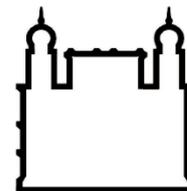




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs EXPRESSOS EM LESÕES
ATIVAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA
LOCALIZADA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESFECHO DA
DOENÇA**

SARA NUNES DE OLIVEIRA ARAUJO

Salvador-Bahia

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs EXPRESSOS EM LESÕES
ATIVAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA
LOCALIZADA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O DESFECHO DA
DOENÇA**

SARA NUNES DE OLIVEIRA ARAUJO

Orientadora: Dra. Natalia Machado Tavares
Co-Orientador: Dr. Pablo Rafael Silveira Oliveira

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
Humana para a obtenção do grau
de Mestre.

Salvador-Bahia

2017

**"IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS EXPRESSOS EM LESÕES ATIVAS DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA E SUA ASSOCIAÇÃO COM DESFECHO DA DOENÇA"**

SARA NUNES DE OLIVEIRA ARAÚJO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 04 de setembro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Bruno Solano de Freitas Souza
Pesquisador
IGM / Fiocruz



Dra. Dalila Luciola Zanette
Pesquisadora
IGM / Fiocruz



Dra. Natalia Machado Tavares
Pesquisadora
IGM / Fiocruz

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A662i Araujo, Sara Nunes de Oliveira.
Identificação de microRNAs expressos em lesões ativas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada e sua associação com o desfecho da doença. / Sara Nunes de Oliveira Araujo. - 2017.
76 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Natalia Machado Tavares, Laboratório Integrado de Microbiologia e Imunregulação.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2017.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Microrna. 3. Pele. 4. Transcriptomas. I. Título.

CDU 616.993.161

À Deus, pela vida, por me guiar e tornar tudo possível. “Tudo posso naquele que me fortalece”

Aos meus amados pais, Roque e Rosangela, pelo amor incondicional, encorajamento, suporte, paciência e companheirismo, sem eles nada disso teria sido possível.

À minha irmã, Simone, pelo incentivo, amor, carinho, compreensão e amizade.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio, pelas orações, pelo carinho e por estarem sempre ao meu lado.

Amo vocês!

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Natalia Tavares, a minha eterna gratidão. Um exemplo de liderança, dedicação, incentivo, profissionalismo, companheirismo e amor à ciência. É um privilégio trabalhar no Grupo NT. “Há pessoas que marcam a nossa vida, que despertam algo especial em nós, abrem os nossos olhos de modo irreversível e transformam a nossa maneira de ver o mundo. Você é uma dessas pessoas.”

Ao meu co-orientador, Dr. Pablo Rafael Oliveira, pelos ensinamentos, acessibilidade, paciência e incentivo.

Aos meus colegas do Grupo NT, Mariana, Icaro e Reinan, pelo companheirismo, apoio e sugestões. Obrigada pelo suporte nos experimentos e nas apresentações.

Ao grupo da Dra. Cláudia Brodskyn, pela agradável convivência e preciosas contribuições.

Ao grupo da Dr. Leonardo Faria, pelo apoio e pelas sugestões.

À Dr. Pablo Ivan Ramos, Dr. Bruno Bezerril, Dr. Arthur Queiroz e Dr. Adriano Alcântara por todo auxílio, discussão dos dados e valiosas sugestões.

Aos colegas do LIMI-LIP, pela convivência e sugestões.

À equipe da área endêmica, pela colaboração e contribuições.

À Andrezza Kariny e Juliana Oliveira, pelo apoio e suporte administrativo.

À plataforma tecnológica do IGM, pelo suporte. Em especial, as meninas da plataforma, Silvana, Liliane, Rafaela, Maíra e Zaira, pela amizade e apoio.

Aos colegas do PgPAT e PgBSMI, em especial, a Débora, Fernanda, Paula, Rosidete, Gabriel, Kércia, Rayra e Caroline, pela convivência e contribuições.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Patologia.

À biblioteca do IGM, pelas orientações na dissertação final.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização deste trabalho. Muito Obrigada!

ARAÚJO, Sara Nunes de Oliveira. Identificação de microRNAs expressos em lesões ativas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada e sua associação com o desfecho da doença. 76 f. il. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é uma doença crônica caracterizada por lesão (s) de pele ulcerada e inflamação descontrolada. Os mecanismos subjacentes à sua patogênese não são completamente compreendidos e pouco se sabe sobre a regulação pós-transcricional durante LCL. MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes, responsáveis por regular a expressão gênica, o que pode ser implicar na patogênese da LCL. **OBJETIVO:** O presente estudo teve como objetivo investigar o envolvimento de miRNAs e seus genes alvo na LCL humana utilizando conjuntos de dados de transcriptomas disponíveis publicamente, seguido de validação *ex vivo*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram analisados dados públicos de transcriptomas [códigos de acesso GEO do GSE55664 (plataforma Illumina) e GSE63931 (plataforma Agilent)], para análise de expressão de miRNAs na LCL. Após encontrar o perfil de miRNAs, eles foram validados em novas biópsias de lesões ativas de pacientes com LCL em comparação a amostras de pele saudável (controle). Dados clínicos dos pacientes do transcriptoma (GSE55664) foram utilizados para correlacionar com os achados de expressão de miRNAs e seus genes alvo. **RESULTADOS:** Foram avaliados o envolvimento de 792 sondas de miRNAs e seus alvos em biópsias de pele de pacientes com LCL em comparação a controles saudáveis, utilizando dados dos transcriptomas. Além disso, as sondas de miRNAs observadas na LCL foram analisadas em outras doenças inflamatórias de pele pela mesma plataforma (GSE55664), a fim avaliar a especificidade da expressão desses miRNAs para cada doença avaliada. A análise conjunta identificou 8 miRNAs *high confidence* alterados ($-1.5 <Fold\ Change> 1,5$ p-valor $<0,05$) entre lesões de LCL e controle. Esse estudo revela que a expressão de miR-193b, miR-671 e seus genes alvo estão associados ao tamanho da lesão, indicando um papel importante dessas moléculas na gravidade da doença. A análise de redes mostrou que, miR-193b, miR-671 e TREM1 apenas se correlacionam em pacientes que apresentam um tempo de cura de até 59 dias. **CONCLUSÃO:** Dado que esses miRNAs e seus genes alvo estão associados ao controle da inflamação e do tempo de cura, nossos achados revelam que podem influenciar a patogênese e o prognóstico da LCL.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, microRNA, Pele, Transcriptomas.

ARAÚJO, Sara Nunes de Oliveira. Identification of microRNAs expressed in active lesions of patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis and its association with disease outcome. 76 f. il. Dissertation (Master's degree). Federal University of Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL) is a chronic disease characterized by ulcerated skin lesion(s) and uncontrolled inflammation. The mechanisms underlying its pathogenesis are not completely understood and little is known about posttranscriptional regulation during LCL. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding small RNAs that regulates gene expression, which can be implicated in the pathogenesis of LCL. **AIM:** To investigate the involvement of miRNAs and their targets in human LCL using publicly available transcriptomes data, followed by *ex vivo* validation. **MATERIAL AND METHODS:** Public data from transcripts [GEO access codes GSE55664 (Illumina platform) and GSE63931 (Agilent platform)] were analyzed for expression of miRNAs in LCL. After finding the miRNAs profile, they were validated in new biopsies of active lesions from LCL patients compared to healthy skin control. Clinical data from transcriptome patients (GSE55664) were used to correlate with the expression findings of miRNAs and their target genes. **RESULTS:** Initial analysis highlighted that miRNAs expression is altered during LCL, clustering patients separately from controls. Moreover, we analyzed the miRNAs probes seen in LCL in others inflammatory skin disease from Illumina platform (GSE55664) in order to reinforce that specificity of microRNA expression for each condition or disease evaluated. Therefore, the expression profile of these miRNAs seems specific from LCL. Joint analysis identified 8 high confidence microRNAs altered ($-1.5 \leq \text{fold change} \leq 1.5$; $p < 0.05$) between cutaneous ulcers and uninfected skin. We found that the expression of miR-193b, miR-671 and their target genes greatly associates with lesion size, indicating an important role of these molecules in disease severity. Network analysis revealed that, miR-193b, miR-671 and *TREMI* correlate only in patients that shows faster wound healing (less than 59 days) than patients with longer time of cure (more than 60 days). **CONCLUSION:** Given that these miRNAs and target genes are associated with the control of inflammation and time of healing, our findings reveal that they might influence the pathogenesis and prognosis of LCL.

