em conhecimento do *M. leprae* e a hanseníase, muitos laboratórios já não utilizam a técnica pelas suas limitações (levy *et.al.*, 2006).

Os humanos são conhecidos como o principal reservatório da infecção por *M. leprae*. A bactéria infecta e invade principalmente macrófagos da pele e células de Schwann nos nervos periféricos produzindo uma infecção crônica em humanos (Mikami *et al.*, 2022). Também há uma boa evidência do tatu como reservatório para infecções humanas no sul dos Estados Unidos. A exposição direta à tatus tem sido um fator de risco para a hanseníase nos Estados Unidos e Brasil (Hess *et.al.*, 2019). Além disso, *M. leprae* apresenta um padrão de alta infectividade e baixa patogenicidade e os pacientes podem permanecer assintomáticos por cerca de 20 anos (Santana, 2018).

I.1.3 Aspectos clínicos e classificação

Os aspectos clínicos mais comuns na Hanseníase incluem manchas hipopigmentadas ou eritematosas com redução ou perda completa de sensibilidade, danos nos nervos (avaliação dos danos nos nervos é fundamental para reduzir a comorbidade da doença) e danos oculares (70% a 75% dos casos) (Maymone *et.al.*, 2019).

Com base nos aspectos imunológicos e histopatológicos a hanseníase pode ser classificada de acordo com a escala de Ridley-Jopling, esta classificação divide a doença em dois polos estáveis Tuberculóide (TT) e Virchowiano (VV) que irão desenvolver respostas imunológicas Th1 e Th2 respectivamente e três formas instáveis entre estes dois polos

(Boderline-tuberculoide, borderline borderline e borderline-virchowiano) (Figura 3). A vantagem desta classificação é baseada nos recursos, imunológicos e histopatológicos (Tanslem *et.al.*,2018; Parkash *et.al.*, 2019).

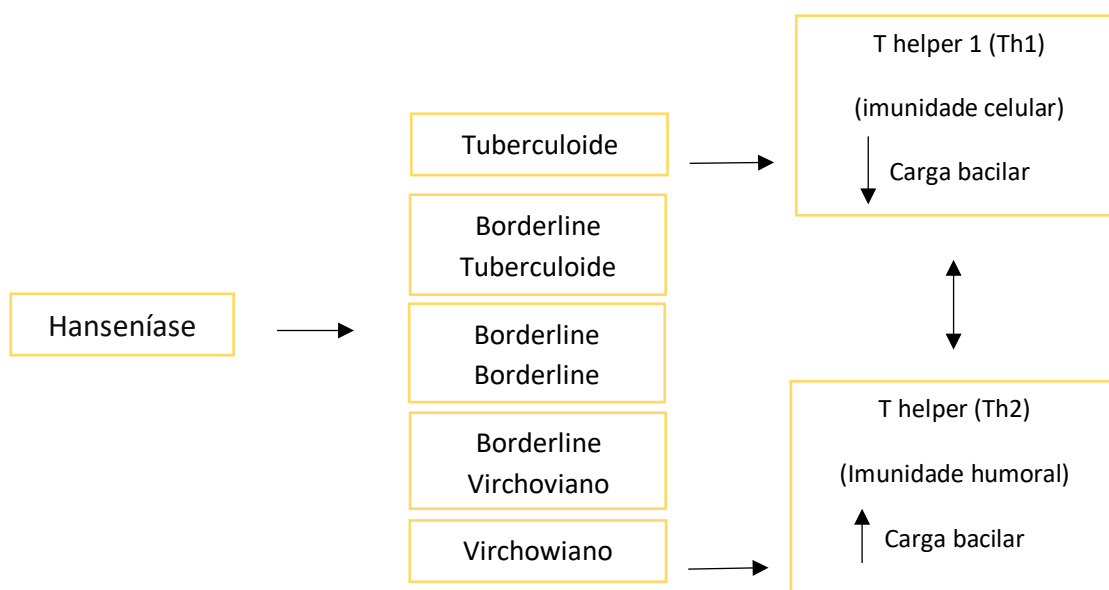


Figura 03: Representação esquemática do espectro clínico da hanseníase. Classificação de acordo com a escala de Ridley e Jopling, considerando achados imunológicos e histopatológicos. Adaptado de (Predevelo, *et.al.*, 2007; Santana, 2018).

Na hanseníase, o polo tuberculóide é caracterizado por granulomas bem definidos que atingem a epiderme e consistem em células multinucleadas e macrófagos, cercado por um “anel” de linfócitos T CD4+ com a ausência ou presença de poucos bacilos. Clinicamente, esses pacientes apresentam placas eritematosas bem definidas e perda de sensibilidade, com a presença de 1-5 lesões, e podem apresentar alopecia e anidrose. Já o polo virchowiano apresenta muitas lesões contendo granulomas. Clinicamente esta forma é caracterizada por lesões bilaterais, extensivas e múltiplas, podendo incluir nódulos e placas. De acordo com a histopatologia e avaliações clínicas, as formas borderline apresentam aspectos dos dois polos (tuberculoide e virchowiano) (Junior *et.al.*, 2021).

Com o intuito de facilitar o diagnóstico, a OMS criou uma classificação comparativa e com métodos simples para diagnóstico, sendo assim, a hanseníase pode ser classificada em dois

polos: Multibacilar (MB) e Paucibacilar (PB). Esta classificação leva em conta o número de lesões e nervos comprometidos: Paucibacilar (1 a 5 lesões na pele ou um nervo comprometido) e Multibacilar (número de lesões maior que 5 e um maior número de nervos comprometidos) (Santana,2018).

I.1.4 – Transmissão e imunopatologia

O homem é o reservatório natural da hanseníase, sendo que pacientes com a forma virchowiana e não tratados representam a principal fonte de infecção, apresentando um alto potencial de transmissão devido à alta carga de bacilos (Santana,2018). As vias de transmissão do *M. leprae* ainda não são completamente esclarecidas. Existem evidências sólidas de um maior risco de contágio em indivíduos que possuem contatos próximos ou que vivem com pacientes com hanseníase, grande probabilidade de infecções por aerossóis e existe também a possibilidade de contágio através do contato com a pele infectada (Ploemancher *et.al.*, 2020). Portadores saudáveis e indivíduos com infecções subclínicas, podem agir como carreadores na cadeia transmissional (Araújo *et.al.*,2012; Madhusmita Das *et.al.*,2020).

Em contraste com bactérias cultiváveis de vida livre, o *M. leprae* é um patógeno obrigatório, o que representa desafios para o entendimento da epidemiologia molecular por meio da diversidade de cepas e da genômica do patógeno (Sakamuri *et.al.*,2009; Madhusmita Das *et.al.*, 2020). Consequentemente, muitos aspectos fundamentais da transmissão da doença e a sua biologia permanecem obscuros. A manutenção de um conjunto mínimo de genes pode ser a explicação para algumas características únicas do *M. leprae*, tais como a incapacidade de ser cultivado em meio artificial, o longo tempo de duplicação e a altíssima especificidade por seus alvos celulares, os macrófagos e as células de Schwann do sistema nervoso periférico (Madhusmita Das, *et.al.*, 2020).

Devido ao alto risco de transmissão todas as pessoas que tenham tido contato com pessoas infectadas são potenciais “casos futuros” que podem aumentar exponencialmente para novos casos. A implementação da poliquimioterapia (PQT) tem resultado em uma redução na prevalência de hanseníase globalmente. A diminuição gradual não é um fenômeno inesperado para uma doença crônica e infecciosa como a hanseníase que também tem um período de incubação longo. No entanto muitos desafios precisam ser superados para atingir este objetivo, incluindo rastreamento ideal de contatos, confirmações de infecções subclínicas por testes

diagnósticos apropriados, estabelecimento de uma quimioprofilaxia que seja efetiva, e uma implementação em larga escala destes métodos em países endêmicos (Palit *et.al.*, 2020).

O estudo das interações entre patógenos e o sistema imune em pacientes portadores de doenças infecciosas têm fornecido modelos clínicos extraordinários para investigação dos mecanismos básicos da regulação da resposta imune humana. A hanseníase é um exemplo importante. O dano neural é atribuído a proliferação bacteriana ou a resposta imune do hospedeiro a relativamente poucos bacilos em nervos periféricos e áreas da derme adjacentes (Goulart *et.al.*, 2002).

Estudos imunohistológicos revelam que as lesões cutâneas de pacientes do pólo TT apresentam predominância de células T CD4+ em detrimento de células T CD8+. Em contraste, as lesões cutâneas de VV exibem uma maior abundância de células T CD8+. As células TCD4+ encontradas em lesões TT mostraram secretar grandes quantidades de IFN- γ , enquanto a população de células T CD8+ encontradas em VV tem sido caracterizada como supressoras devido à sua falta de expressão de CD28 e capacidade de secretar altos níveis de IL-4 como se pode observar no esquema da figura 4 (Weiss *et.al.*, 2016)

Células T que produzem interleucina 2 (IL-2) e interferon γ (IFN- γ), chamadas Th1, aumentam a imunidade mediada por células. IFN-g ativa macrófago e IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em uma doença mais branda. Células T que produzem IL-4, IL-5 e IL-10, chamadas Th2, aumentam a resposta humoral. IL-4 estimula a produção de IgE e ambas, IL-4 e IL-10 estimulam células B e inibem ativação de macrófago resultando em uma infecção progressiva (figura 4) (Goulart *et.al.*, 2002).

Na forma TT da hanseníase, a ativação da via clássica por macrófagos M1 induz a produção de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que induzem a geração de radicais livres e destroem o bacilo. Além disso, a forma VV demonstra uma predominância de macrófagos M2 que induzem a produção de interleucina (IL)-10, fator transformador de crescimento (TGF)- β , fator de crescimento de fibroblastos (FGF)- β , arginase 1 (De Souza *et.al.*, 2018).

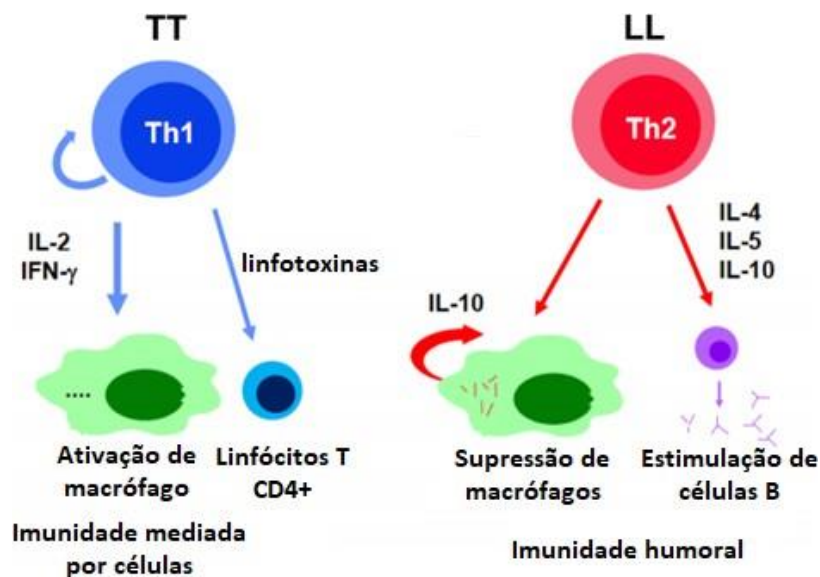


Figura 04: Padrão de Resposta na Hanseníase. Os pacientes com a forma TT têm uma robusta resposta imune Th1 mediada por células via IL-2, IFN- γ e linfotóxina que ativa macrófagos e linfócitos T citotóxicos para matar as micobactérias intracelulares, resultando em uma doença autolimitada. Em contraste, os pacientes com a forma LL têm uma resposta Th2 proeminente via IL-4, IL-5 e IL-10 que facilita as respostas humorais e inibe as respostas imunes mediadas por células através da supressão de macrófagos, resultando em um controle micobacteriano ineficaz e uma infecção progressiva. (Adaptado de Weiss *et.al.*, 2016)

Durante o curso da hanseníase, uma proporção razoável de pacientes (30-50%) irá desenvolver episódios reacionais, principalmente episódios severos de inflamação aguda, impondo um grande desafio aos profissionais no tratamento de pacientes com hanseníase. Estes eventos afetam a pele e os nervos, são acompanhados ou não por sintomas sistêmicos, e são classificados como tipo I (reação reversa, RR) ou tipo II (eritema nodoso hansênico ENH) as reações dependem das características clínicas da inflamação aguda e o antecedente imunológico (Bath *et.al.*, 2012).

A reação do tipo I é uma resposta natural de hipersensibilidade do tipo retardada *M. leprae*. Clinicamente, é caracterizada por melhoramento do quadro clínico em direção ao polo tuberculoide, incluindo a redução da carga bacilar. Imunologicamente é caracterizada pelo desenvolvimento de forte reatividade a testes cutâneos, bem como a resposta de linfócitos e a resposta predominante Th1 (Preakash *et.al.*,2012). Episódios reacionais (RR) têm sido associados com a infiltração de linfócitos CD4+ secretores de IFN- γ e TNF em lesões de pele e nervos, resultando em edema e inflamação dolorosa. Marcadores imunológicos como CXCL10 são descritos como ferramenta potencial para discriminar RR (Stefani *et.al.*,2009; Preakash, *et.al.*,2012). Acredita-se que a patogênese da reação do tipo II esteja relacionada a

deposição de imunocomplexos. Níveis aumentados de TNF, IL1- β , IFN- γ e outras citocinas são observados na reação do tipo II (Massoni *et.al.*,2010; Preakash *et.al.*, 2012).

I.1.5 – Diagnóstico e tratamento

Sintomas comuns exibidos por pacientes com hanseníase, incluindo comprometimento sensorial, parestesia, devem desencadear a suposição de que o paciente esteja com a doença e levar a testes laboratoriais. A detecção microscópica de *M. leprae* em esfregaços de tecido, juntamente com a avaliação histopatológica e clínica, pode ser usada para diagnóstico da hanseníase (Mungroo *et.al.*, 2020). Outro método que tem sido empregado para o diagnóstico é a reação em cadeia da polimerase (PCR), onde o DNA de *M. leprae* pode ser amplificado a partir de uma amostra (Mungroo *et.al.*, 2020).

No entanto, a busca por novos métodos de diagnóstico continua, Oca e colaboradores (2009) determinaram uma relação entre hanseníase e 3 polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) no gene β -defensina 1 (DEFB1). Os resultados concluem que DEFB1 pode ser usado para detecção de susceptibilidade e como um marcador para hanseníase virchowiana, e pode ser útil na concepção de novas curas (Aamir *et.al.*, 2018). O diagnóstico ainda depende muito da identificação de sintomas clínicos e a detecção precoce da hanseníase representa um obstáculo substancial no controle da hanseníase (Coma *et.al.*, 2021).