Keywords: *Leishmania braziliensis*, microRNA, Skin, Transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> - Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil – 2010 – Ministério da Saúde – Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – (Adaptado).....	19
Figura 2. O envolvimento de células inatas na amplificação da inflamação na Leishmaniose cutânea.	21
Figura 3. Biogênese dos microRNAs.	24
Figura 4. Papel dos microRNAs durante a diferenciação e maturação das células do sistema imune inato e adaptativo.....	25
Figura 5. Representação esquemática do estudo. Utilização de ferramentas genômicas para avaliação do perfil de expressão de microRNAs na LCL.	31
Figura 6. Análise transcriptômica de conjuntos de dados públicos de lesões cutâneas de pacientes infectados com <i>L. braziliensis</i>	33
Figura 7. microRNAs <i>high confidence</i> disponíveis no banco de dados miRBase 21 e nas plataformas GSE55664 e GSE63931.....	34
Figura 8. <i>Pipeline</i> para identificação de vias relacionadas à resposta imune na LCL.. ...	35
Figura 9. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de pele de leishmaniose e controle saudável com base nas expressões de microRNAs em GSE55664.....	39
Figura 10. O perfil de expressão de microRNAs alterados durante a leishmaniose cutânea causada por <i>L. braziliensis</i> no conjunto de dados da plataforma Illumina (GSE55664).....	40
Figura 11. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de pele de leishmaniose e controle saudável com base nas expressões de microRNAs em GSE63931.	42
Figura 12. O perfil de expressão de microRNAs alterados durante a leishmaniose cutânea causada por <i>L. braziliensis</i> no conjunto de dados da plataforma Agilent (GSE63931)..	43
Figura 13. Expressão de microRNAs <i>high confidence</i> é modulada em lesões cutâneas causadas por <i>L. braziliensis</i>	44
Figura 14. Validação dos microRNAs <i>high confidence</i> em nova coorte.	45
Figura 15. Vias canônicas associadas à resposta imune inata identificadas na LCL.	47

Figura 16. Identificação de microRNAs e seus alvos implicados na LCL.	48
Figura 17. microRNAs e seus genes alvos correlacionados com a gravidade da LCL. ...	49
Figura 18. miR-193b, miR-671 e TREM-1 no desfecho da LCL.....	50
Figura 19. Representação esquemática do estudo..	53
Figura 20. <i>Pipeline</i> da busca dos transcriptomas referente às doenças inflamatórias de pele na plataforma Illumina.	54
Figura 21. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de pele de Psoríase e controle saudável com base nas expressões de microRNAs em GSE53431.....	56
Figura 22. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de pele de Lúpus e controle saudável com base nas expressões de microRNAs em GSE72535.....	57
Figura 23. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de Esclerodermia e controle saudável com base em expressões de microRNAs em GSE58095.....	58
Figura 24. Expressão diferencial de microRNAs em doenças inflamatórias de pele.....	60
Figura 25. Diagrama de Venn para detectar microRNAs em comum nas doenças inflamatórias de pele.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela Suplementar 1. 33 sondas de microRNAs identificadas na plataforma Illumina HT 12 v4 (GSE55664).

Tabela Suplementar 2. 44 sondas de microRNAs identificadas na plataforma Agilent SurePrint GE Human G3v2 (GSE63931).

Tabela Suplementar 3. Identificação de microRNAs após o refinamento dos dados.

Tabela Suplementar 4. Conjuntos de dados brutos de vias canônicas relacionadas com LCL encontrados no *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA).

Tabela Suplementar 5. Identificação de vias canônicas significativamente moduladas relacionadas à resposta imune inata na LCL.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGO2	Argonauta 2;
CCR	Receptor de quimiocina;
CCL	Ligante de quimiocina;
CD	Agrupamento de Diferenciação, do inglês <i>Cluster of differentiation</i> ;
cDNA	DNA complementar;
CP1	Análise de Componente Principal 1;
CP2	Análise de Componente Principal 2;
CXCL	Ligante de quimiocina;
DAMPS	Padrões Moleculares Associados ao Dano Celular;
DTH	Testes Cutâneos de Hipersensibilidade Tardia;
FC	Diferença de expressão, do inglês <i>Fold Change</i> ;
FDR	Taxa global de resultados falso-positivos do inglês <i>False Discovery Rate</i> ;
GEO	Do inglês, <i>Gene Expression Omnibus</i> ;
GSE	Do inglês, <i>GEO serie</i> ;
hsa-mir	Nomenclatura para miRNAs, <i>Homo sapiens miRNA</i> ;
IFN	Interferon;
IL	Interleucina;
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i> ;
LC	Leishmaniose Cutânea;
LCD	Leishmaniose Cutânea Disseminada;

LD	Leishmaniose Cutânea Difusa;
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada;
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa;
LPS	Lipopolissacarídeo;
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana;
LV	Leishmaniose Visceral;
MeV	Do inglês, <i>Multi Experiment Viewer</i> ;
miR/miRNA	microRNA;
miRISC	Complexo de Silenciamento por microRNAs;
NO	Óxido Nítrico;
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos;
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase;
Pré-miRNA	miRNA precursor;
Pri- miRNA	miRNA primário;
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio;
RISC	Complexo de Silenciamento por RNAs, do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i> ;
RNA	Ácido Ribonucléico;
RNAm	RNA mensageiro;
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa, do inglês <i>Real Time Quantitative PCR</i> ;
SNORD	Pequeno RNA Nuclear;

SOCS	Supressor de Sinalização de Citocinas;
STAT	Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição;
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
TLR	Receptores do tipo Toll, do inglês <i>Toll-like Receptor</i> ;
TNF	Fator de Necrose Tumoral;
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral;
TREM	Do inglês, Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells;
WHO	Do inglês, <i>World Health Organization</i> ;
μL	Microlitro.

LISTA DE URLS

miRBase 21	http://www.mirbase.org/
GEO	http://ncbi.nlm.nih.gov/geo/
ENSEMBL	http://ensembl.org/
Ingenuity Pathways Analysis	http://ingenuity.com
TargetScan	http://www.targetscan.org/vert_71/

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	LEISHMANIOSES.....	18
1.2	IMUNOPATOGÊNESE DA LCL.....	20
1.3	microRNAs.....	22
1.3.1	A descoberta dos microRNAs	22
1.3.2	Biogênese dos microRNAs	22
1.4	REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR microRNAs.....	24
1.5	REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR microRNAs NA LEISHMANIOSE	26
	CAPÍTULO 1	29
2	JUSTIFICATIVA	29
3	HIPÓTESE	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL.....	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
5	DESENHO EXPERIMENTAL	31
6	MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	32
6.2	ANÁLISE DE DADOS EM REPOSITÓRIOS PÚBLICOS.....	32
6.3	IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs <i>HIGH CONFIDENCE</i>	33
6.4	PERFIL DE EXPRESSÃO DOS microRNAs.....	34
6.5	ANÁLISE DE VIAS CANÔNICAS.....	35
6.6	PACIENTES E AMOSTRAS.....	36
6.7	ISOLAMENTO DE microRNAs.....	36
6.8	ENSAIO DE VALIDAÇÃO POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR)	36
6.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
7	RESULTADOS	38
7.1	O PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs DISTINGUE A LESÃO DE LCL DA PELE NÃO INFECTADA.....	38

7.2	microRNAs <i>HIGH CONFIDENCE</i> DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LESÕES DE PACIENTES INFECTADOS COM <i>L. BRAZILIENSIS</i> EM DIFERENTES ÁREAS ENDÊMICAS.....	44
7.3	VALIDAÇÃO DOS microRNAs EM NOVAS AMOSTRAS.....	45
7.4	VIAS CANÔNICAS ASSOCIADAS À RESPOSTA IMUNE INATA DURANTE LCL.....	46
7.5	ALVOS DOS microRNAs IMPLICADOS NA LCL.....	48
7.6	microRNAs E SEUS GENES ALVO ESTÃO RELACIONADOS COM A GRAVIDADE DA LCL.	49
7.7	miR-193B, miR-671 E TREM-1 ESTÃO CORRELACIONADOS COM O DESFECHO DA LCL.	50
CAPÍTULO 2		51
8	JUSTIFICATIVA	51
9	HIPÓTESE	51
10	OBJETIVOS	52
10.1	OBJETIVO GERAL.....	52
10.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
11	DESENHO EXPERIMENTAL	53
12	MATERIAIS E MÉTODOS	54
12.1	ANÁLISE DE DADOS PÚBLICOS REFERENTE A DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE.....	54
13	RESULTADOS	55
13.1	COMPARAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs ENTRE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE.....	55
13.2	microRNAs MODULADOS EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE	59
13.3	APENAS UM microRNAs É COMUM A TODAS AS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE AVALIADAS.	61
14	DISCUSSÃO	62
15	PRINCIPAIS ACHADOS	68
16	CONCLUSÃO	69
17	PERSPECTIVAS	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXOS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um complexo de doenças crônicas negligenciadas causadas por parasitos intracelulares do gênero *Leishmania* através da picada de vetores flebotomíneos infectados (KAYE e SCOTT, 2011). A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública, endêmica em 98 países, nos quais 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco à infecção e cerca de 12 milhões estão infectadas. A cada ano, são registrados aproximadamente 2 milhões de novos casos, dos quais 500.000 são referentes à leishmaniose visceral (LV) e 1.5 milhão à leishmaniose cutânea (LC), com 50 mil mortes (DESJEUX et al., 2004; WHO, 2010; ALVAR et al., 2012).

A *Leishmania* é um parasito protozoário intracelular da família *Trypanosomatidae*, capaz de infectar humanos e outros mamíferos, levando a um espectro de doenças que variam desde lesões cutâneas até a forma visceral, que é fatal, se não tratada (VANNIER-SANTOS et al., 2002; DAWIT e SIMENEW, 2013). Esses parasitos são digenéticos, completando seu ciclo de forma alternada entre o hospedeiro vertebrado e o vetor hematófago (gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo) (AKHOUNDI et al., 2016; KAUFER et al., 2017). Na interação com o hospedeiro, a *Leishmania* é inoculada na derme do vertebrado na forma promastigota metacíclica, que é flagelada, livre e infectante (GRIMALDI et al., 1987).

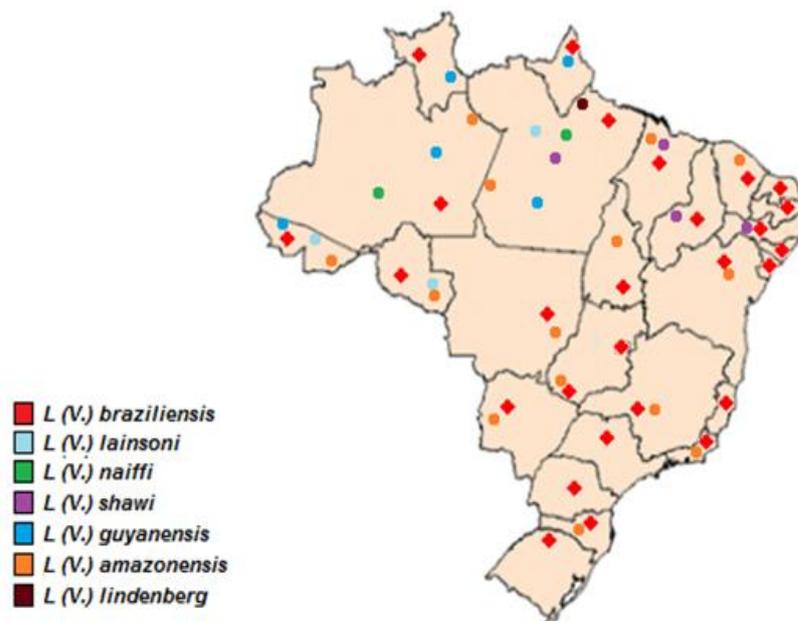
A interação entre *Leishmania* e receptores de superfície celulares como neutrófilos e macrófagos, ativam sua capacidade fagocítica, permitindo o acesso do parasito ao seu interior. No vacúolo parasitóforo, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, que é a forma intracelular obrigatória sem flagelo. As amastigotas multiplicam dentro de vacúolos celulares, principalmente em macrófagos, e posteriormente, rompem as células, infectando outras células (HERWALDT et al., 1999; CHAKRABORTY et al., 2001; KAYE e SCOTT, 2011).

Aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* já foram descritas (AKHOUNDI et al., 2016) e, destas, 20 espécies são patogênicas para os humanos (AKHOUNDI et al., 2016; KAUFER et al., 2017). Cada espécie está associada a diferentes formas clínicas e o perfil das doenças está associado à capacidade da resposta imune do hospedeiro (PEACOCK et al., 2007; AMATO et al., 2008; ALVES-FERREIRA et al., 2015). Algumas espécies de *Leishmania* causam lesões cutâneas crônicas que se restringem a sintomas na pele e mucosa.

Esse conjunto de desordens denomina-se leishmaniose cutânea, que é forma mais frequente da doença. Outras espécies podem ocasionar disseminação do parasito para órgãos internos, como fígado e baço, levando à leishmaniose visceral, forma mais grave da doença (KAYE e SCOTT, 2011).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), compreende as formas cutâneas da doença com potencial de evolução para as formas mucosa, disseminada e difusa (JONES et al., 1987). As lesões crônicas são capazes de promover deformidades de grandes proporções aos indivíduos infectados, levando a um impacto social e econômico importante, porque afasta o indivíduo acometido das suas atividades laborativas (COSTA et al., 2005; BRASIL, 2017). A LTA é considerada endêmica em diversas áreas da América latina (JONES et al., 1987), onde cerca de 12 espécies ocorrem nesse território, entre elas, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonenses* e *Leishmania (Leishmania) mexicana* (BRASIL, 2017).

No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição, com casos em todos os estados, onde a Bahia está entre os líderes juntamente com o Maranhão e o Ceará (BARRETTO et al., 1984; COSTA et al., 1998). Algumas espécies são responsáveis por esse quadro epidemiológico de leishmaniose cutânea no país, entre elas, *L. (V.) braziliensis*, principal espécie encontrada (Figura 1) (BRASIL, 2010).



Fonte: SVS/MS 2010 (adaptado)

Figura 1. Distribuição de espécies de *Leishmania* - Leishmaniose Tegumentar Americana, Brasil – 2010 – Ministério da Saúde – Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – (Adaptado).

Diferentes manifestações clínicas compreendem a LTA, entre elas, a forma cutânea localizada (LCL), caracterizada por lesões ulceradas únicas ou múltiplas (SCOTT & NOVAIS, 2016). Destes, cerca de 3% dos casos podem evoluir para lesões cutâneas na mucosa nasal e nasofaringe caracterizando a leishmaniose mucocutânea (LCM) (AMATO et al., 2008). Por fim, múltiplas lesões nodulares, de aparência acneiforme, ulceradas e quase sempre, com comprometimento da mucosa, caracterizam a leishmaniose cutânea disseminada (LCD) (SCHRANER et al., 2005). A presença de diversas lesões nodulares não ulceradas sobre toda pele caracterizam a forma cutânea difusa (LD) (FERNÁNDEZ-FIGUEROA et al., 2016).

1.2 IMUNOPATOGÊNESE DA LCL

As leishmanioses apresentam manifestações clínicas com perfis imunológicos diferentes. Essas variações podem ocorrer devido à patogenicidade de cada espécie de *Leishmania* e à resposta imune individual do paciente infectado (WHO, 2010). No hospedeiro vertebrado, o controle da infecção acontece por intermédio da resposta imune inata e adaptativa (BRASIL, 2017).

A LCL é a forma mais frequente das leishmanioses cutâneas. É caracterizada por lesões ulceradas na pele que podem apresentar um tempo de cura prolongado, semanas a meses (SCOTT e NOVAIS, 2016). A LCL humana causada por *L. braziliensis* está associada a uma inflamação crônica que é crítica para a sobrevivência do parasita, mas também para a lesão tecidual e a patogênese da doença.

A gravidade da LCL está mais associada a uma resposta inflamatória exacerbada do que uma consequência da alta carga parasitária, teoria sustentada por múltiplas linhas de evidência (KAYE e SCOTT, 2011; CARDOSO et al., 2015; HU et al., 2016; SCOTT e NOVAIS, 2016). A resolução da inflamação é um processo bem regulado e ativo que requer uma mudança na expressão gênica, levando a uma regulação negativa de mediadores inflamatórios (ALVES-FERREIRA et al., 2015; CARNEIRO et al., 2016).

No sítio de infecção, após a picada do flebótomo, os neutrófilos são as primeiras células a chegar (POMPEU et al., 1991). Os neutrófilos liberam quimiocinas, como exemplo, CXCL8, a fim de recrutar mais neutrófilos (CONCEIÇÃO et al., 2016). Em seguida, outras células do sistema imune inato, incluindo monócitos, células dendríticas e células *natural killer*, chegam ao local da infecção. Essas células demonstram exercer um papel importante

no curso da doença (WHO, 2010). Após a fagocitose da *leishmania* pelos neutrófilos, essas células entram em apoptose e sinalizam sua morte de forma silenciosa para que os macrófagos, principais células no cenário da leishmaniose (SCOTT e NOVAIS, 2016), reconheçam os corpos apoptóticos e os fagocitem (Figura 2). Nesse contexto, citocinas e quimiocinas implicadas na resposta inflamatória são liberadas, com subsequente indução da produção de mediadores inflamatórios (TEIXEIRA et al., 2006).