O os medicamentos recomendados para hanseníase pela OMS, consiste em rifampicina, clofazimina, dapsona, minociclina e ofloxacina. O padrão recomendado para casos multibacilares é rifampicina,dapsona e clofazimina por um ano. Para hanseníase paucibacilar é recomendado rifampicina, dapsona (Mungroo *et.al.*,2020; Hashfi *et.al.*, 2022). Além da terapia padrão, a ofloxacina, minociclina e claritromicina podem ser usadas como alternativas em caso de intolerância a um ou mais dos três medicamentos padrões (Fisher *et.al.*, 2017; Talhari *et.al.*, 2015). O tratamento das reações do tipo 1 envolve corticosteróides sistêmicos, iniciando-se com dose de 40–60 mg de prednisolona por 14 dias, seguida de redução gradual dependendo da regressão dos sintomas (Fisher *et.al.*,2017). Para reações do tipo 2 dependendo da gravidade da reação, a talidomida é o tratamento de primeira escolha. Além disso, o uso de corticosteroides sistêmicos, também pode ser necessário (Fisher *et.al.*, 2017).

O tratamento com a poliquimioterapia ajuda a inibir o desenvolvimento de qualquer deficiência como por exemplo os danos neurais e suprime o desenvolvimento de resistência a drogas (Aamir *et.al.*, 2018). Para prevenir o desenvolvimento de cepas de *M. leprae* multirresistentes, as estratégias atuais de controle da hanseníase são baseadas na detecção precoce de casos e tratamento com a terapia de multi-drogas (MDT), como recomendado pela OMS (Lavania *et.al.*, 2018).

I.1.6 – microRNAs

miRNAs são RNAs endógenos, não codificadores (contendo 20 a 25 nucleotídeos) que fazem parte do epigenoma e tem um papel significante na regulação da expressão genica ao nível pós transcricional (Sonenberg *et.al.*, 2012; Cardoso *et.al.*, 2021; Aidin *et.al.*, 2022). Os miRNAs desempenham um papel complexo e crucial em muitos processos biológicos (proliferação celular, apoptose, resposta à terapia, doenças, desenvolvimento) (Cardoso *et.al.*, 2021). A primeira referência a esses transcritos data de 1993, quando o grupo de Victor Ambros descobriu que o *Lin-4* um gene importante na regulação do desenvolvimento do nematóide *C.elegans*, não codificava proteína mas expressava um pequeno RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos. Esse achado permitiu a caracterização de um novo mecanismo de regulação gênica, pelo qual, o transcrito de *lin-4* regula negativamente a tradução do transcrito de *lin-14* ao se ligar diretamente na sua região 3'UTR (Lee Feinbaun *et.al.*,1993; Sandoval 2011).

Os genes dos miRNAs são evolutivamente conservados e podem estar localizados em íntrons ou exons de genes codificadores de proteínas ou em regiões intergênicas (Sandoval, 2011). Os miRNAs são transcritos pela RNA-polimerase II para produzir transcritos primários denominados pri-miRNAs. Os pri-miRNAs serão processados pelas enzimas Drosha ribonuclease III (DROSHA) juntamente com a proteína de ligação ao RNA (DGCR8), formando um pré-miRNA. Após o transporte pelo complexo Ran-GTP/Exportina 5 do núcleo para o citoplasma, os pré-miRNAs são processados por outra enzima Dicer juntamente com a proteína de ligação ao RNA do elemento de resposta a transativação (TRBP) em um duplex de 20–22 nucleotídeos miRNA. As duplas fitas de miRNA se associam com a proteína Argonauta 2 (AGO2), e posteriormente se desassociam permanecendo somente uma fita (miRNA maduro) juntamente com a proteína AGO para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA

(RISC) que em última análise, procura por mRNAs alvo, desencadeando o silenciamento do gene (Mensia *et.al.*, 2022; Komatsu, *et.al.*, 2023). O silenciamento dos genes ocorre via clivagem do mRNA e degradação, ou repressão traducional, dependendo da complementaridade entre o miRNA e o mRNA alvo (Figura 5) (Peng *et.al.*,2016; Souza *et.al.*,2019; Treiber *et.al.*,2019; Cardoso *et.al.*,2021).

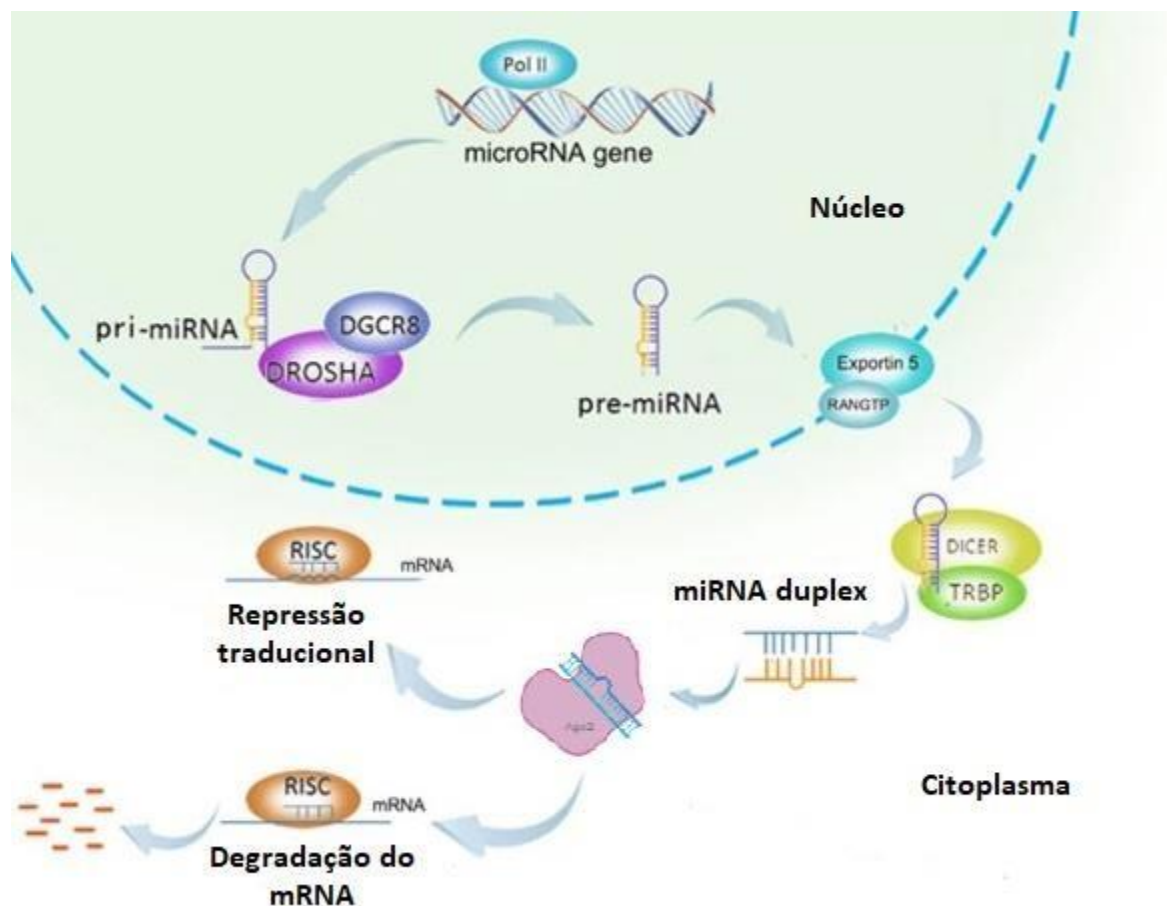


Figura 05. Biogênese canônica de microRNAs. Os microRNAs são primeiramente traduzidos no núcleo em moléculas denominadas pri-microRNAs. A partir de sequências de DNA, os pri-microRNAs são processados pela enzima nuclear Drosha, dando origem a uma molécula menor, chamada pré-microRNA. O pré-microRNA é exportado ao citoplasma, com a ajuda da exportina-5, no qual será processado pela enzima Dicer, gerando uma molécula de microRNA de fita dupla, que se acoplará ao complexo proteico silenciador induzido por RNA. O complexo RISC carregado com miRNA medeia o silenciamento de genes via clivagem do mRNA e degradação, ou repressão traducional, dependendo da complementaridade entre o miRNA e o mRNA alvo. Modificado de (Adaptado de Peng *et.al.*,2016)

Os miRNAs tem como alvo os mRNAs citosólicos formando pares de bases complementares, tipicamente com regiões 3' não traduzidas (3'UTRs) dos mRNAs alvo dentro do complexo RISC. Esta ligação recruta AGOs para seus alvos de mRNA, levando ao silenciamento pós transcricional do gene. O direcionamento de miRNAs depende do pareamento de bases na região "seed" (semente), do miRNA para locais em 3'UTR de mRNAs. Esse direcionamento de mRNA mediado por pareamento de bases leva à diminuição da tradução, deadenilação ou degradação do mRNA. Em casos do pareamento perfeito de bases, ocorrerá a degradação direta, ligando-se à sequência codante do mRNA alvo. Caso o pareamento seja imperfeito, pode ocorrer a desadenilação da cauda poli-A localizada na região 3'UTR do mRNA alvo, ou pode ocorrer os seguintes processos: competição pelo CAP 5', inibição da montagem dos ribossomos, deadenilação seguida por inibição da iniciação da tradução ou desmontagem prematura dos ribossomos (Pereira et.al., 2015; Liu *et.al.*, 2020; Cardoso *et.al.*,2021; Iwakawa et.al.,2022).

Recentes avanços levaram a descoberta de numerosos mecanismos moleculares, que regulam a biogênese, maturação e ação de miRNAs de maneira dependente da célula em condições fisiológicas ou em doenças. Alguns exemplos são: polimorfismos de nucleotídeos únicos, metilação das histonas e DNA, seleção de fita assimétrica de miRNA, interações com moléculas codificadoras ou não e edição de RNA (Souza, 2019).

É bem conhecido que na expressão alterada de miRNAs ocorram vários tipos de doenças, mas em sua maioria é descrita em neoplasmas. Estudos tem permitido um entendimento melhor de mecanismos fisiopatológicos de diferentes doenças em nível molecular, algumas das quais tem apresentado padrões peculiares na expressão de miRNAs permitindo sua classificação molecular. Os miRNAs que são diferencialmente expressos nessas doenças também tem sido objeto de estudos para descobrir novos biomarcadores com potencial prognóstico, preditivo ou terapêutico. No entanto, alguns estudos têm relatado a expressão de miRNAs em doenças infecciosas, particularmente com a hanseníase (Soares *et.al.*,2017).

Um recente estudo Salgado, et.al.,2018 demonstrou que o miRNA pode influenciar um mecanismo pelo qual a célula hospedeira pode prevenir o crescimento do bacilo e gerar barreiras naturais contra a infecção por *M. leprae*. Evidências mostraram que miRNAs são capazes de modular as vias antibacterianas do hospedeiro durante o processo infeccioso e influenciar o resultado da doença. Análises de miRNAs que são diferencialmente expressos nos distintos polos da doença poderiam prover uma melhor compreensão dos alvos de uma resposta imune eficiente para prevenir a infecção, bem como elucidar novos possíveis biomarcadores

para a hanseníase, por exemplo infecção subclínica e um possível preditor de quem desenvolverá a doença (salgado *et.al.*, 2018).

Em um outro estudo recente sobre a expressão de miRNAs em amostras de pele, usando microarrays, centenas de mRNAs diferencialmente expressos foram identificados no espectro da hanseníase e seus estados reacionais, sugerindo a sua participação na fisiopatologia dessas condições. Alguns desses mRNAs diferencialmente expressos podem estar regulados em células que compõem os granulomas das lesões da hanseníase (soares *et.al.*, 2017).

Perfis funcionais e experimentos geraram evidências que sugerem que a regulação de miRNAs específicos durante a infecção podem estimular a resposta imune ou facilitar a evasão imune pelos patógenos (soares *et.al.*, 2017). Assim como Santana, 2018 demonstrou que existe um papel importante de miRNAs, nas formas polares da hanseníase. Foram identificados *in silico*, o perfil de expressão de miRNAs em pacientes com as formas polares da hanseníase (TT e VV) e, dentre estes, foi selecionado o miRNA let-7a-5p como importante controlador de vias de sinalização bastante relevantes para o reconhecimento da bactéria como a via de TLR4 – Toll like receptor 4 (Santana, 2018).

I.1.7 – TLR4

Os receptores Toll-like (TLRs) reconhecem uma variedade de componentes estruturais microbianos chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Após o reconhecimento dos PAMPs, os TLRs desencadeiam a produção de mediadores pro-inflamatórios ajudando a controlar a infecção (Ciesielska *et.al.*, 2021). Até o momento, 13 TLRs foram identificados e descritos em mamíferos, 12 dos quais são expressos em camundongos e 10 em humanos (Płociennikowska *et.al.*, 2015). Receptores Toll-like 4 (TLR4) são membros da família dos TLRs que reconhecem e são ativados pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), que é o principal componente molecular da parede de bactérias gram- negativas (Kuzmich *et.al.*, 2017). O receptor é expresso em células de linhagem mieloide e algumas células não imunes, como, células intestinais epiteliais e endoteliais (Płociennikowska *et.al.*, 2015).

Em um típico cenário, a ativação do TLR4 requer uma cascata de eventos, começando pela interação do LPS com a proteína TLR4 mediada pelo fator de diferenciação mieloide MD-2 (Ciesielska *et.al.*, 2021). Após o reconhecimento, a proteína adaptadora (TIRAP) irá induzir a via de sinalização chamada de MyD88-dependente, (Ciesielska *et.al.*, 2021). Coletivamente,

a via de sinalização dependente de MyD88, seguido pela ativação da quinase 1 associada ao receptor IL-1 (IRAK1) e associada ao receptor TNF fator 6 (TRAF6) irão ativar o complexo IKK (IKK α /IKK β). Posteriormente, o complexo IKK irá induzir o complexo NF- κ B (composto pelas subunidades p50 e p65 e IKK β), nesta conformação o complexo está inativado, para que o mesmo esteja ativo, IKK β é fosforilado e se dissocia do complexo, permitindo que o mesmo migre para o núcleo e permita a transcrição de genes pró-inflamatórios (figura 6).

O NF- κ B, um dos fatores de transcrição nuclear mais cruciais, regula a expressão de uma série de alvos mediadores pró-inflamatórios, como, fator de necrose tumoral (TNF) interleucina 6 (IL-6), cyclooxygenase 2 (COX-2) e quimiocinas como CXCL1 e CXCL8 (Lu *et.al.*,2008; Jiang *et.al.*,2018; Ciesielska *et.al.*,2021;). Alguns estudos mostram que macrófagos teciduais que expressam TLR4, também liberam CXCL1 e CXCL2 após a estimulação com LPS (Filippo *et.al.*, 2013; Guijarro *et.al.*,2014; Bigorgne *et.al.*2016).

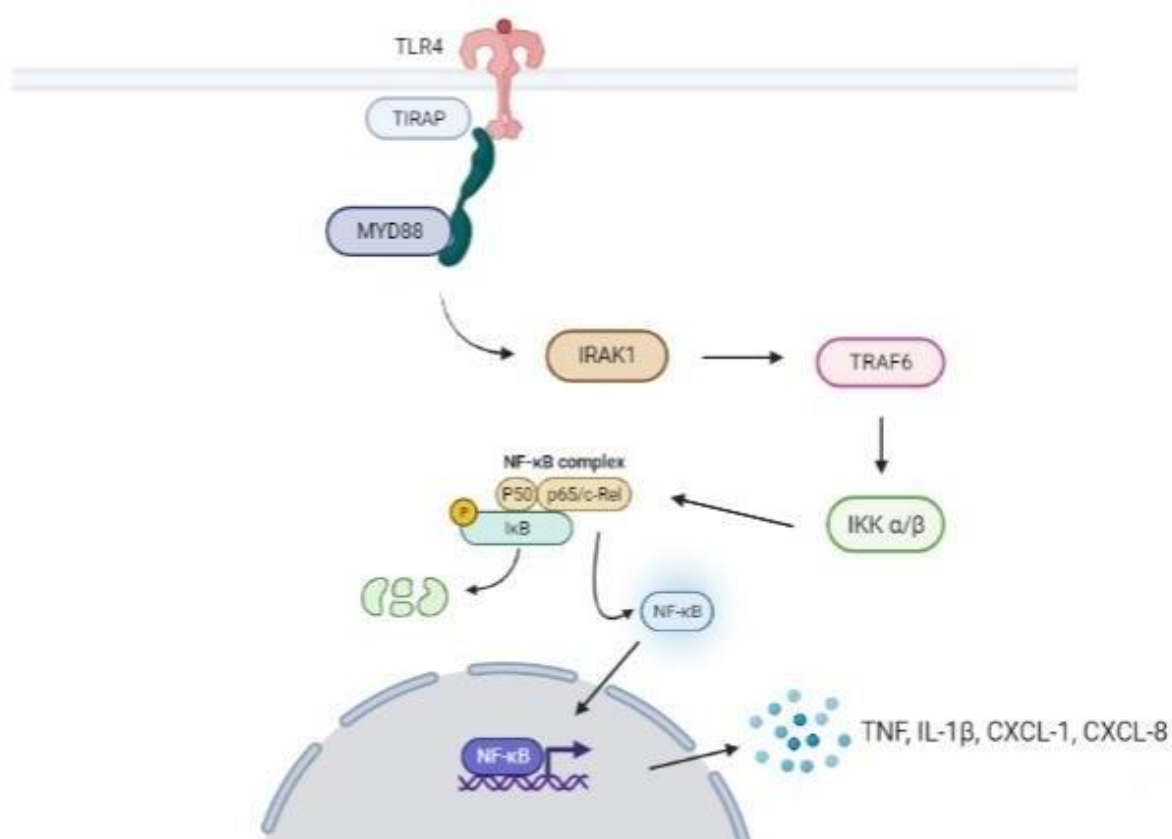


Figura 06. Visão geral da sinalização LPS/TLR4. O reconhecimento LPS é realizado por TLR4 que por sua vez ativa a via dependente de MyD88, que medeia a ativação de células pró-inflamatórias genes de citocina (Modificado de LU, *et.al.*,2008).

Após o reconhecimento do LPS, o TLR4 sofre oligomerização e recruta seus adaptadores a jusante, por meio de interações com os domínios TIR (receptor de Toll-interleucina). Existem 5 proteínas adaptadoras contendo o domínio TIR: MyD88 (gene 88 de resposta primária de diferenciação mieloide), TIRAP (proteína adaptadora contendo domínio TIR, também conhecida como Mal, MyD88-), TRIF (adaptador contendo domínio TIR induzindo IFN- β), TRAM (molécula adaptadora relacionada ao TRIF). Diferentes TLRs usam diferentes combinações de proteínas adaptadoras para determinar a sinalização a jusante. Curiosamente, o TLR4 é o único TLR conhecido que utiliza todas essas proteínas adaptadoras (Lu *et al.*, 2008).

De acordo com a literatura existe uma relação de TLRs com a hanseníase, os membros da família TLR, TLR2 (como um heterodímero com TLR1 ou TLR6), TLR4 e TLR9 interagem com agonistas micobacterianos (Bochud, *et al.*, 2009). Bochud e colaboradores (2009), demonstraram ainda em seu estudo que dois SNPs em TLR4 (896G>A [D299G] e 1196>T [T399I]) foram associados à proteção contra hanseníase em uma coorte etíope de pacientes com hanseníase e controles saudáveis. Eles também demonstraram que o *M. leprae* regula negativamente a produção de citocinas mediada por TLR4 em monócitos.

A modulação da ativação e sinalização de TLR4 é de fundamental importância para o ponto de vista farmacológico e clínico. Por um lado, a estimulação da resposta imune inata é útil para o desenvolvimento de adjuvantes de vacinas e drogas imunoterapêuticas. Por outro lado, a inibição de TLR4 é uma abordagem terapêutica para sepse de bactérias gram-negativas, bem como para patologias inflamatórias autoimunes como aterosclerose, artrite reumatoide, ou choque hemorrágico (Peri *et al.*, 2020). E esta regulação de TLR pode ser realizada por miRNAs. Ligantes de TLR como LPS podem diferencialmente regular um conjunto de miRNAs incluindo miR-21, miR-146a/b e miR-155 (O'Connell *et al.*, 2007; Tili *et al.*, 2007; Taganov *et al.*, 2006; Androulidaki *et al.*, 2009; Ceppi *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Tang, 2009).

I.1.8 – miRNA let-7

Let-7 foi um dos primeiros miRNAs a serem descobertos. Foi originalmente identificado como um regulador do tempo de desenvolvimento no nematóide *C. elegans* e, portanto, considerado um gene heterocrônico (Reinhart *et al.*, 2000; Lee, *et al.*, 2015). Como a expressão de let-7 aumenta gradualmente durante o desenvolvimento, e esse miRNA

desempenha papéis importantes em muitos processos biológicos, pode-se esperar que a biogênese de let-7 seja estritamente regulada (Lee *et.al.*,2015).

De acordo com miRBase, *Caenorhabditis elegans* (nematóide), *Drosophila melanogaster* (mosca), *Xenopus tropi calis* (rã), *Danio rerio* (peixe zebra), *Gallus gallus* (frango), *Canis familiaris* (cão), *Mus musculus* (rato) e *Homo sapiens* (humano) expressam uma versão de let-7 (let-7a) que possui a sequência consenso exata de 'UGAGGUA GUAGGUUGUAUAGUU' (Roush *et.al.*, 2008). Na figura 7 podemos observar a comparação de sequencias dos membros das famílias let-7a em diversas espécies.

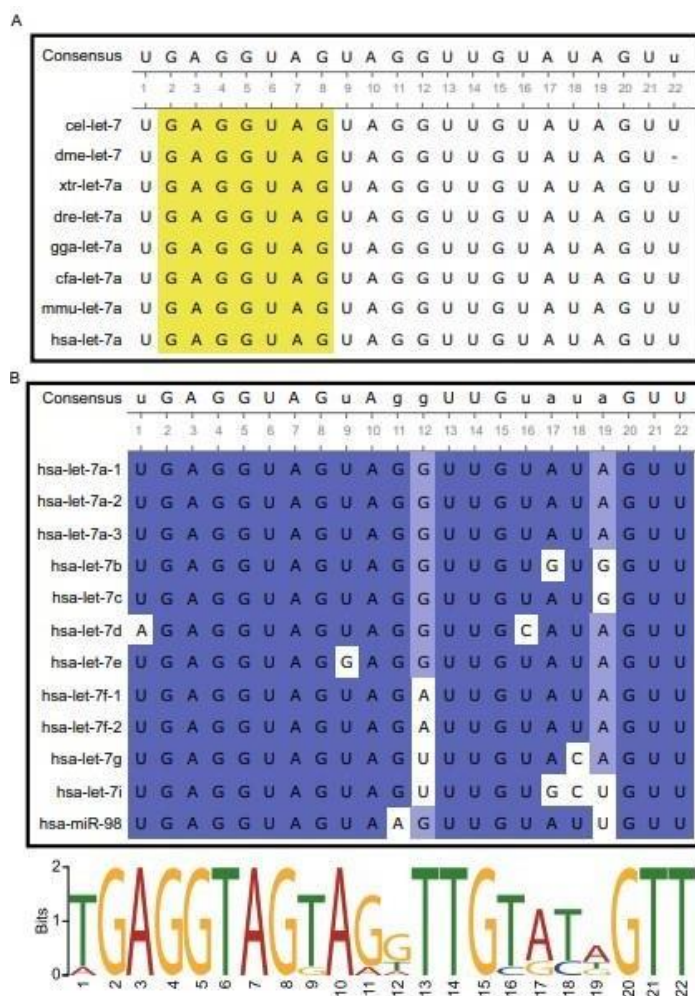


Fig. 07: **Comparação de sequências de membros da família let-7 em diversas espécies animais.** (A) *C. elegans* (cel), *D. melanogaster* (dme), *X. tropicalis* (xtr), *D. rerio* (dre), *G. gallus* (gga), *C. familiaris* (cfa), *M. musculus* (mmu) e *H. sapiens* (hsa) todos possuem o consenso maduro let-7 (let-7a) sequência de 'UGAGGUA GUAGGUUGUAUAGUU'. A sequência de semente é indicada como uma marcação amarela. As sequências maduras de consenso são colocadas no topo da figura, onde apenas as sequências perfeitamente alinhadas são maiúsculas. (B) Alinhamento das sequencias das formas maduras dos membros humanos da família let-7 (painel superior). A marcação azul escura representa a porcentagem de identidade acima de 70%, enquanto a

marcação azul clara indica uma porcentagem acima de 50%. As sequências maduras de consenso são colocadas no topo da figura, onde apenas sequências perfeitamente alinhadas são maiúsculas (Lee *et.al.*, 2016).

A maioria das sequências let-7 inclui a ‘sequência semente’ (sequência que irá se ligar ao mRNA alvo) e, os humanos têm dez sequências maduras da família let-7 que são produzidas a partir de 13 sequências precursoras. Três precursores separados produzem a sequência let-7a madura (let-7a-1, let-7a-2 e let-7a-3) e precursores de dois diferentes localizações genômicas produzem a sequência let-7f (let-7f-1 e let-7f-2). No entanto, o tamanho da família pode diferir entre organismos (Roush *et.al.*, 2008).

Cada vez mais estudos sugerem a conexão de miRNAs da família let-7 com vias inflamatórias. Kumar e colaboradores (2015), demonstraram que let-7f modula a resposta imune em uma infecção por *Mycobacterium Tuberculosis*. O estudo mostra que let7f tem como alvo A20 um inibidor de retroalimentação da via NF-kB, sendo assim, a superexpressão de let-7f diminui a sobrevivência do *M. Tuberculosis* e aumenta a produção de citocinas, incluindo TNF e IL-1 β .

Já Satoh e colaboradores (2012), sugeriram que a repressão de let-7i pode contribuir para a ativação prolongada do sinal TLR4 em monócitos obtidos de pacientes com doença coronariana arterial (DAC). Zhang e colaboradores (2019), demonstraram que o miRNA let-7a atua como um regulador negativo da ativação microglial e inflamação na patogênese da doença de Parkinson induzida por α -Syn e destaca a importância de STAT3 na mediação da função de miRNA let-7a. Estudos como estes corroboram com resultados prévios obtidos pelo nosso grupo que demonstram que miRNAs, especialmente let-7a-5p tem um alto potencial de controle da resposta inflamatória na hanseníase.

II. JUSTIFICATIVA

Perfil de expressão dos miRNAs na hanseníase

Estudos gerados por nosso grupo (Santana, 2018) comparando as duas formas polares da doença (TT e VV) e os níveis de expressão de miRNAs revelaram mediadores inflamatórios e seus receptores sendo potencialmente modulados por diferentes miRNAs. Neste estudo foram avaliados os miRNAs que estariam expressos nos pacientes com as formas polares da doença e pacientes controle.

Um total de 311 miRNAs foram detectados em lesões de pacientes VV, 275 em lesões de pacientes TT e 294 em amostras controle saudáveis. Para serem incluídos em análises posteriores, os níveis de expressão de miRNA eram necessários ter uma detecção confiável com um limiar de ciclo (CT) de <35 .

Entre os genes detectados, 188 foram expressos diferencialmente entre os três grupos ($P < 0,05$) e foram incluídos na análise subsequente.

Perfil de expressão de mediadores inflamatórios, receptores e marcadores de células do sistema imune

Além dos miRNAs foi identificado o perfil de expressão de mediadores inflamatórios, receptores e marcadores de células do sistema imune em lesões de pele de pacientes com as formas polares da doença (TT e VV) e pacientes controle, saudáveis.

Para a caracterização do perfil de expressão dos mediadores e receptores, foram avaliados o perfil de expressão de 92 genes utilizando TLDA. O perfil pode ser analisado na fig. 9. Pode-se notar um maior número de genes regulados negativamente nos pacientes com a forma TT e positivamente regulados na forma VV. E foi possível detectar 25 genes diferencialmente expressos entre os 3 grupos ($p < 0.05$): *ACKR4*, *C5AR2*, *CCL1*, *CCL18*, *CCL2*, *CCL20*, *CCL26*, *CCL4*, *CCL5*, *CCR2*, *CCR6*, *CD68*, *CXCL10*, *CXCL12*, *CXCL9*, *FCG3RA*, *IL12B*, *IL1R1*, *IL1R2*, *IL1RN*, *IL8*, *NOD2*, *SPARC*, *SPP1* e *TNF*.

Dentre os 25 genes diferencialmente expressos, 12 apresentaram uma regulação diferencial entre os grupos de pacientes nas formas VV, TT e controle. ($p < 0.05$): *ACKR4*, *C5AR2*, *CCL1*, *CCL20*, *CCL26*, *CCR6*, *CXCL9*, *CXCL12*, *IL1R1*, *IL1R2*, *IL1RN*, *SPARC* (Fig. 8).