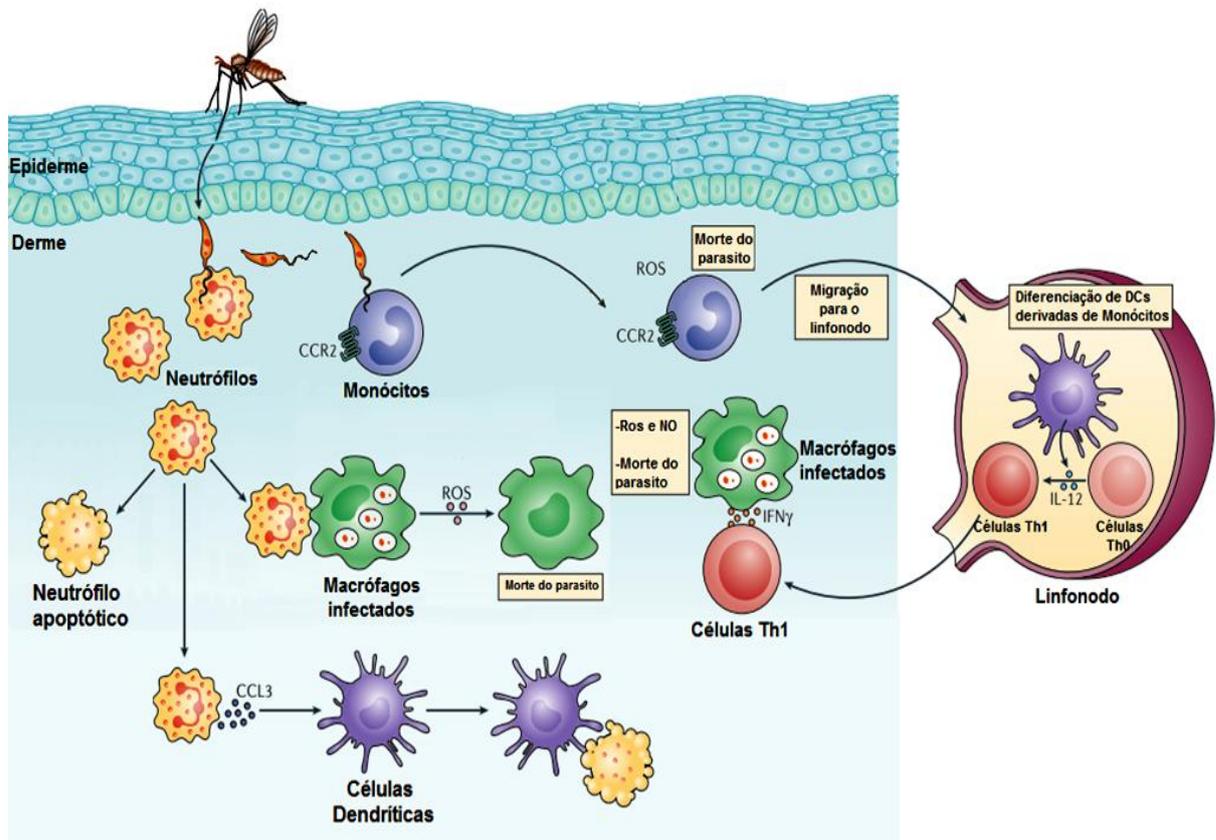


Figura 2. O envolvimento de células inatas na amplificação da inflamação na Leishmaniose cutânea. Na pele, após a entrada da *Leishmania*, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas ao sítio de infecção para fagocitar o parasito. Os neutrófilos vivos ou apoptóticos podem ativar macrófagos infectados e induzir o controle de parasitas em uma forma dependente de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os neutrófilos recrutam células dendríticas (DCs) para local da infecção através da produção de quimiocinas (CCL3). Os monócitos também são recrutados de forma dependente de quimiocinas (CCR2). Os monócitos também se diferenciam em DCs, migram para os gânglios linfáticos e promovem a diferenciação de TH1 células produzindo interleucina-12 (IL-12). As células T então migram para a pele e eliminam os parasitas induzindo a produção de óxido nítrico (NO) e ROS (Scott & Novais, 2016 – adaptado).

1.3 microRNAs

1.3.1 A descoberta dos microRNAs

Em 1993, Lee e colaboradores descobriram o primeiro miRNA, *lin-4*, descrito em experimentos que demonstravam a inibição da tradução protéica por este pequeno transcrito durante o desenvolvimento larval da *Caenorhabditis elegans* (LEE et al., 1993). Estudos anteriores mostravam que alguns genes heterocrônicos estavam relacionados com o ciclo da larva e que mutações nesses genes poderiam levar a um desenvolvimento precoce ou tardio (AMBROS e HORVITZ, 1984). Especificamente o gene *lin-4* já tinha sido descrito como um gene relacionado ao desenvolvimento da *C. elegans*. Em seguida, foi confirmando que esse gene não codificava proteína, mas dava origem a pequenos transcritos que inibiam a proteína LIN-14, levando ao desenvolvimento normal da *C. elegans*. O estudo observou também que não havia alteração nos níveis do RNAm da *lin-14*, sugerindo uma regulação pós-transcricional. Além disso, a deficiência deste pequeno transcrito compromete a formação da larva de *C. elegans*, levando à conclusão de que essa inibição era fundamental para o desenvolvimento do ciclo larval (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993; MOSS et al., 1997).

Em seguida, outros estudos levantaram a hipótese de que este fenômeno também poderia estar presente em genes altamente conservados entre diferentes espécies (REINHART et al., 2000), incluindo mamíferos. A partir desses achados, surge um novo campo de estudo para avaliar o papel desses pequenos RNAs considerados importantes reguladores pós-transcricionais.

1.3.2 Biogênese dos microRNAs

Os miRNAs são pequenos RNAs endógenos de fita simples, com cerca de 19-25 nucleotídeos, que modulam a expressão por meio da repressão da tradução ou degradação de RNAm alvo (BARTEL et al., 2004; HE et al., 2004; HÁ e KIM, 2014). Eles correspondem a aproximadamente 1-2% do genoma conhecido de eucariotos e são atualmente, considerados reguladores chave da expressão gênica e protéica de, pelo menos, 60% dos genes humanos (FRIEDMAN et al., 2009; MASOTTI et al., 2009; O'CONNELL et al., 2012).

A biogênese dos miRNAs é iniciada pela RNA polimerase II que, a partir de um gene, gera um transcrito de fita dupla com uma estrutura em *hairpin* denominada de miRNA

primário (pri-miRNA) (DU e ZAMORE, 2005). Este pri-miRNA possui caudas que são clivadas no núcleo pelo complexo da endonuclease DROSHA RNase III, levando a formação do miRNA precursor (pré-miRNA) (LEE et al., 2003; DENLI et al., 2004; GREGORY et al., 2004).

O miRNA precursor é, então, reconhecido pela Exportina-5, que transporta o pré-miRNA para o citoplasma (KIM et al., 2009). Em seguida, o pré-miRNA é clivado por uma segunda endonuclease RNase III, a DICER, formando um *duplex* de miRNA maduro (CHENDRIMADA et al., 2005; JIANG et al., 2006; YONG; DUTTA et al., 2007). Posteriormente, a fita dupla do miRNA maduro é separada. Este processo ainda é controverso na literatura, pois alguns autores sugerem a degradação de uma das fitas (DU e ZAMORE, 2005), mas o consenso é que uma fita simples compõe o miRNA maduro e exerce papel funcional inibidor (LEE et al., 2004; HÁ e KIM, 2014).

O miRNA maduro é incorporado ao RISC (miRISC), um complexo de silenciamento induzido por RNA que então direciona-o para o RNAm alvo por meio de interações por pareamento de bases (DU e ZAMORE, 2005). O miRNA se liga de forma específica na região não transcrita do RNAm alvo por uma região denominada *Seed Region* (entre os nucleotídeos 2 a 8 do miRNA), que é determinante para a especificidade da ligação do miRNA com seu RNAm alvo (FRIEDMAN et al., 2009). A eficiência desse pareamento determina a inibição do RNAm, quanto mais eficiente a complementariedade, maior inibição da tradução ou a degradação do RNAm (Figura 3) (HAKE et al., 2003; MARTINEZ; TUSCHL et al., 2004; BARTEL et al., 2009; HÁ e KIM, 2014).

A expressão alterada de miRNAs tem sido associada a muitas doenças humanas, especialmente o câncer. Já foi demonstrado que a indução de miRNAs específicos pode promover a tumorigênese em diferentes tipos de células e tecidos afetando o crescimento celular, migração e invasão (MENG et al., 2007; ASANGANI et al., 2008; GABRIELY et al., 2008). Em relação às doenças inflamatórias da pele, o perfil de expressão de miRNAs parece ser específico para cada doença (SONKOLY et al., 2007; ZIBERT et al., 2010).

Dessa forma, a avaliação dos perfis de expressão dos miRNAs nos seres humanos, quando implicados em um contexto de doenças transmitidas por patógenos, podem gerar novas estratégias de diagnóstico e tratamento. Assim, os miRNAs tornam-se candidatos promissores como biomarcadores e alvos terapêuticos (WANG et al., 2012; BENZ et al., 2016).

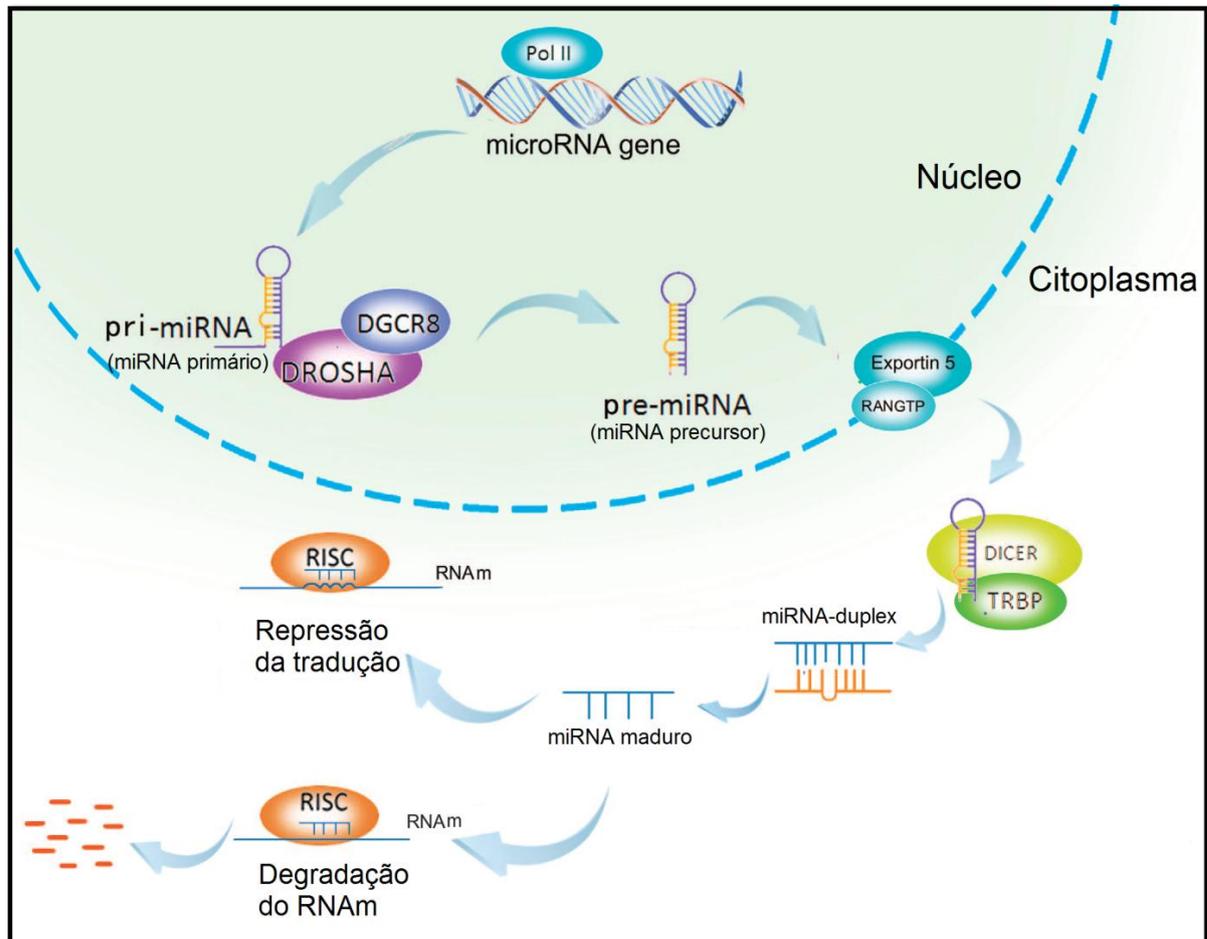


Figura 3. Biogênese dos microRNAs. Etapas no processo de biogênese dos miRNAs. Transcrição do miRNA primário (pri-miRNA) pela RNA Polimerase II, seguido de clivagem do transcrito pela endonuclease DROSHA em um miRNA precursor (pré-miRNA). O pré-miRNA é transportado para o citoplasma pela exportina 5. No citoplasma o pré-miRNA é clivado por outra endonuclease, a DICER em um miRNA *duplex*. As fitas são separadas e a fita simples é considerada o miRNA maduro, que junto com o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), se liga ao RNAm alvo levando a repressão da tradução ou degradação do RNAm (Adaptado de Peng, 2016).

1.4 REGULÇÃO DA RESPOSTA IMUNE POR microRNAs

Nos últimos anos, diversos estudos tem avaliado a ação dos miRNAs no intuito de esclarecer seu envolvimento nos principais processos celulares. Esses pequenos RNAs são considerados moléculas chave na regulação da resposta imune e exercem um papel crucial no controle de processos biológicos importantes, como a hematopoese, o controle de migração, a proliferação celular, a reprogramação celular, as vias de sinalização, a homeostase e morte celular (BALTIMORE et al., 2008; XIAO e RAJEWSKY, 2008; RAISCH et al., 2013; LI et al., 2017). Além disso, a desregulação na expressão dos miRNAs pode levar a consequências

patológicas importantes (MEHTA e BALTIMORE, 2016), como por exemplo, o desenvolvimento de doenças autoimunes (DENG et al., 2015) e câncer (HATA e LIEBERMAN, 2015). A figura 4 exemplifica a participação dos miRNAs no desenvolvimento e atuação dos componentes das respostas imunes inatas e adaptativas.

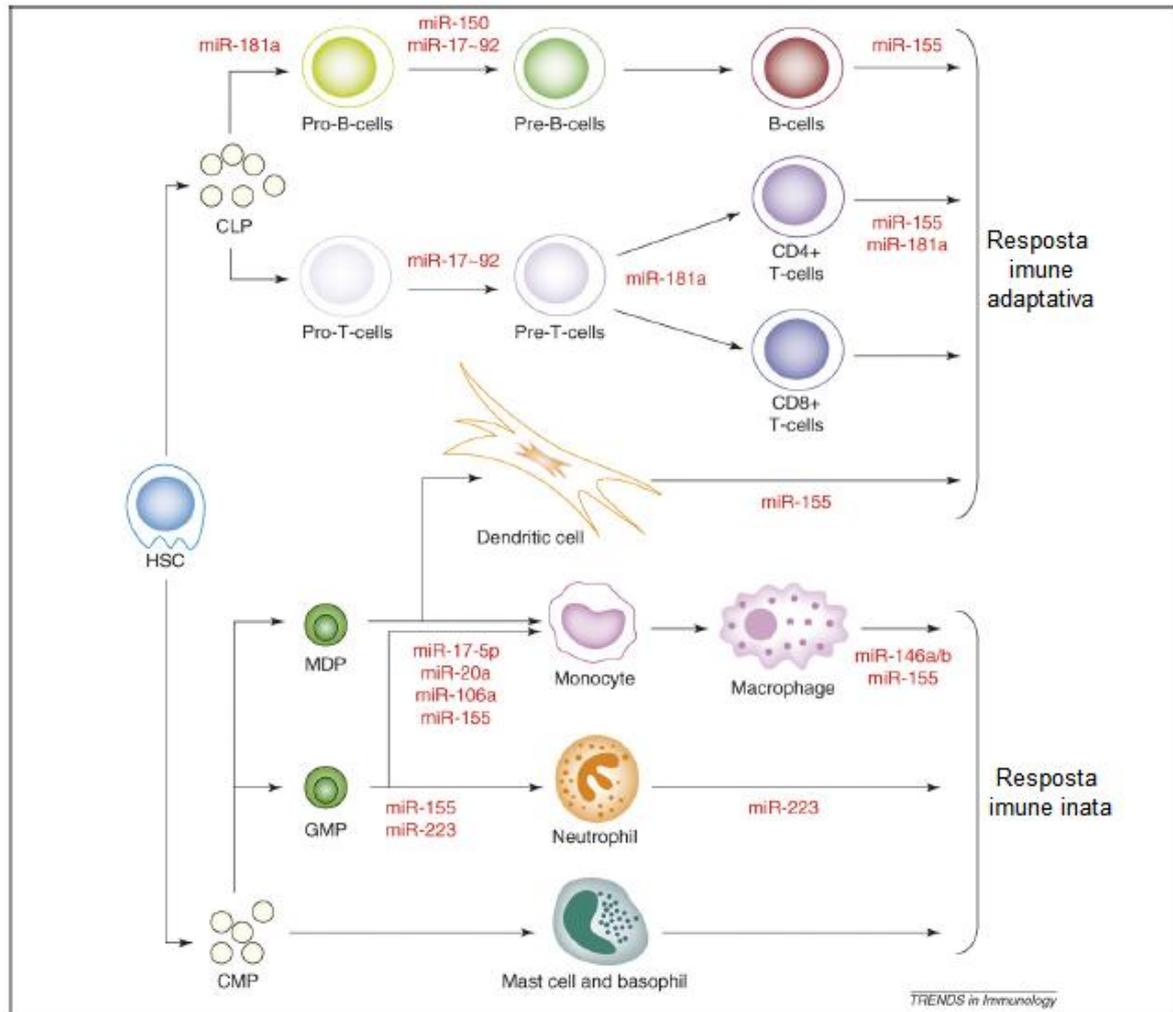


Figura 4. Papel dos microRNAs durante a diferenciação e maturação das células do sistema imune inato e adaptativo. Os miRNAs regulam várias etapas no desenvolvimento de células do sistema imune, incluindo linfócitos (células B e T) e células mielóides (monócitos e neutrófilos). CLP, progenitor linfocitário comum; CMP, progenitor mielóide comum; GMP, progenitor monocítico de granulócitos, HSC, células estaminais hematopoiéticas; MDP, progenitor dendrítico mielóide (Lindsay, 2008 adaptado).

Dentre os miRNAs caracterizados na resposta imune, o miR-155 é o mais estudado (CONNELL et al., 2007; BALTIMORE et al., 2008; LINDSAY, 2009; SONKOLY; PIVARCSI, 2009; O'CONNELL et al., 2010). Esse miRNA está implicado na diferenciação e ativação de células no sistema imune inato e adaptativo (Figura 4) (LINDSAY et al., 2009; MASHIMA et al., 2015); está relacionado com processos inflamatórios, tais como a regulação

positiva de citocinas inflamatórias (O'CONNELL et al., 2012; RAISCH et al., 2013) e tem sua expressão aumentada quando a cascata de sinalização do TLR4 é ativada (O'NEILL et al., 2011). Além disso, é considerado um regulador da maturação e ativação de células T e B (GRACIAS et al., 2013; HU et al., 2014; MASHIMA, 2015; SONG e LEE, 2015); além de indicar prognósticos distintos em diferentes tipos de câncer (NI et al., 2014; FANG et al., 2016).

Além de controlar o desenvolvimento, a maturação e as funções das células do sistema imune (XIAO e RAJEWSKY, 2008), diversos estudos mostram a participação dos miRNAs na regulação da resposta imune a diferentes tipos de microrganismos patogênicos, como vírus (SKALSKY e CULLEN, 2010; TAMBYAH et al., 2013), bactérias (EULALIO et al., 2012) fungos (KATIYAR-AGARWAL; JIN, 2010) e parasitas (ZEINER et al., 2010; CAI et al., 2014). Além disso, a alteração de miRNAs também tem sido associada a estímulos por citocinas pró-inflamatórias e influências dos receptores *Toll like* (TAGANOV et al., 2006; PENG e CROCE, 2016).

1.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR microRNAs NA LEISHMANIOSE

A interação entre *Leishmania* e células imunes do hospedeiro desencadeia alterações complexas na expressão gênica (GREGORY et al., 2008; MARETTI-MIRA et al., 2012; NOVAIS et al., 2015), envolvendo estratégias do parasito para evadir-se dos mecanismos leishmanicidas da resposta imune. Neste sentido, já foram demonstradas alterações na capacidade de apresentação antigênica (REINER et al., 1987) e no padrão de expressão de moléculas co-estimulatórias por células infectadas (KAYE e SCOTT, 2011). A ativação de vias de sinalização intracelular e de fatores de transcrição também são alvos dos mecanismos de escape da *Leishmania* (OLIVIER et al., 2005; SHIO et al., 2012). Esta reprogramação dos transcritos celular do hospedeiro permite a expressão de genes relacionados à resposta imune e sua modulação por microorganismos. Neste processo, os miRNAs têm um papel fundamental.