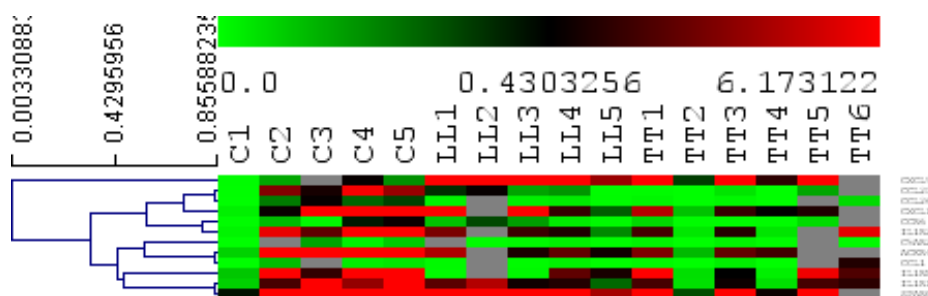


Figura 8. Heatmap dos valores de expressão ($2^{-\Delta Ct}$) dos mediadores inflamatórios e receptores diferencialmente expressos entre o grupo de pacientes com hanseníase e o grupo controle. Perfil de expressão

dos 12 genes que foram estatisticamente diferencialmente regulados ($p < 0,05$) entre o grupo de pacientes com hanseníase (virchowianos e tuberculóides) e o grupo controle. Cada linha corresponde ao perfil de expressão de um gene que pode variar de negativamente (verde) a positivamente regulado (vermelho). As identificações das amostras encontram-se no topo das colunas (Santana, 2018)

Quando comparado os níveis de expressão dos 92 genes entre os grupos VV e TT, 8 deles foram diferencialmente expressos $p < 0,05$): *CCL18*, *CCLA*, *CCL5*, *FCG3RA*, *IL8*, *NOD2*, *SPPI*, *TNF* (Fig. 9). Chama-se a atenção à um padrão semelhante de regulação entre estes genes. Todos apresentam níveis de expressão menores no grupo TT quando se compara ao grupo VV.

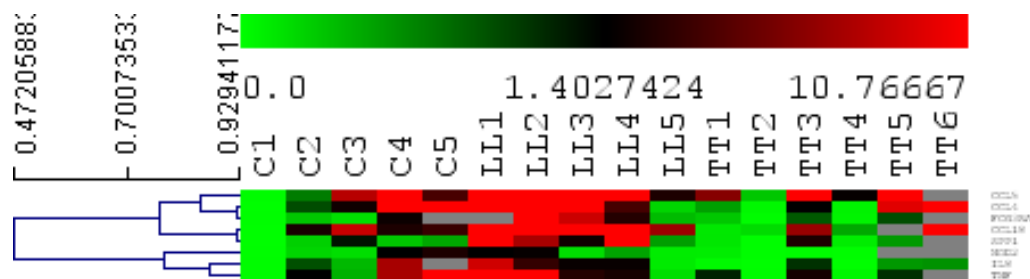


Figura 9. Heatmap dos valores de expressão ($2^{-\Delta C_t}$) dos mediadores inflamatórios e receptores diferencialmente expressos entre o grupo de pacientes virchowianos e tuberculóides. Perfil de expressão dos 8 genes que foram estatisticamente diferencialmente regulados ($p < 0,05$) entre o grupo de pacientes com a forma virchowianos (aqui representado como LL) e o grupo de pacientes com a forma tuberculóide (TT) da hanseníase. Cada linha corresponde ao perfil de expressão de um gene que pode variar de negativamente (verde) a positivamente regulado (vermelho). As identificações das amostras encontram-se no topo das colunas (Santana, 2018)

Predição de redes regulatórias a partir de dados de expressão de miRNAs e de mediadores inflamatórios.

Com os miRNAs e os mediadores inflamatórios diferencialmente expressos, foram preditas redes regulatórias que estariam sendo moduladas por miRNAs diferencialmente expressos. Foram identificados 106 miRNAs diferencialmente expressos nas comparações VV x controle e VV x TT, enquanto 90 miRNAs foram diferencialmente expressos 75 considerando-se as comparações TT X controle e VV X TT (diferencialmente expressos na forma tuberculóide). Paralelamente, 92 genes codificadores de mediadores inflamatórios e seus receptores, diferencialmente expressos nas duas formas polares da doença, também foram identificados. Sendo assim foi utilizada a ferramenta microRNA Target Filter do IPA (Ingenuity pathway analysis) para correlacionar os dados de miRNAs e de mediadores inflamatórios diferencialmente expressos.

Com o intuito de ampliar o entendimento do controle de miRNAs em diferentes vias inflamatórias e imunológicas, os miRNAs diferencialmente expressos foram correlacionados com todos seus alvos validados experimentalmente, por meio do IPA. Foram geradas vias canônicas enriquecidas a partir dos alvos preditos para os 3 grupos de miRNAs (VV, TT ou VV/TT). Na figura 10 podemos observar os miRNAs diferencialmente expressos nas formas polares da doença simultaneamente (37 miRNAs e 28 alvos), diferencialmente expressos exclusivamente no grupo TT (31 miRNAs e 190 alvos) e diferencialmente expressos na forma VV (45 miRNAs e 252 alvos). Portanto podemos avaliar as modulações na susceptibilidade da hanseníase e as modulações que são importantes para a polarização da forma clínica.

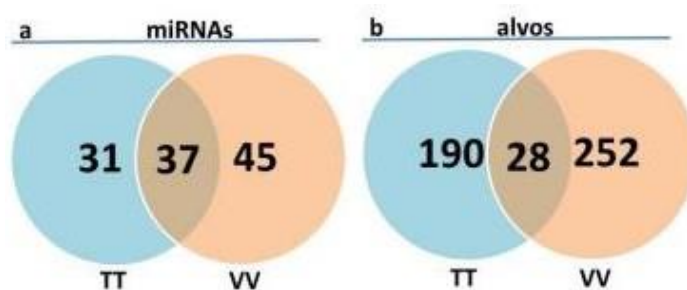


Figura 10: Diagrama de Venn do número de miRNAs diferencialmente expressos (a) e alvos preditos (b) nas formas polares da hanseníase (Santana,2018).

Ao avaliar o conjunto de dados referente aos miRNAs diferencialmente expressos exclusivamente em cada forma polar da doença foi identificada as vias canônicas diferencialmente representadas nos polos da doença. Foram destacadas as vias relacionadas a resposta imunológica como: sinalização por IL-6, sinalização por NF- κ B, maturação de células dendríticas, sinalização por IL-10 e sinalização por receptor do tipo *Toll* (TLR) (Fig. 11). Neste sentido, surgiu a idéia do presente estudo para a caracterização do papel do miRNA let-7a-5p no controle da via de TLR4, já que é uma via importante para o reconhecimento do patógeno e o miRNA estaria modulado diferencialmente nos dois polos da hanseníase.

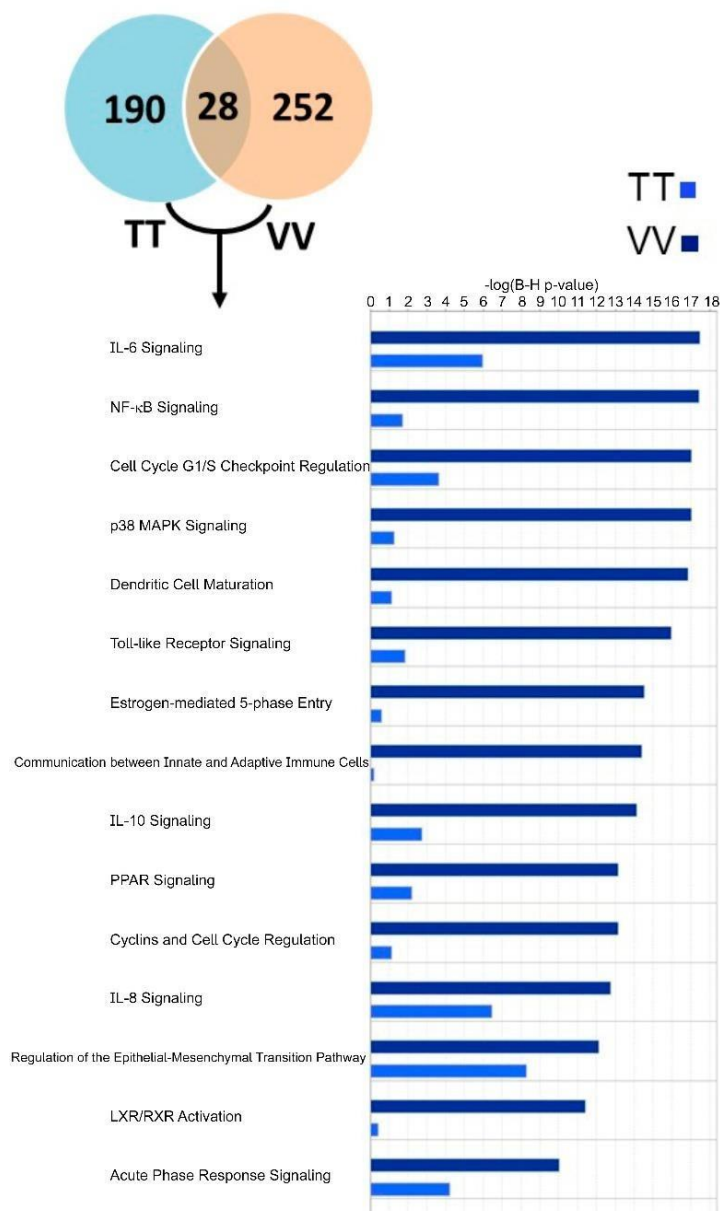


Figura 11: TOP 15 vias canônicas enriquecidas potencialmente moduladas pelos miRNAs diferencialmente nas formas clínicas polares da hanseníase. Ranqueamento com base em “ $-\log(\text{B-H p-value})$ ”, considerando método de Benjamini & Hochbetg (BH) para correção de múltiplos testes (Santana,2018).

Avaliando a modulação de vias de sinalização por TLRs nas formas polares da Hanseníase nas figuras 12 e 13, percebe-se que pontos regulatórios importantes são alvos de miRNAs. Na forma VV observa-se a modulação de TLR4 por miR-511-5p, miR-146a-5p e let-7a-5p. Dentre os TLRs modulados destaca-se o TLR4 pela relação de reconhecimento do *M. leprae* e o perfil oposto das formas VV e TT do miRNA let-7a-5p. Este miRNA é negativamente modulado na forma TT e no polo VV ele é modulado positivamente, possivelmente reprimindo TLR4.

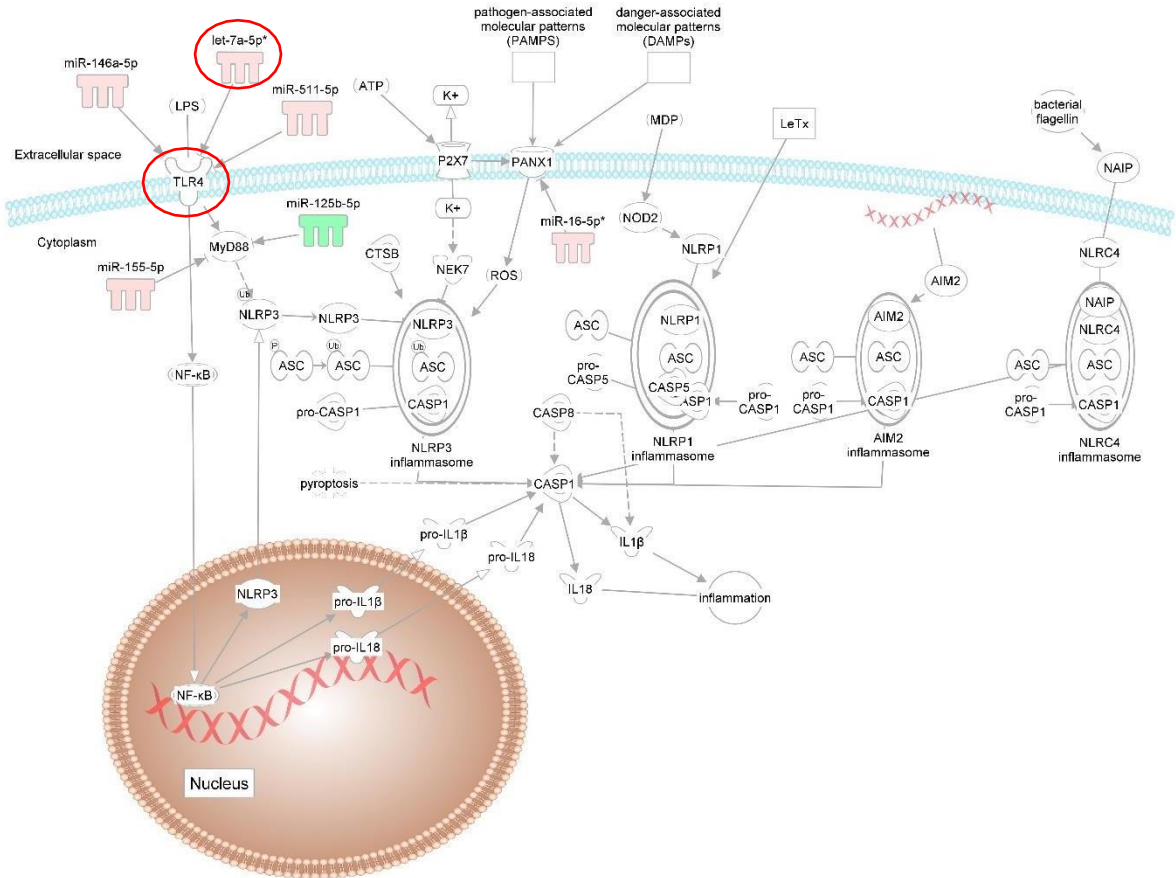


Figura 12: Predição de modulação da via de sinalização por TLRs na forma Virchowiana. Setas ligam os miRNAs ao potencial alvo. O nível de expressão baseado no valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ está representado em esquema de cores variando de verde escuro (menos expresso) a vermelho escuro (mais expresso). Os miRNAs let-7a-5p* (regulado positivamente na forma virchowiana) que possuem como alvo TLR4, foi escolhido como alvo de estudo. O miRNA let-7-5p é destacado pelo círculo em vermelho assim como o mediador inflamatório (Santana, 2018).

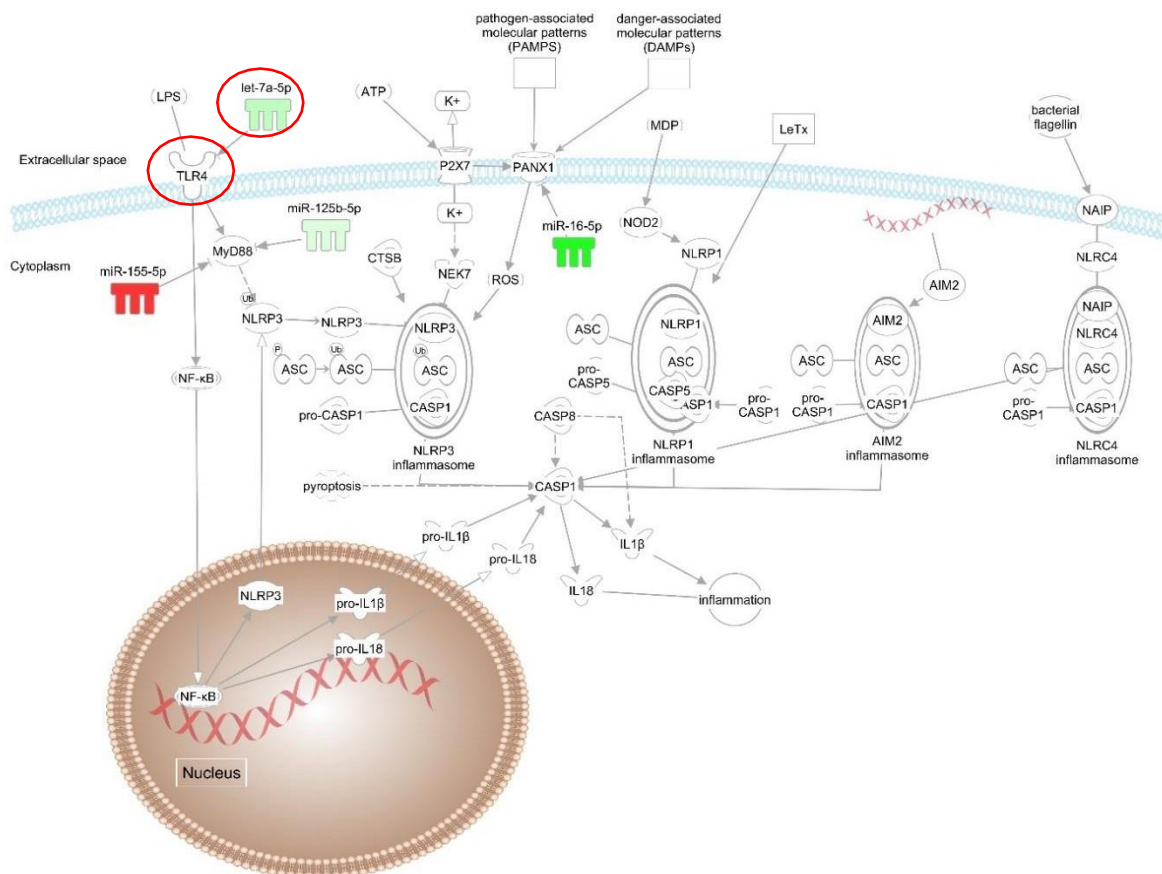


Figura 13. Predição de modulação da via de sinalização por TLRs na forma Tuberculóide. Setas ligam o miRNA ao potencial alvo. O nível de expressão baseado no valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ está representado em esquema de cores variando de verde escuro (menos expresso) a vermelho escuro (mais expresso). O miRNA let-7a-5p (regulado positivamente na forma virchowiana) que possui como alvo TLR4, foi escolhido como alvo de estudo. O miRNA let-7-5p é destacado pelo círculo em vermelho assim como o mediador inflamatório (Santana, 2018)

III - RELEVÂNCIA

Apesar dos avanços no combate à disseminação, a hanseníase continua sendo um problema de saúde pública no mundo, especialmente no Brasil, que é o segundo país em número de novos casos diagnosticados. As manifestações clínicas da hanseníase seguem um espectro de gradação baseado na resposta imuno inflamatória e, apesar de existirem estudos, os mecanismos que regulam esta resposta são pouco conhecidos. Portanto este trabalho se justifica no sentido de que, a função de miRNAs representa um importante mecanismo de regulação da

expressão gênica na hanseníase sendo que estes podem estar envolvidos no controle dos processos imunológicos e inflamatórios relacionados à fisiopatologia da doença. Resultados prévios demonstram que miRNAs tem um alto potencial de controle destas respostas na hanseníase, especialmente o let-7a-5p que possui como alvo o receptor do tipo Toll (TLR4) e, portanto, caracterizar estes mecanismos pode abrir outros caminhos para compreender melhor a resposta imunológica da doença e o desenvolvimento das diversas formas clínicas.

IV.1 - OBJETIVOS

IV.1.1. Objetivo Geral

Objetivo deste trabalho é caracterizar a função do miRNA let-7a-5p no controle da sinalização celular mediada por TLR4 e relacionar com a fisiopatologia da hanseníase.

IV1.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a especificidade do miRNA let-7a-5p por seu gene alvo (TLR4).
- Avaliar o papel do miRNA let-7a-5p in vitro em fibroblastos L929 ativadas por estímulos pró-inflamatórios.
- Avaliar a expressão tanto de TLR4 quanto do miRNA let-7a-5p, após os estímulos.

V.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

V.1.1. Avaliação da expressão de miRNA e seu alvo e a produção de citocinas

V.1.2. Cultivo da linhagem celular de fibroblastos murinos (L929)

A linhagem de células L929 (ATCC) foi cultivada em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM Cultilab) suplementada com 10% de soro fetal bovino, 100 µl/mL de penicilina e 100 µl/mL de estreptomomicina e mantida em estufa controlada a 37°C e 5% CO₂.

V.1.3. Estímulo dos fibroblastos L929

As células L929 foram cultivadas (1x10⁵ células por poço) em placa de 48 poços, por 16 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente o meio de cultura foi retirado e as células foram estimuladas com antígeno de *M. leprae* (irradiado de célula total – WCS NR-19329 cedido pela BEI Resources, NIAID 10 µg/mL), LPS (100 ng/mL) e incubadas por 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ (para os grupos com mais de um estímulo, o primeiro estímulo foi aplicado por 1 hora e o segundo por mais 2 horas). Para os estímulos, as células L929 foram divididas em grupos: antígeno de *M. leprae*, LPS, antígeno+LPS e controle.

V.1.4. Quantificação de citocinas por ELISA

Para análise dos níveis da quimiocina CXCL1 no sobrenadante da linhagem L929 foi feito o ensaio de ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&B Systems ELISA). No primeiro dia foram adicionados o anticorpo de captura diluído em PBS e incubada a 4°C por 24 horas. No segundo dia a placa foi lavada com tampão de lavagem (PBS 1X e tween 20) e foi então adicionado 100 µl/poço do tampão de bloqueio (PBS e BSA 1%). A placa foi incubada em temperatura ambiente por 1h sob agitação constante. Após este período foi adicionado os padrões, das amostras e do branco e as mesmas foram incubadas a 4°C por 20 horas. No terceiro dia as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS e Tween) e foram adicionados o anticorpo de detecção biotilado diluído em BSA 0,1% (PBS e BSA 1%). As placas foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 2 horas., as placas foram lavadas novamente com tampão de lavagem e foi adicionado 50 µl/poço de solução de estreptavidina, e incubada por mais 30 minutos. Então foi adicionado 50µL/poço de solução substrato (OPD, tampão citrato e H₂O₂) e incubada por 20 minutos. Após os 20 minutos foi

adicionado 25 µl/poço da solução de parada (H₂SO₄) e em seguida as placas foram lidas no leitor de placas de ELISA.

V.1.5. Extração de RNA

As células L929 foram coletadas e lisadas com a adição de 400µL de QiAzol Lysis Reagent (Qiagen). O RNA foi extraído utilizando miRNeasy Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. O lisado foi transferido para microtubos e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação foram adicionados 140 µl de clorofórmio e homogeneizado em vórtex, seguido de uma centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Coletou-se fase superior e a ela foram adicionados 1.5 volumes de etanol 100%. 700 µl da amostra que foram transferidos para a coluna RNeasy Mini Spin seguido de centrifugação a 8000 g por 15 segundos a temperatura ambiente, repetindo-se este passo com o restante da amostra. As colunas foram lavadas com 700 µl de tampão RWT uma vez e duas vezes com 500 µL de tampão RPE. O RNA total foi eluído pela adição de 14 µl de água livre de nucleases.

V.1.6. Avaliação da expressão de miRNAs por RT-qPCR

O RNA extraído foi usado para RT-qPCR. Para a reação foi feito o mix de reação contendo: 1.5 µL de 10X Megaplex RT Primer Pool A (Applied Biosystems), 0.2 µL de dNTPs 100 mM, 1.0µL de MultScribe Reverse Transcriptase 50U/µL, 1.5 µL de 10X Reverse Transcriptional Buffer e 1.2 µL de H₂O livre de nucleases. Feito o mix, a ele foi adicionado à 5 µL de RNA total (1 a 10ng). Logo após, as amostras foram colocadas em termociclador nas seguintes condições de ciclagem: 16°C por 30 minutos, 42°C por 1 hora, 85°C por 5 minutos, 4°C hold. Terminada a etapa de construção do cDNA, foi preparado o mix de reação para qRT-PCR contendo 5µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG (Applied Biosystems), 0.5 µL de 20X TaqMan miRNA Assay (Applied Biosystems) e 3.5 µL de H₂O livre de nucleasse. A cada reação foi adicionado 1 µL do produto de cDNA. A reação então ocorreu em termociclador nas condições: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Para a normalização dos resultados foi utilizado um gene constitutivo (U6).

V.1.7. Transfecção do mímico do miRNA

As células L929 foram cultivadas (1×10^5 células por poço) em placa de 48 poços por 16 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Posteriormente o meio de cultura foi retirado e foi inserida a formulação contendo o mímico de let-7a-5p e incubada por 1 hora em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após a incubação o meio foi trocado e foi adicionado os estímulos LPS e em seguida incubadas por mais 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , o mesmo foi realizado com o veículo (nanopartícula + scramble – sequência de nucleotídeos diferente do mímico que representa um controle negativo), com diferença no tempo (estímulo por 3 horas) e o fato de ser somente este estímulo. O sobrenadante foi coletado para fazer o teste de ELISA e as células foram coletadas para qRT-PCR.

V.2. Validação do miRNA e monitoramento da expressão gênica

V.2.1. Clonagem dos fragmentos no plasmídeo TOPO-TA

O fragmento 3' UTR (TLR4) que foi sintetizado, foi clonada em plasmídeo TOPO-TA (Thermo Fisher) de acordo com o protocolo do fabricante. O fragmento foi adicionado juntamente com o plasmídeo e incubados por 5 minutos com a DNA ligase, após feita a ligação o plasmídeo foi transformado com as bactérias (*DH5 α*) eletrocompetentes. Na figura 14 podemos observar o mapa do plasmídeo TOPO-TA (Thermo fisher).

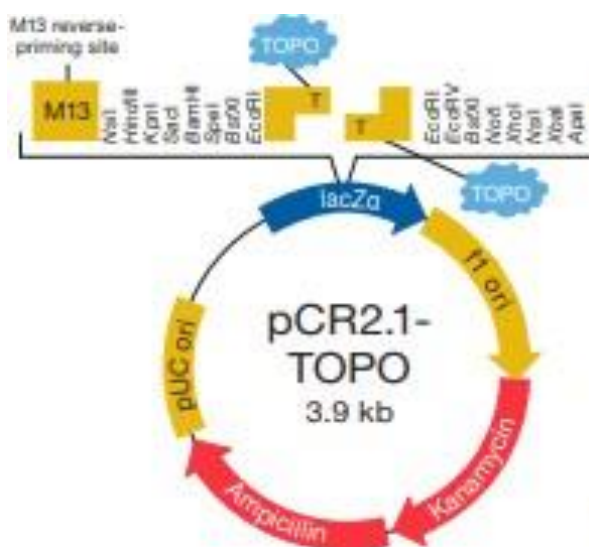


Figura 14. Mapa do plasmídeo TOPO-TA (Thermo Fisher)

V.2.2. Sequência do miRNA e 3'UTR do alvo

A amostra do fragmento 3'UTR de TLR4, foi sintetizada (Integrated DNA Technologies), assim como a sequência do miRNA (let-7a-5p). Podemos observar na sequência do fragmento (Figura 15A), em amarelo a região onde o miRNA irá se ligar e as regiões marcadas em vermelho e verde onde as enzimas de restrição XhoI e NotI (respectivamente) irão atuar. Já na sequência do miRNA (Figura 15B) se destaca em amarelo a sequência que irá se ligar ao respectivo alvo, já com o pareamento na região de ligação da 3'UTR de TLR4. Já a figura 15 C se destaca a sequência do Scramble que funcionará como um controle negativo do mímico de let-7a-5p

A- TLR4

CG**CTCGAG**CGAACACTTGTTCAGTTAATAAGTATTAATGCTGCCACATGTCAGGCCTTATGCTAA
GGGTGAGTAATTCCATGGTGCCTAGATATGCAGGGCTGCTAATCTCAAGGAGCTTCCAGTGCAGA
GGGAATAAATGCTAGACTAAAATACAGAGTCTTCCAGGTGGGCATTTCAACCAACTCAGTCAAGG
AACCCATGACAAAGAAAGTCATTTCAACTCTTAC**CTCATC**AAGTTGAATAAAGACAGAGAAAACA
GAAAGAGACATTGTTCTTTTCCTGAGTCTTTTGAATGGAAATTGTATTATGTTATAGCCATCATAAA
ACCATTTTGGTAGTTTTGACTGAACTGGGTGTTCACTTTTTCCTTTTTGATTGAATACAATTTAAATT
CTACTTGATGACTGCAGTCGTCAAGGGGCTCCTGATGCAAGATGCCCTTCCATTTAAGTCC**GCGG**
CCGC

Figura 15 A- Sequência do fragmento 3'UTR de TLR4.

B- Sequência Let-7a-5p

U**GAGGUAG**UAGGUUGUAUAGU let-7a-5p
| | | | |
...**CTC ATC**AAGTTGA... região de ligação da 3'UTR de TLR4

Figura 15 B- Sequência de let-7a-5p com pareamento na 3'UTR de TLR4.

C – Sequência do Scramble

GCGUAUUAUAGCCGAUUAACGA

Figura 15 C – Sequência do Scramble. Controle negativo do mímico de let-7a-5p.

V.2.3. Clonagem dos fragmentos no plasmídeo psiCHECK2

A amostra do fragmento 3'-UTR (TLR4), foi obtida através de uma digestão do plasmídeo TOPO através das enzimas NotI e XhoI. Após o fragmento estar separado do plasmídeo TOPO, foi feita uma clonagem destes fragmentos no plasmídeo psiCHECK2. Para a inserção dos alvos no plasmídeo o mesmo foi incubado por 16 horas com DNA ligase (thermo fisher) de acordo com o protocolo do fabricante. Na figura 18 pode-se observar o mapa do plasmídeo psiCHECK2. Este plasmídeo permite o monitoramento de alterações na expressão de um fragmento alvo (3'UTR TLR4) fusionado a um gene repórter (hRluc—Renilla Luciferase). A luciferase Renilla é usada como um repórter primário, o fragmento alvo foi clonado em uma região a jusante do códon de parada da hRluc. Portanto a ligação de um miRNA no fragmento alvo resultará na clivagem e degradação do mRNA da luciferase, impedindo a quimioluminescência.