Durante processos infecciosos, alterações no perfil de expressão dos miRNAs do hospedeiro podem indicar tanto a indução de mecanismos de defesa quanto uma estratégia de subversão da resposta imune desenvolvida pelo patógeno. Diferentes classes de patógenos, dentre eles vírus (SCARIA et al., 2006; SKALSKY e CULLEN, 2010), bactérias

(KATIYAR-AGARWAL e JIN, 2010; EULALIO et al., 2012) e parasitas da família Apicomplexo (a qual pertence à *Leishmania*) (ZEINER et al., 2010; HAKIMI e CANNELLA, 2011), podem manipular a rede de miRNAs em células infectadas do hospedeiro (MAUDET et al., 2014).

Dessa forma, já foi demonstrado que *L. donovani*, agente etiológico da LV, reduz a expressão do miR-122 no fígado de animais infectados (GHOSH et al., 2007). Este miRNA modula uma grande variedade de funções hepáticas, como metabolismo lipídico (GIRARD et al., 2008; CHANG et al., 2014). O mecanismo pelo qual a *L. donovani* reduz miR-122 é mediado pela metaloprotease de *Leishmania*, a gp63, que degrada a endonuclease Dicer, limitando o processamento desse miRNA e aumentando a sobrevivência do parasito (GHOSH et al., 2007). Isso favorece a infecção porque reduz os níveis de colesterol nas membranas celulares, aumentando a fluidez da membrana, o que compromete a capacidade de apresentação antigênica das células infectadas (CHAKRABORTY et al., 2001). Por outro lado, a infecção experimental por *L. major* reduz a expressão do miR-10a. Esse miRNA, tem como alvo o fator de transcrição regulado por IFN- γ , o CREB. Neste contexto, o miR10a foi identificado como regulador-chave da indução de células T reguladoras em um ambiente inflamatório com predomínio de citocinas do perfil Th1 (a exemplo de IFN- γ e IL-12), como observado na infecção experimental por *L. major* (KELADA et al., 2013).

É importante ressaltar a grande lacuna que existe no conhecimento sobre o papel dos miRNAs no contexto das leishmanioses. Os estudos já publicados para identificar alterações na expressão de miRNAs após a infecção por *Leishmania* são poucos e abordam infecções experimentais, que podem não refletir o que realmente acontece nos pacientes acometidos por esta enfermidade. Neste sentido, são poucos os estudos que abordam as alterações no perfil de expressão de miRNAs em células fagocíticas humanas após infecção *in vitro* por *L. major* (LEMAIRE et al., 2013; GERACI et al., 2015) ou *L. donovani* (GERACI et al., 2015). Os achados indicam que a infecção de macrófagos humanos por *L. major* altera a expressão de miRNAs que regulam quimiocinas, inibindo a resposta inflamatória, favorecendo o estabelecimento do parasito. Por outro lado, a infecção *in vitro* de células dendríticas humanas por *L. major* induz uma redução global nos níveis de expressão de miRNAs, enquanto *L. donovani* aumenta a expressão de miRNAs nestas células (GERACI et al., 2015). Destacam-se os miRNAs da família LET-7, que tem como alvos transcritos que participam na indução da inflamação (STAEDEL e DARFEUILLE, 2013).

Este é o primeiro estudo dedicado a avaliar o perfil de expressão de miRNAs em biópsias de lesões de pacientes infectados com *L. braziliensis*, bem como sua influência para

o desfecho desta doença. Uma abordagem integrativa foi aplicada em duas fases a partir de dados públicos. No primeiro momento, foram identificados os miRNAs e seus genes alvo, cujos níveis de expressão estavam modulados na LCL humana, além da validação *ex vivo* destes achados e correlacionar os achados com a clínica desses pacientes. Na segunda fase, foram analisados conjuntos de transcriptomas de outras doenças de pele também com caráter inflamatório. O perfil de expressão dos miRNAs também foi definido para as diferentes doenças, bem como seus potenciais alvos, no intuito de avaliar a especificidade deste padrão de alteração em condições inflamatórias.

CAPÍTULO 1

2 JUSTIFICATIVA

O desfecho das doenças causadas por *Leishmania* é definido pela influência de fatores parasitários e imunológicos/ genéticos do hospedeiro . Muitos estudos em humanos e em modelos experimentais mostram o envolvimento da imunidade inata na resposta protetora contra a infecção por *Leishmania*. O parasito, portanto, possui estratégias para subverter/evadir a resposta imune, favorecendo o estabelecimento da infecção. Neste contexto, mecanismos reguladores da resposta imune têm papel fundamental para manutenção do equilíbrio entre controle do parasito e dano tecidual. Recentemente, os microRNAs foram descritos como reguladores da expressão gênica de pelo menos 60% dos genes humanos, incluindo muitos genes da resposta imune inata (FRIEDMAN et al., 2009). De fato, alguns estudos apontam alterações no perfil de expressão dos microRNAs em muitas doenças infecciosas. Porém, pouco se conhece sobre o padrão de expressão de microRNAs na Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania braziliensis* em humanos. Dessa forma, o presente estudo pretende definir o padrão de expressão de microRNAs em biópsias de lesão ativa obtidas de pacientes infectados por *L. braziliensis*, além de associar estes achados com o desfecho da doença.

3 HIPÓTESE

O perfil de expressão de microRNAs encontra-se alterado na lesão cutânea causada por *Leishmania braziliensis* tem influência sobre o desfecho clínico da Leishmaniose Cutânea Localizada.

4 OBJETIVOS

4.4 OBJETIVO GERAL

Estudar o perfil e o papel de microRNAs expressos durante a infecção por *Leishmania braziliensis* em humanos.

4.5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil de expressão de microRNAs em conjuntos de dados públicos de biópsias de lesões de pacientes infectados por *L. braziliensis*;
- Validar os achados em biópsias frescas (*ex vivo*);
- Identificar genes-alvos de microRNAs implicados em vias relevantes para imunidade contra *L. braziliensis*;
- Correlacionar os microRNAs e seus alvos com a gravidade e o desfecho clínico da doença.

5 DESENHO EXPERIMENTAL

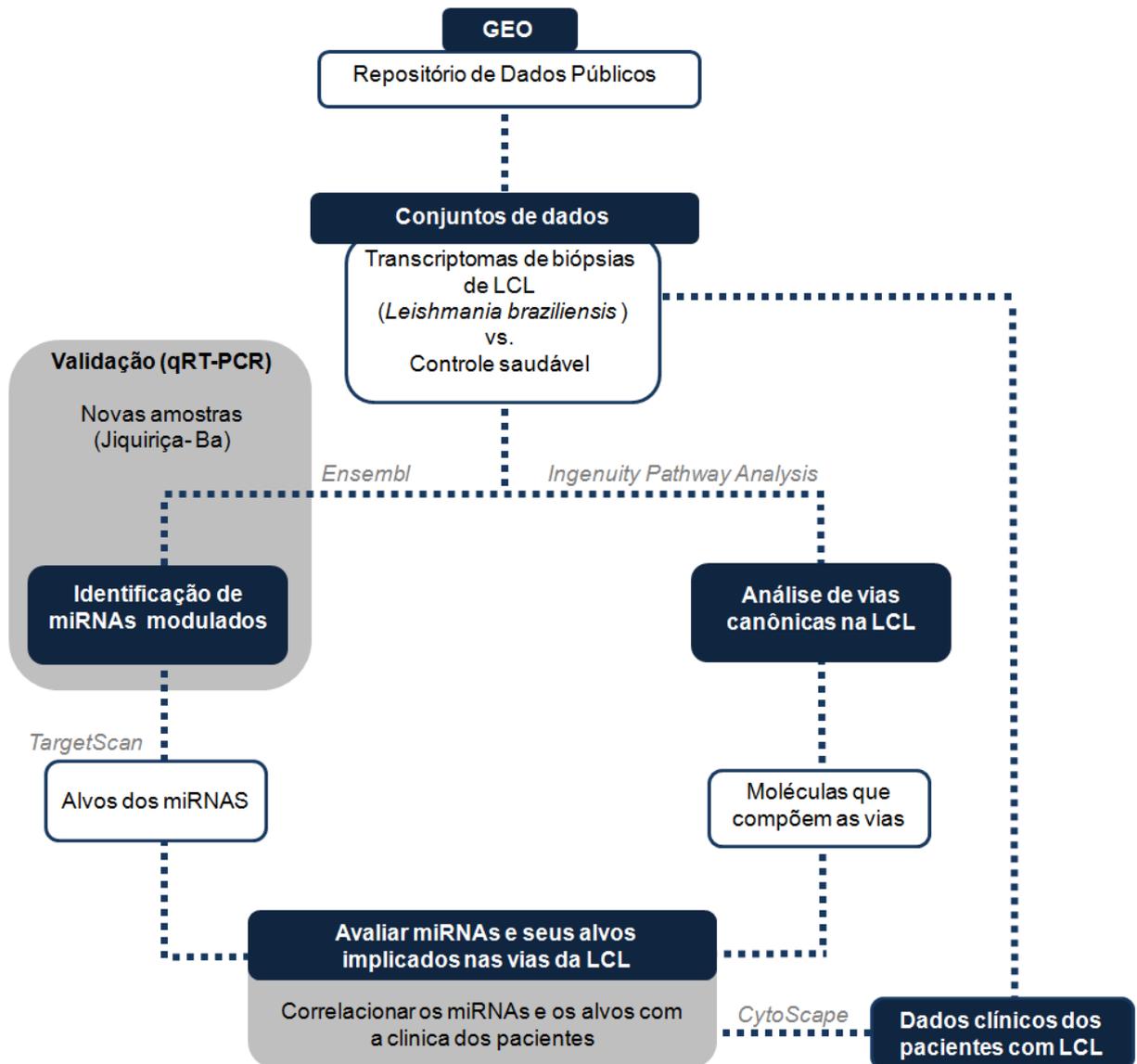


Figura 5. Representação esquemática do estudo. Utilização de ferramentas genômicas para avaliação do perfil de expressão de microRNAs na LCL.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios da Declaração de Helsínquia e nas diretrizes éticas locais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Gonçalo Moniz (Salvador, Bahia, Brasil - CAAE: 47120215.8.0000.0040). Todos os pacientes que participaram da pesquisa forneceram consentimento por escrito para a coleta de amostras (TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e posterior análise.