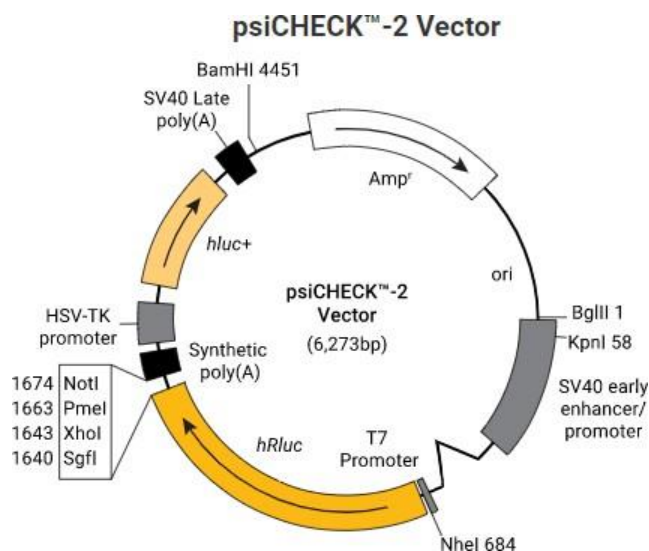


Figura 16. Mapa do plasmídeo PsiCHECK -2.

V.2.4. Transformação em *E.-coli*

O clone do plasmídeo psiCHECK2 com o respectivo alvo (TLR4) foi inserido na bactéria *E.coli* por transformação. Para cada transformação foram acrescentados 40 μL de suspensão de células (3×10^{10}) e cerca de 1-5 μg de DNA plasmidial. Logo após a células foram transferidas para cubetas de eletroporação (BioRad) previamente resfriadas a 0°C e foram submetidas a 25 μF , 200 ω e 2,5 kV no aparelho Gene Pulser. Após serem eletroporadas foi adicionado 1 ml de meio LB à mistura e incubado sob agitação constante de 200 rpm por 1 hora

a 37°C. Após este período, foram semeadas em meio de cultura LB sólido acrescido de antibiótico (ampicilina 1mg/mL) e incubada a 37°C por aproximadamente 16 horas.

V.2.5 Transfecção do mimico do miRNA

A Transfecção foi realizada em linhagem celular embrionária humana de rim (HEK293T), plaqueadas na concentração 8×10^4 células por poço, em placa de 96 poços por 16 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente o meio de cultura foi retirado e foi inserida a formulação com o plasmídeo contendo 3'UTR de TLR4 em uma concentração de 0,4 µg e foi incubada por 6 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após a incubação foi trocado o meio de cultura e adicionada a formulação contendo o mímico de let-7a-5p e incubada por mais 12 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após as 12 horas foi feita a leitura de luminescência nos tempos de 0,10,30,60 e 120 minutos em um luminômetro.

V.2.6. Formulação plasmídeo/nanopartícula

As formulações contendo a nanopartícula LNP, usadas para este trabalho foram cedidas pelo professor Pedro Guimarães do Departamento de Fisiologia e Biofísica.

V.2.7. Sistema de Ensaio de Luciferase

Para quantificação da luminescência produzida pelo plasmídeo psiCHECK foi utilizado o kit Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em cada poço da placa, foi adicionado um volume de reagente Dual-Glo® igual ao volume de meio de cultura no poço (Para placas de 96 poços, foram adicionados 75 µl de Reagente às células cultivadas em 75 µl de meio). A placa foi incubada por 15 minutos para permitir que a lise celular ocorresse e, em seguida, a luminescência gerada pela luciferase firefly foi medida em um luminômetro nos tempos de 0,10,30,60,90 e 120 minutos. Após a mensuração, foi adicionado um volume de reagente Dual-Glo® Stop & Glo® igual ao volume do meio de cultura original para cada poço e misturado. Em seguida, a luminescência gerada pela luciferase Renilla foi medida nos tempos de 10,30,60,90 e 120 minutos. A razão de luminescência do repórter experimental para luminescência do repórter de controle então foi calculada.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad Prism 8.0.1 empregando o teste de One-way ANOVA que verifica se as médias de “K” amostras independentes diferem entre si. O teste de Tukey foi utilizado quando necessário a análise de variância e comparação múltipla entre as médias de experimentos. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. Foi utilizado também o teste T, que é utilizado para determinar se existe uma diferença significativa entre as médias de duas amostras independentes. Para a normalização foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk que avalia se uma amostra de dados segue uma distribuição normal. A hipótese nula (H_0) é que os dados são normalmente distribuídos. Se o valor-p do teste for maior que o nível de significância escolhido (geralmente 0,05), então não há evidências suficientes para rejeitar a hipótese nula e conclui-se que os dados podem ser aproximadamente normais.

VI.1. - RESULTADOS E DISCUSSÃO

VI.1 Validação do miRNA let-7a-5p

V.1.1 Clonagem TOPO-TA

Para a validação funcional dos resultados prévios de predição da atuação do miRNA let-7a-5p no controle da expressão de TLR4, foi sintetizado o fragmento 3'-UTR do gene de TLR4. As sequências foram clonadas em plasmídeo TOPO-TA.

Para confirmar a clonagem, foi realizada uma análise de restrição com as enzimas *XhoI* e *NotI*. A figura 17 mostra um gel de agarose 1% no qual foram resolvidas as amostras. Na canaleta 1 observa-se plasmídeo íntegro circular, com aproximadamente 3,9Kb; na canaleta 2 o mesmo plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição demonstrando a liberação do fragmento clonado com tamanho esperado de 461pb e na canaleta 3 pode se observar o produto de uma PCR convencional utilizando os *primers* M13 (que flanqueiam o sítio de clonagem no plasmídeo TOPO-TA) demonstrando a amplificação do inserto clonado com tamanho esperado de 666pb.

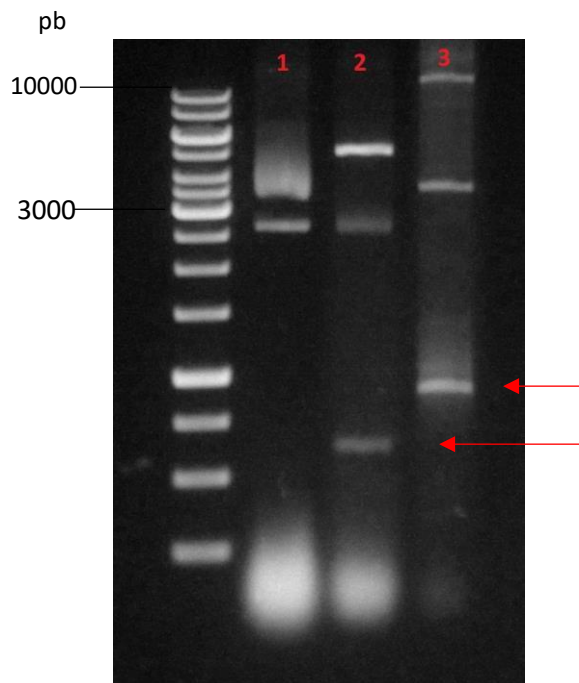


Figura 17. Clonagem dos fragmentos em plasmídeo TOPO. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1% resolvendo o perfil de restrição dos clones obtidos. Canaleta 1 demonstra o plasmídeo íntegro; Na canaleta 2 pode-se observar o produto de uma digestão do plasmídeo com as enzimas *XhoI* e *NotI* de TLR4, mostrando o fragmento clonado com 461pb e na canaleta 3 pode-se observar o produto de uma PCR com a amplificação do fragmento no tamanho de 666pb.

VI.1.2. Avaliação da especificidade do miRNA por seu gene alvo (TLR4)

Para avaliarmos a especificidade de let-7a-5p por TLR4, foi realizada uma clonagem do alvo (3'-UTR TLR4) em plasmídeo psiCHECK2, através de uma digestão dos plasmídeos TOPO-TA utilizando as enzimas *XhoI* e *NotI*. A figura 18 representa a confirmação da clonagem no plasmídeo psiCHECK2 que foi realizada através de um PCR convencional com primers flanqueadores do sítio de clonagem. Pode-se observar, na canaleta marcada com número 3, a presença de um fragmento de amplificação mais intenso e com tamanho de aproximadamente 600pb, representando o fragmento 3'-UTR de TLR4, além de duas outras

amplificações inespecíficas. As canaletas 1,2 e 4 representam PCRs negativas de outros candidatos.

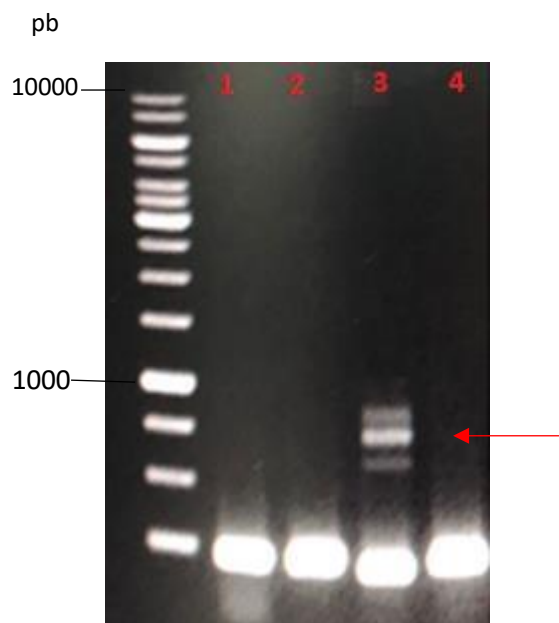


Figura 18. Clonagem dos fragmentos em plasmídeo psiCHECK2. Fotografia de eletroforese em gel de agarose 1% resolvendo as PCRs dos clones obtidos. As amplificações foram realizadas com primers específicos para psiCHECK2, flanqueadores dos sítios de clonagem de TLR4 as demais canaletas sem numeração são amostras que não continham os fragmentos.

VI.1.3. Transfecção

Para avaliar a interação do miRNA let-7a-5p com a respectiva via TLR4, e validar o mesmo, transfectamos as células HEK293T com as formulações contendo a nanopartícula LNP e os plasmídeos contendo os fragmentos 3'UTR de TLR4, ou o mímico de let-7a-5p. De acordo com as análises *in silico*, geradas previamente com o perfil de expressão de miRNAs e genes inflamatórios, a hipótese é que let-7a-5p atue diretamente na região terminadora do gene de TLR4, controlando sua expressão. Para avaliar esta hipótese, utilizou-se o sistema de luminescência gerado pela luciferase Renilla contida no plasmídeo psiCHECK2. Nesta construção a região 3'-UTR do gene de TLR4 foi clonada à jusante do gene da luciferase Renilla de modo a permitir que o miRNA pudesse interagir com seu sítio de ligação afetando ou não a transcrição da luciferase.

No entanto, com a transfecção realizada pode-se observar na figura 19A uma cinética de produção de luminescência nas células HEK293T transfectadas com o plasmídeo psiCHECK2 contendo o fragmento 3' UTR de TLR4 clonado (círculos pretos). Podemos observar um aumento gradual de luminescência, normalizado pela atividade de luminescência da luciferase firefly bem como pela quantidade de proteínas totais utilizadas no ensaio. Já as células que continham o plasmídeo com o fragmento e a presença do mímico do miRNA let-7a-5p, demonstraram o mesmo aumento gradual da luminescência, no entanto, em níveis normalizados menores, demonstrando que o miRNA (mímico) foi eficiente em interferir na produção de quimiluminescência. A figura 19B demonstra estes mesmos resultados quantificados através do cálculo da área sobre a curva (AUC) evidenciando que o mímico do miRNA diminuiu a luminescência em aproximadamente 30% em comparação com a produzida pelo grupo controle, ou seja, sem a presença do mímico.

Estes resultados demonstram que, assim como inicialmente predito em resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, o gene TLR4 é alvo do miRNA let-7a-5p.

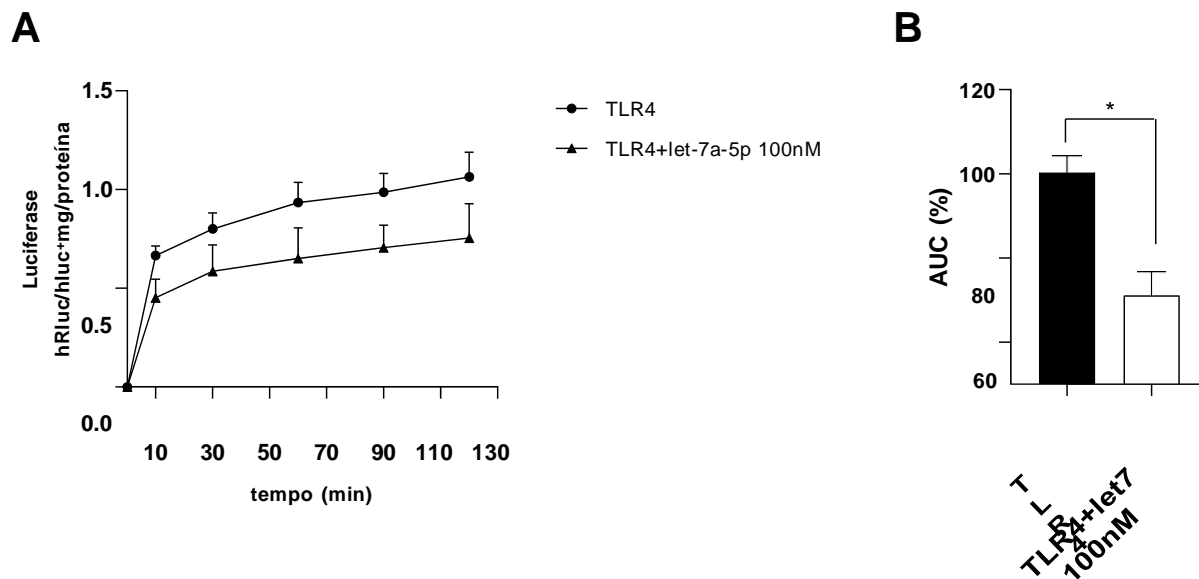


Figura 19. Transfecção do plasmídeo (psiCHECK2+3'UTR TLR4) e do plasmídeo + mímico let-7a-5p. A imagem 1 demonstra a produção de luciferase do plasmídeo em HEK293T e a do plasmídeo + mímico do let-7a-5p em diferentes tempos de leitura no luminômetro. A imagem 2 demonstra os mesmos resultados do gráfico 1 através do cálculo de área sobre a curva (Teste T * $p < 0.05$).

Estudos recentes feitos com a família do miRNA let7 como o de Chen e colaboradores

(2021) demonstraram que o miR let-7b pode alterar a função de neutrófilos ao suprimir a via

de sinalização TLR4/NF- κ B. Os resultados obtidos através da cultura de células com mimetizadores de miR-let-7b resultou em uma redução em TLR4 e NF- κ B p65 nuclear. Os autores ainda demonstram que a restauração dos níveis de miR let-7b podem efetivamente diminuir os níveis de IL-6, IL-8 e TNF- α , em neutrófilos humanos recém-isolados.

Luo e colaboradores (2022) demonstraram através de experimentos com células e camundongos que a expressão de MyD88 pode ser regulada por MEG3-205, um *long non coding* RNA (lncRNA) através da competição pela ligação de let-7a, e pode ser um importante mecanismo subjacente na inflamação renal e fibrose em nefropatia diabética. Seus resultados no ensaio de quimioluminescência evidenciaram que a atividade de luciferase em células contendo a região 3'UTR de MyD88 foi significativamente diminuída na presença de 100nM do mímico de let-7a, demonstrando que let-7a interfere na via de MyD88.

VI.2 Avaliação do papel do miRNA let-7a-5p in vitro e da expressão de TLR4 e do miRNA após estímulos pró-inflamatórios

VI.2. 1. Padronização de um sistema de estímulos e ativação da resposta inflamatória

Uma vez identificado que let-7a-5p atua diretamente no controle da expressão de TLR4, nosso objetivo foi avaliar o comportamento desse miRNA no controle da produção de mediadores inflamatórios após o estímulo de TLR4 em um sistema *in vitro*. Para atingir este objetivo padronizamos um sistema de estímulos em uma linhagem de fibroblastos imortalizados, células L929, que foram estimuladas com diferentes agonistas. Os estímulos da célula L929 foram realizados com LPS (100 ng/mL) e antígeno de *M. leprae* (10 μ g/mL), conforme descrito no item V.1.3., da seção de metodologia. Após ativação de TLR4 inicia-se a cascata de sinalização com ativação de Myd88 que transloca NF- κ B para o núcleo que vai ativar a transcrição de genes inflamatórios. Dentre eles destacam-se quimiocinas como CXCL1.

A figura 20 demonstra os níveis de quimiocinas CXCL1 após os estímulos utilizados. pode-se observar que em condições controle (sem estímulo) os níveis de CXCL1 encontram-se na ordem de 150pg/mL. No entanto, estes níveis são rapidamente revertidos a níveis superiores a 600pg após estímulos com LPS. Em um sistema onde estimulamos em duas etapas, sendo a primeira por 1 hora e a segunda por mais 2 horas, seja com duas estimulações com o antígeno

de *M. leprae* ou LPS seguido de antígeno de *M. leprae*, os níveis de CXCL1 no sobrenadante da cultura se mantem elevados (acima de 500 pg/mL). Estes resultados corroboram com os da literatura onde a ativação da via de TLR4 gera a produção e secreção de mediadores inflamatórios como as quimiocinas CXCL1 (Filippo *et.al.*, 2013; Guijarro *et.al.*,2014; Bigorgne *et.al.*2016).

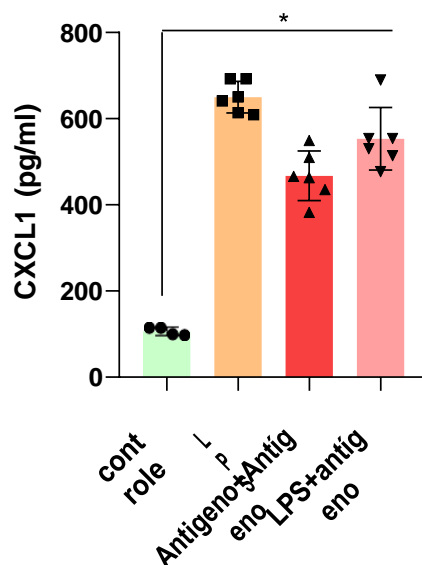


Figura 20. Produção da quimiocina CXCL1, por fibroblastos L929 após estímulo com antígenos de *M. leprae* e LPS. Os fibroblastos L929 foram estimulados com LPS, antígeno de *M. leprae* e LPS+antígeno e a produção das quimiocinas foi mensurada por ELISA. A produção de CXCL1 foi aumentada em resposta a adição dos estímulos (One way ANOVA * $p < 0.05$)

O fator de transcrição NF κ B é um importante determinante da transcrição do gene CXCL1 induzida por LPS e é um importante mediador a jusante na sinalização dependente de RIPK1 (Zhao, 2014). De acordo com Fillipo e colaboradores (2008) foram identificados que os macrófagos teciduais são a principal fonte das quimiocinas KC e MIP-2 que recrutam neutrófilos em resposta à sinalização de receptores TLR no início de uma resposta imune inata. As quimiocinas são produzidas em resposta ao estímulo de receptores TLRs em macrófagos, mas há diferenças nas vias de sinalização envolvidas pois, ambos KC e MIP-2 são sintetizados através da sinalização da via MyD88, mas o MIP-2 sozinho também é sintetizado como um produto direto da via TRIF.

Outro estudo mostra que em termos de liberação dos grânulos que expressam CXCL1/CXCL2 *in vivo*, a mesma ocorreu de maneira dependente de receptores TLR4 e TIRAP/MyD88, sem dependência da segunda via de sinalização TRAM/TRIF controlada por receptores TLR4 que é acessada por receptores TLR4 endocitados. O envolvimento da via de

sinalização MyD88 é compatível com o estudo anterior do mesmo autor, mostrando que o recrutamento de neutrófilos em resposta ao LPS é dependente de MyD88, mas não de TRIF (Fillipo *et.al.*, 2013).

Após padronizar um sistema de estímulos, escolhemos o LPS por estimular uma maior produção de CXCL1 e ser o agonista direto de TLR4. Para avaliar a funcionalidade do miRNA let-7a-5p e a sua especificidade frente ao alvo, inoculamos a nanopartícula LNP contendo o mímico do miRNA em célula L929.

VI.2.2. Avaliação da expressão do miRNA por RT-qPCR

Nosso próximo passo foi avaliar a expressão do miRNA let-7a-5p nestas células estimuladas com LPS. A análise foi realizada através da extração de RNAs das células L929 estimuladas com LPS (100ng/mL) e posterior RT-qPCR. Na figura 21 pode-se observar a expressão do miRNA let-7a-5p em células estimuladas com LPS ou não. Notamos que em condições em que as células L929 foram estimuladas com LPS, a expressão do miRNA reduziu significativamente em relação às células não estimuladas. Este resultado demonstra que a repressão do miRNA let-7a-5p pode contribuir para a ativação da via pró-inflamatória induzida por TLR4.

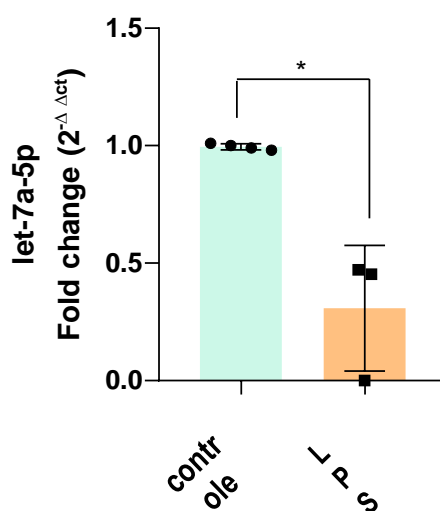


Figura 21. Expressão de let-7a-5p por fibroblastos L929 após estímulo com LPS. Os fibroblastos foram estimulados ou não com LPS e a expressão do miRNA foi mensurada por qRT-PCR. let-7a-5p é inibido em resposta a adição do LPS. Para a normalização dos dados foi utilizado o gene constitutivo U6. (Teste T * $p < 0.05$).

O miRNA let-7i, pertencente a mesma família pode contribuir para a ativação prolongada do sinal TLR4 em monócitos obtidos de pacientes com doença coronariana (Satoh *et.al.*, 2011), corroborando com o papel de let-7a-5p na modulação de TLR4. Além disso, outro miRNA da mesma família let-7f-5p, apresenta modulação negativa em pacientes com hanseníase em relação a indivíduos saudáveis, porém em sangue (Salgado, *et.al.*, 2018). Já let-7i também apresentou uma menor expressão em colagínocitos após a infecção por *C. parvum* e estimulação por LPS, por meio de um mecanismo dependente de MyD88/NF- κ B (Chen, *et.al.*, 2007).

VI.2.3. Avaliação do papel do miRNA let-7a-5p em células ativadas por estímulo pró-inflamatório

De acordo com o nosso resultado anterior a repressão do miRNA let-7a-5p pode contribuir para a ativação da via pró-inflamatória induzida por TLR4. Neste sentido decidimos avaliar a modulação das quimiocinas CXCL1 secretadas por esta via após o tratamento com o mímico do miRNA e posterior estímulo pró-inflamatório.

Na figura 22 pode-se observar que em condições controle (sem estímulo) os níveis de CXCL1 se mantêm mais baixos (aproximadamente 250pg/mL). A transfecção das células com as nanopartículas contendo miRNA *scramble* foi realizada e demonstrou um aumento significativo na produção de CXCL1. No entanto, o estímulo com LPS, reproduziu os resultados obtidos anteriormente com níveis de CXCL1 acima de 600 pg/mL e, de maneira muito interessante, a transfecção dos fibroblastos com nanopartículas contendo o mímico de let-7a-5p, antes do estímulo com LPS foi responsável por restabelecer a produção de CXCL1 aos níveis encontrados no grupo *scramble*.

Estes resultados demonstram que as nanopartículas são responsáveis por uma estimulação de fibroblastos L929, mas, corroborando nossa hipótese, let-7a-5p é capaz de interferir na produção de CXCL1 sob efeito direto de agonista do receptor TLR4, LPS.

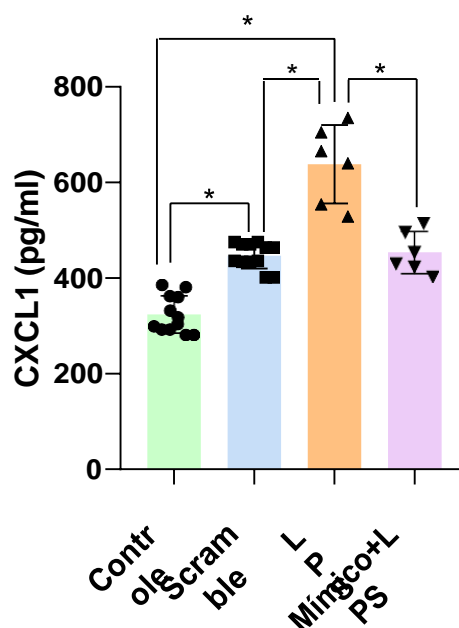


Figura 22. Produção da quimiocina CXCL1, por fibroblastos L929 após estímulo com LPS e mímico do let-7a-5p+LPS. Os fibroblastos foram estimulados ou não com LPS e a produção das quimiocinas foi mensurada por ELISA. A produção de CXCL1 foi diminuída em resposta a adição prévia do mímico de let-7a-5p (One way ANOVA * $p < 0.05$).

Chen e colaboradores, em 2022 demonstraram em seu estudo que a ativação de TLR4 desencadeia resposta inflamatória mediada por NF- κ B, enquanto LIN28 e let-7 miRNA são indicados no desenvolvimento tumoral e estão associados à inflamação. Uma correlação positiva foi encontrada entre TLR4 e LIN28A, enquanto uma correlação negativa foi demonstrada entre let-7g miRNA e TLR4 ou LIN28A. Para mimetizar a inflamação crônica com ativação persistente de TLR4, eles cultivaram células PLC5 em meio contendo LPS de baixa dose; dessa forma, demonstraram que os níveis de mRNA e proteínas de TLR4 e LIN28A estavam elevados. O aumento de LIN28A levou a uma diminuição do miRNA let-7g. Além disso, o 3'UTR do mRNA de TLR4 mostrou ser o alvo do let-7g miRNA, sugerindo que a inibição do let-7g miRNA foi capaz de aumentar o mRNA de TLR4.

Assim como nós demonstramos com let-7a e Chen com let-7g, Li e colaboradores, em 2021 demonstraram com a mesma família de miRNAs que a regulação negativa de let-7e melhorou a lesão pulmonar causada por LPS através da supressão da resposta inflamatória. Além disso, observaram também que o knockdown de let-7e reduziu significativamente a secreção de citocinas pró-inflamatórias induzida por LPS.

Liqun Sun e colaboradores (2020) também demonstraram que let-7d-5p suprime a resposta inflamatória em ratos com enterocolite necrozante (NEC) através da via de TLR4 mediada por LGALS3. Através da análise de tecidos intestinais de ratos NEC foi possível avaliar a superexpressão de LGALS3, TLR4 e NF- κ B e uma menor expressão de let-7d-5p. Além disso, a superexpressão de let-7d-5p resultou na diminuição dos níveis de fatores pró-inflamatórios nos tecidos intestinais de ratos NEC.

VI.2.4. Avaliação da expressão do mRNA de TLR4 por RT-qPCR

Nosso próximo passo foi analisar então a expressão de TLR4 através da extração de RNAs das células L929 estimuladas com LPS (100ng/mL) e mímico do let-7a-5p (100nM) + LPS e posterior RT-qPCR. Uma vez que o miRNA let-7a-5p é capaz de alterar a produção das quimiocinas secretadas por esta via inflamatória.

Na figura 23 pode-se observar a expressão de TLR4 em células estimuladas com LPS e em células que foram tratadas com o mímico antes da estimulação com LPS. Notamos que em condições em que as células L929 foram tratadas com o mímico do let-7a-5p e estimuladas com LPS, a expressão de TLR4 reduziu de modo significativo em relação às células que foram somente estimuladas com LPS. Este resultado, juntamente com os resultados demonstrados anteriormente, demonstra que a presença do mímico do let-7a-5p pode realizar a repressão do mediador inflamatório, diminuindo a expressão de TLR4.

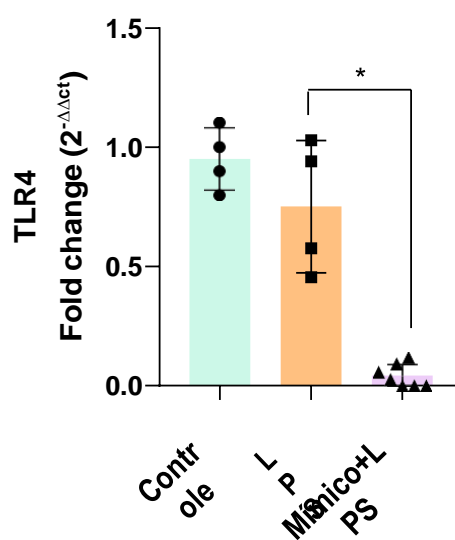


Figura 23. Expressão do mediador inflamatório TLR4 por fibroblastos L929 após estímulo com LPS e tratamento com o mímico do let-7a-5p. Os fibroblastos foram estimulados com LPS e tratados com o mímico antes da estimulação com LPS e a expressão do mediador inflamatório foi mensurada por qRT-PCR. TLR4 é inibido em resposta a adição do mímico de let-7a-5p. Para a normalização dos dados foi utilizado o gene constitutivo 18S.(One way ANOVA *p<0.05).