6.2 ANÁLISE DE DADOS EM REPOSITÓRIOS PÚBLICOS

Análises de microarranjos foram obtidas do repositório público do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), *Gene Expression Omnibus* (GEO), onde os termos de inclusão do estudo foram "humanos", "biópsias", "pele" e "*Leishmania braziliensis*". Foram selecionados dois conjuntos de dados de microarranjos dentro desses critérios. O primeiro conjunto de dados (GSE55664), publicado por Novais et al. (NOVAIS et al., 2015), aplicou a plataforma Illumina HT12 v4 (GPL10558) para analisar 10 amostras controle de pele saudável e 25 biópsias de lesões de pele de pacientes com LCL (8 amostras de lesões iniciais e 17 amostras de lesões tardias). O segundo conjunto de dados (GSE63931), publicado por Oliveira et al. (OLIVEIRA et al., 2015), aplicou a plataforma Agilent Sure Print GE Human G3v2 (GPL17077) comparando 8 amostras controle de pele saudável e 8 biópsias de pele de pacientes com LCL. Aproximadamente 50.000 sondas foram analisadas em cada conjunto de dados. Inicialmente, foram encontrados 576 sondas de miRNAs no primeiro conjunto de dados e apenas 13 sondas de miRNAs no segundo. Considerando que alguns transcritos apresentavam suas descrições vazias, todo o dado (GSE55664 e GSE63931) foi reanalisado pela ferramenta genômica Ensembl/BioMart (www.ensembl.org/biomart/) a fim de encontrar miRNAs. Após essa análise, foram encontradas 792 e 141 sondas de miRNAs em GSE55664 e GSE63931, respectivamente. Além disso, os miRNAs foram classificados usando miRBase 21 (Figura 6). Dados clínicos referentes às amostras de Illumina (GSE55664) foram utilizados para correlacionar os achados das análises de expressão com a gravidade da doença. As amostras foram separadas em grupos considerando o tamanho da lesão ou o tempo de cura dos pacientes correlacionados aos miRNAs e seus alvos. O tempo de cura dos pacientes foi determinado considerando a coleta das amostras no tempo zero e o resultado baseado no

acompanhamento desses pacientes. Esses grupos foram classificados como tempo de cura entre 0-59 dias, 60-89 dias, ou > 90 dias.

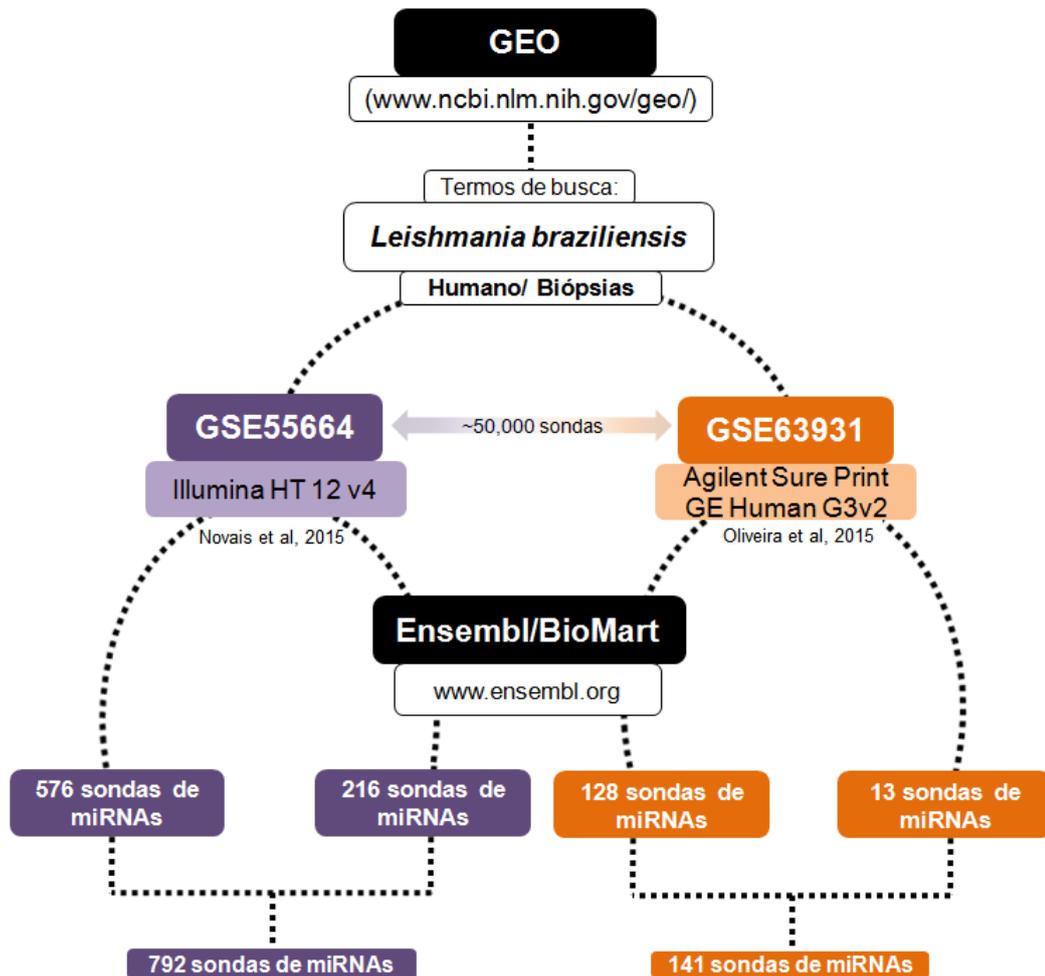


Figura 6. Análise transcriptômica de conjuntos de dados públicos de lesões cutâneas de pacientes infectados com *L. braziliensis*. O conjunto de dados de microarranjo realizados em biópsias de pele humana de LCL causadas por *Leishmania braziliensis* em comparação a controles saudáveis foram identificados no banco de dados GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/). Foram encontrados dois conjuntos de dados [GSE55664 (Illumina HT 12 v4) e GSE63931 (Agilent Sure Print GE Human G3v2)]. A ferramenta Ensembl/ BioMart foi aplicada à mineração de dados e o número de sondas que codificam miRNAs encontrados foram 792 e 141 para GSE55664 e GSE63931, respectivamente.

6.3 IDENTIFICAÇÃO DE microRNAs *HIGH CONFIDENCE*

A versão 21 do miRBase foi utilizada a fim de classificar os miRNAs. Na ferramenta estão catalogados 1881 miRNAs precursores e 2588 miRNAs maduros presentes no genoma humano. No miRBase 21, esses miRNAs são classificados como anotações de alta ou baixa confiança (*high confidence* e *low confidence*) com base no mapeamento das *reads* e dados de sequenciamento (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2011, 2014; KOLBERT et al., 2013).

O total de precursores de miRNAs humanos considerados *high confidence* é de 296, enquanto que 1.585 são classificados como miRNAs *low confidence*. Portanto, baseado nessa classificação e considerando sondas não-miRBase (sondas de miRNAs que não estão presentes na versão do miRBase 21), os dados GSE55664 e GSE63931 foram categorizados (Figura 7).

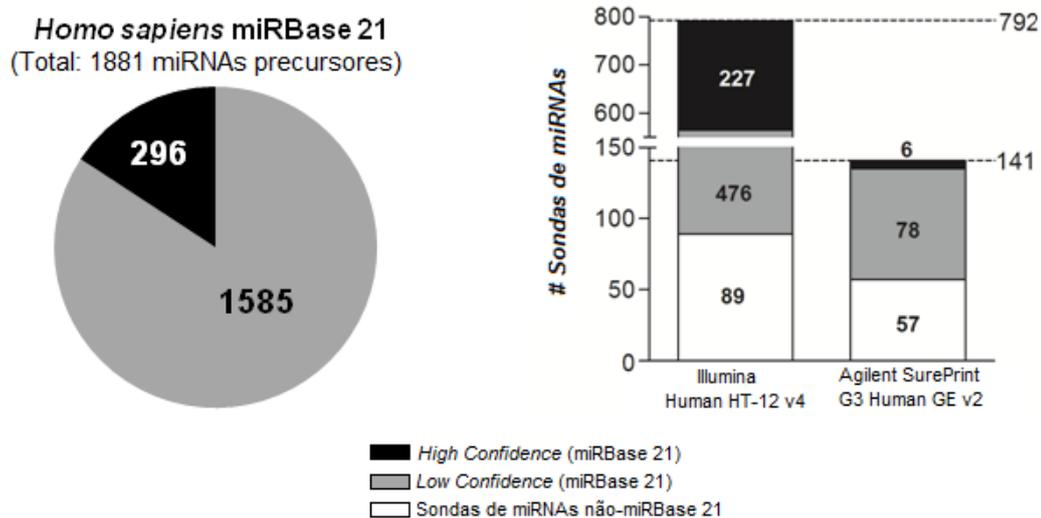


Figura 7. microRNAs *high confidence* disponíveis no banco de dados miRBase 21 e nas plataformas GSE55664 e GSE63931. Número total de precursores de miRNAs para humanos considerados *high* ou *low confidence* no miRBase 21 (www.mirbase.org/). Número absoluto (#) de sondas de miRNAs *high confidence* (barras pretas) ou *low confidence* (barras cinzas). Algumas sondas eram referentes à miRNAs preditos não depositados na miRBase 21 (barras brancas).