Li e colaboradores em 2019 elaboraram um estudo, onde avaliaram o papel do microRNA-451 em um modelo de isquemia-reperfusão cerebral. Seus resultados demonstraram que o miRNA-451 regula a inflamação da doença através da via TLR4/MyD88/NF- κ B. Suas análises de RT-qPCR mostraram que a regulação negativa do miRNA induziu uma maior expressão do mRNA que codifica TLR4, MyD88 e NF- κ B/p65 *in vitro*. E a análise de Western blot mostrou que a regulação negativa do miRNA também induzia expressão de TLR4, MyD88 e NF- κ B/p65 no nível de proteína *in vitro*.

Sato e colaboradores (2012) demonstraram em seu estudo a interferência do miRNA let-7i na via de TLR4 em modelo de doença arterial coronariana. Seus resultados demonstraram que houve uma diminuição da expressão tanto do mRNA, quanto da proteína de TLR4 nas células tratadas com o miRNA e o efeito contrário nas células que continham o inibidor de let-7i.

Já Geng e colaboradores em 2023 produziram um estudo que demonstra que um composto da medicina chinesa atenua a transformação hemorrágica através da interação entre let-7f e a via TLR4. O composto regula positivamente a expressão de let-7f e este miRNA é capaz de regular a via de TLR4. Através de um imunoblotting e um RT-qPCR puderam observar que o mímico de let-7f inibiu a expressão tanto do mRNA quanto da proteína de TLR4, MyD88 e NF- κ B p65 em macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS. Além disso resultados opostos foram obtidos através do inibidor de let-7f.

VII – CONCLUSÕES

A hanseníase é uma doença negligenciada, que ocorre com grande incidência principalmente no Brasil. O espectro de gradação da doença se baseia na resposta imuno inflamatória, e seus mecanismos ainda são desconhecidos. Portanto, caracterizar melhor estes

mecanismos podem abrir outros caminhos para compreender melhor a doença e seu espectro de gradação.

Neste estudo, foi realizada a investigação funcional de modulação de expressão de TLR4 por let-7a-5p. Foi possível constatar a interferência de let-7a-5p na via de TLR4. Conseguimos observar também a modulação do mediador sob controle da via de estudo em resposta ao estímulo com LPS nas condições realizadas. Observamos a alteração da expressão de let-7a-5p após o estímulo com LPS e a alteração da expressão de mRNA de TLR4 em células tratadas com o mímico de let-7a-5p.

Podemos concluir que a partir do momento em que let-7a-5p está modulado negativamente, a via de TLR4 se desencadeia de forma normal, aumentando os níveis de mediadores pró-inflamatórios como CXCL1. No entanto quando o miRNA se encontra modulado positivamente, ocorre a repressão da expressão de TLR4 e a diminuição da expressão da produção de CXCL1.

Nossos resultados obtidos através deste estudo corroboram os resultados obtidos em análise *in silico* através de amostras de pele de pacientes com os dois polos da hanseníase, onde sugeriam que no polo Tuberculoide o miRNA estaria modulado positivamente, permitindo pacientes com este espectro da doença desenvolvam uma resposta imune mais eficaz, e no polo virchowiano o miRNA estaria modulado positivamente, acarretando uma diminuição da expressão da via de TLR4.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AYDIN, Efruz Pirdoğan et al. Can miRNA Expression Levels Predict Treatment Resistance to Serotonin Reuptake Inhibitors in Patients with Obsessive-Compulsive Disorder?. **PSYCHIATRY AND CLINICAL PSYCHOPHARMACOLOGY**, v. 32, n. 2, p. 98-106, 2022.

BHAT, Ramesh Marne et al. Leprosy: an overview of pathophysiology. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, 2012.

BIGORGNE, Amélie E. et al. TLR4-dependent secretion by hepatic stellate cells of the neutrophil-chemoattractant CXCL1 mediates liver response to gut microbiota. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0151063, 2016.

BOCHUD, P.-Y. et al. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, p. 1055-1065, 2009.

CARDOSO, Ana P. Ferragut et al. miRNA dysregulation is an emerging modulator of genomic instability. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2021. p. 120-131.

CHEEMA, Z. F.; AKRAM, Y.; NATIONS, S. Leprosy: Immunopathology, neurologic Manifestations and Treatment. 2003.

CHEN, I.-Ting et al. Persistent TLR4 Activation Promotes Hepatocellular Carcinoma Growth through Positive Feedback Regulation by LIN28A/Let-7g miRNA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 15, p. 8419, 2022.

CHEN, Xian-Ming et al. A cellular micro-RNA, let-7i, regulates Toll-like receptor 4 expression and contributes to cholangiocyte immune responses against *Cryptosporidium parvum* infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 39, p. 28929-28938, 2007.

CIESIELSKA, Anna; MATYJEK, Marta; KWIATKOWSKA, Katarzyna. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and molecular life sciences**, v. 78, p. 1233-1261, 2021.

CORREIA DE SOUSA, Marta et al. Deciphering miRNAs' action through miRNA editing. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 24, p. 6249, 2019.

DAS, Madhusmita et al. Molecular epidemiology and transmission dynamics of leprosy among multicase families and case-contact pairs. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 96, p. 172-179, 2020.

DE FILIPPO, Katia et al. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 121, n. 24, p. 4930-4937, 2013.

DE FILIPPO, Katia et al. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 6, p. 4308-4315, 2008.

DE OCA, Ernesto Prado-Montes et al. SNP 668C (– 44) alters a NF- κ B1 putative binding site in non-coding strand of human β -defensin 1 (DEFB1) and is associated with lepromatous leprosy. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 617-625, 2009.

DE SOUSA MACEDO, Gabriel et al. Manejo da hanseníase na atenção primária: diagnóstico e tratamento Leprosy management in primary care: diagnosis and treatment. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 4, p. 28088-28097, 2022.

DE SOUSA, Jorge Rodrigues et al. Immunohistochemical characterization of the M4 macrophage population in leprosy skin lesions. **BMC infectious diseases**, v. 18, p. 1-8, 2018.

DE SOUZA, Márcio Luís Moreira et al. Leprosy screening based on artificial intelligence: development of a cross-platform app. **JMIR mHealth and uHealth**, v. 9, n. 4, p. e23718, 2021.

FABIAN, Marc R.; SONENBERG, Nahum. The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. **Nature structural & molecular biology**, v. 19, n. 6, p. 586-593, 2012.

FISCHER, Marcellus. Leprosy—an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 15, n. 8, p. 801-827, 2017.

FROES JUNIOR, Luis Alberto Ribeiro; SOTTO, Mirian Nacagami; TRINDADE, Maria Angela Bianconcini. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, p. 338-347, 2022.

GENG, Lu et al. Zhilong Huoxue Tongyu Capsule attenuates hemorrhagic transformation through the let-7f/TLR4 signaling pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 312, p. 116521, 2023.

GOULART, Isabela Maria Bernardes; PENNA, Gerson Oliveira; CUNHA, Gabriel. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 363-375, 2002.

GUIJARRO-MUÑOZ, Irene et al. Lipopolysaccharide activates Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated NF- κ B signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 4, p. 2457-2468, 2014.

HASHFI, Annisa Fildza; WIJAYANTI, Winda; MULIANTO, Nurrachmat. Diagnosis and Treatment of Multibacillary Leprosy Borderline Lepromatous Type: A Case Report. *Bioscientia Medicina: Journal of Biomedicine and Translational Research*, v. 6, n. 13, p. 2559-2565, 2022.

HESS, Samuel; RAMBUKKANA, Anura. Cell biology of intracellular adaptation of *Mycobacterium leprae* in the peripheral nervous system. **Microbiology spectrum**, v. 7, n. 4, p. 7.4. 13, 2019.

IWAKAWA, Hiro-oki; TOMARI, Yukihide. Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. **Molecular cell**, v. 82, n. 1, p. 30-43, 2022.

JIANG, Kangfeng et al. Anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice. **Inflammation**, v. 41, p. 437-448, 2018.

KOWALSKA, Maria; KOWALIK, Artur. *Mycobacterium leprae*: pathogenic agent in leprosy. Discovery of new species *Mycobacterium lepromatosis*. Perspectives in research and diagnosis of leprosy. **International Maritime Health**, v. 63, n. 4, p. 213-218, 2012.

KUMAR, Manish et al. MicroRNA let-7 modulates the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection via control of A20, an inhibitor of the NF- κ B pathway. **Cell host & microbe**, v. 17, n. 3, p. 345-356, 2015.

LAVANIA, Mallika et al. Molecular detection of multidrug-resistant *Mycobacterium leprae* from Indian leprosy patients. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 12, p. 214-219, 2018.

LEVY, Louis; BAOHONG, J. I. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. **Leprosy review**, v. 77, n. 1, p. 5-24, 2006.

LI, Wenyan et al. MicroRNA-451 relieves inflammation in cerebral ischemia-reperfusion via the Toll-like receptor 4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 4, p. 3043-3054, 2019.

LI, Wuquan et al. Down-regulation of miR-let-7e attenuates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting pulmonary inflammation by targeting SCOS1/NF- κ B pathway. **Bioscience reports**, v. 41, n. 1, 2021.

LIU, Huifeng; JIANG, Bing. Let-7a-5p represses proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting Smad2 in TGF- β 2-induced human lens epithelial cells. **Journal of biosciences**, v. 45, p. 1-10, 2020.

LU, Thomas X.; ROTHENBERG, Marc E. MicroRNA. **Journal of allergy and clinical immunology**, v. 141, n. 4, p. 1202-1207, 2018.

LU, Yong-Chen; YEH, Wen-Chen; OHASHI, Pamela S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v. 42, n. 2, p. 145-151, 2008.

LUO, Qimei et al. Long noncoding RNA MEG3-205/Let-7a/MyD88 axis promotes renal inflammation and fibrosis in diabetic nephropathy. **Kidney Diseases**, v. 8, n. 3, p. 231-245, 2022.

MAYMONE, Mayra BC et al. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 83, n. 1, p. 1-14, 2020.

MUNGROO, Mohammad Ridwane; KHAN, Naveed Ahmed; SIDDIQUI, Ruqaiyyah. *Mycobacterium leprae*: Pathogenesis, diagnosis, and treatment options. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104475, 2020.

PALIT, Aparna; KAR, Hemanta Kumar. Prevention of transmission of leprosy: The current scenario. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 86, p. 115, 2020.

PARKASH, Om. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: an analysis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-5, 2009.

PENG, Yong; CROCE, Carlo M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2016.

PEREIRA, Tiago Campos et al. Mecanismos de ação de microRNAs. **Introdução ao mundo dos microRNAs**, 2015.

PLÓCIENNIKOWSKA, Agnieszka et al. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and molecular life sciences**, v. 72, p. 557-581, 2015.

PLOEMACHER, Thomas et al. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 4, p. e0008276, 2020.

PREVEDELLO, Flávia Costa; MIRA, Marcelo Távora. Hanseníase: uma doença genética?. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, p. 451-459, 2007.

RAO, P. Narasimha. Global leprosy strategy 2016–2020: Issues and concerns. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 83, p. 4, 2017.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties**, v. 20, n. 1, p. 21-54, 2001.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, Alexandra. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 45, n. 9, p. 383-393, 2015.

ROUSH, Sarah; SLACK, Frank J. The let-7 family of microRNAs. **Trends in cell biology**, v. 18, n. 10, p. 505-516, 2008.

SALGADO, Claudio Guedes et al. miRNome expression analysis reveals new players on leprosy immune physiopathology. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 463, 2018.

SANDOVAL, Flávio Trevisan Barbosa. **Análise da expressão de microRNAs e alvos candidatos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SANTANA, Karina TOS et al. Characterization of microRNA expression profiles and identification of potential biomarkers in leprosy. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 5, p. 1516-1525, 2017.

SANTANA, Karina TOS” Explorando as relações patógeno-hospedeiro na hanseníase: avaliação do papel de miRNAs no controle da resposta imune e análise de polimorfismos em neutrofinas potencialmente envolvidas no dano neural”. 2018. **Tese (doutorado em genética) – Universidade federal de Minas Gerais.**

SATOH, Mamoru et al. Expression of let-7i is associated with Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of statins on let-7i and Toll-like receptor 4 signal. **Immunobiology**, v. 217, n. 5, p. 533-539, 2012.

SOARES, Cleverton T. et al. Differential expression of microRNAs in leprosy skin lesions. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 1035, 2017.

SUN, Liqun et al. Let-7d-5p suprime a resposta inflamatória em ratos neonatos com enterocolite necrotizante via via de sinalização TLR4/NF- κ B mediada por LGALS3. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 319, n. 6, pág. C967-C979, 2020.

TIÓ-COMA, Maria et al. Blood RNA signature RISK4LEP predicts leprosy years before clinical onset. **EBioMedicine**, v. 68, p. 103379, 2021.

TREIBER, Thomas; TREIBER, Nora; MEISTER, Gunter. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. **Nature reviews molecular cell biology**, v. 20, n. 1, p. 5-20, 2019.

VISCA, Paolo et al. Nitric oxide and Mycobacterium leprae pathogenicity. **IUBMB life**, v. 54, n. 3, p. 95-99, 2002.

WEISS, David I. et al. Adaptive immune response in leprosy. **International Text Book of Leprosy**, 2016.

WHITE, Cassandra; FRANCO-PAREDES, Carlos. Leprosy in the 21st century. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 80-94, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Global leprosy strategy 2016–2020. **Accelerating towards a leprosy-free world New Delhi: WHO Library Cataloguing-in-Publication data**, 2016.

ZHANG, Jianwei; HAN, Lei; CHEN, Feng. Let-7a-5p regulates the inflammatory response in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. **Diagnostic Pathology**, v. 16, n. 1, p. 1-8, 2021.

ZHANG, Jianzhong et al. miR-let-7a suppresses α -Synuclein-induced microglia inflammation through targeting STAT3 in Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 519, n. 4, p. 740-746, 2019.

ZHAO, Chenyang et al. Cellular stress amplifies TLR3/4-induced CXCL1/2 gene transcription in mononuclear phagocytes via RIPK1. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 2, p. 879-888, 2014.

ZHAO, Yarong et al. FC-99 ameliorates sepsis-induced liver dysfunction by modulating monocyte/macrophage differentiation via Let-7a related monocytes apoptosis. **Oncotarget**, v. 9, n. 19, p. 14959, 2018.