6.4 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS microRNAs

Os dados de expressão foram analisados utilizando *Multi Experiment Viewer* (MeV) (www.tm4.org/mev.html), ferramenta de análise de dados de microarranjos. A significância de expressão de miRNAs foi determinada com base na variância entre os dois grupos (valores em log de base 2), além disso, para análise de agrupamento hierárquico, a distância entre as amostras foi determinada pela distância euclidiana e pela ligação média (*average-linkage*). Os *heatmaps* foram utilizados para representar a expressão das sondas dos miRNAs através da intensidade do sinal. A análise de componentes principais (CP) permitiu o agrupamento de amostras com base na expressão de miRNAs, onde CP1 e CP2 correspondem a mais de 50% da variabilidade dos dados. A diferença de expressão dos transcritos nas amostras de LCL em comparação as amostras controle foi $\geq 1,5$ (*Fold Change*), com valor corrigido de $p < 0,05$ como critério para identificar miRNAs diferencialmente expressos.

6.5 ANÁLISE DE VIAS CANÔNICAS

Os dados normalizados foram analisados pelo *Ingenuity Pathway Analysis* (www.ingenuity.com) a fim de identificar vias canônicas na leishmaniose. A opção denominada "*Core analysis*" foi realizada considerando os filtros "pele, derme, epiderme, células da resposta imune e resposta imune inata". Os mesmos filtros foram aplicados nos dois conjuntos de dados da leishmaniose (GSE55664 e GSE63931). As moléculas que compõem as vias foram separadas e, concomitantemente, os alvos dos miRNAs (miRNAs implicados na LCL) foram obtidos no TargetScan (www.targetscan.org/vert_71/). Dentre essas moléculas das vias, as que eram alvos dos miRNAs foram separadas, e posteriormente aplicamos o critério de pareamento de expressão, ou seja, considerar apenas as moléculas alvos que tivessem a expressão oposta ao miRNA (Figura 8).

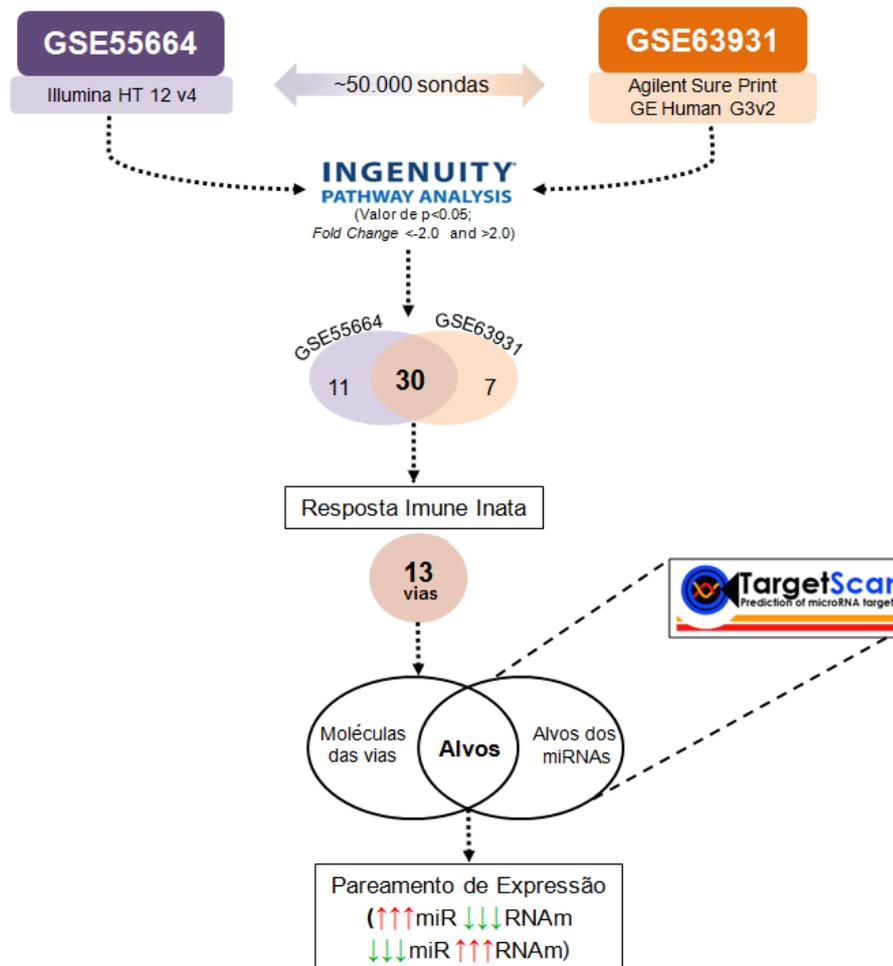


Figura 8. Pipeline para identificação de vias relacionadas à resposta imune na LCL. Os conjuntos de dados da LCL, GSE55664 e GSE63931, foram analisados pelo *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) para identificar as vias canônicas relacionadas à resposta imune inata durante a LCL. Moléculas que compõem estas vias com expressão diferencial (p -valor $< 0,05$ e $-2 < FC < 2$) e foram selecionadas. Com a ferramenta TargetScan, essas moléculas foram classificadas, ou não, como alvos dos miRNAs encontrados em LCL.

6.6 PACIENTES E AMOSTRAS

As amostras de biópsias de pele foram obtidas a partir de lesões ativas de pacientes com LCL. Os pacientes são provenientes do posto de saúde na cidade de Jiquiriçá (estado da Bahia, Brasil), uma área considerada endêmica à transmissão de *L. braziliensis*. Os critérios de diagnóstico foram: sintomas clínicos típicos de LCL, características histológicas e resposta positiva nos testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (DTH) ou sorologia para *Leishmania*. Antes da terapia, as biópsias foram coletadas da borda da lesão com *punch* de 4mm mediante anestesia. Foram coletadas biópsias de pele de 12 pacientes com LCL e amostras controle de pele saudável de cirurgia plástica de 7 doadores de área não-endêmica sem histórico de LCL. Esses fragmentos foram imediatamente reservados em RNA *later* para realização do PCR.

6.7 ISOLAMENTO DE microRNAs

As biópsias em RNA *later* foram maceradas e colocadas em 700µl do reagente TRIzol (Invitrogen). O RNA total foi extraído utilizando *miRNeasy Mini kit* (Qiagen), esse *kit* permite o isolamento de RNA total, preservando os miRNAs, que frequentemente são perdidos em outros métodos de extração. A extração foi realizada seguindo as instruções do fabricante. As concentrações de RNA foram medidas com o Espectrofotômetro UV-Vis NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A síntese de cDNA foi realizada utilizando *miScript II RT kit* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

6.8 ENSAIO DE VALIDAÇÃO POR PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

A expressão relativa de miRNAs foi obtida por qRT-PCR. Os ensaios foram realizados em duplicata no equipamento de PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems) seguindo as instruções do fabricante. As reações foram conduzidas com 10 ng de RNA e 250 nM de primer, utilizando sonda *SYBR Green Real-Time PCR Master Mixes* (Applied Biosystems), com um volume final de 20µl. A expressão referente a hsa-miR-155, hsa-miR-503, hsa-miR-193b, hsa-miR-99a e hsa-miR-221 foi normalizada com SNORD8, SNORA70 e SNORD46, pequenos RNAs constitutivos, utilizados como controles endógenos. Todos os *primers* foram sintetizados comercialmente por *Integrated DNA Technologies* (IDT).

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5 (San Diego, USA). Para as correlações com variáveis de distribuição não-paramétrica foi utilizado o teste de Spearman, onde o $r \geq 0,6$ foi considerado. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

7 RESULTADOS

7.1 O PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs DISTINGUE A LESÃO DE LCL DA PELE NÃO INFECTADA.

Foram analisados dois conjuntos de dados transcriptômicos publicamente disponíveis de lesões de LCL humanas causadas por *L. braziliensis* (Figura 7). O primeiro (GSE55664), comparou os padrões globais da expressão gênica entre 25 amostras de biópsias cutâneas de pacientes com LCL e 10 amostras de controles de pele saudável (NOVAIS et al., 2015). Após a identificação desses transcritos, 792 sondas (de um total de 47.305) correspondem a regiões que abrigam miRNAs. O perfil de expressão dos miRNAs agrupa as amostras de lesões cutâneas das amostras controle de pele saudável (Figura 9).

Considerando os transcritos que abrigam miRNAs significativamente moduladas (p-valor $<0,05$; diferença de expressão $\geq 1,5$ para mais ou para menos) neste mesmo data set (GSE55664), foram encontradas 33 sondas de miRNAs (Figura 10A). Os seus padrões de expressão mantêm a separação das amostras de LCL em grupos distintos das amostras de pele saudável. A análise de componentes principais confirma este resultado (Figura 10B). Das 33 sondas de miRNAs moduladas (Tabela S1), 17 estão induzidas (vermelho) e 16 inibidas (verde) na LCL em relação às amostras controle (Figura 10C).

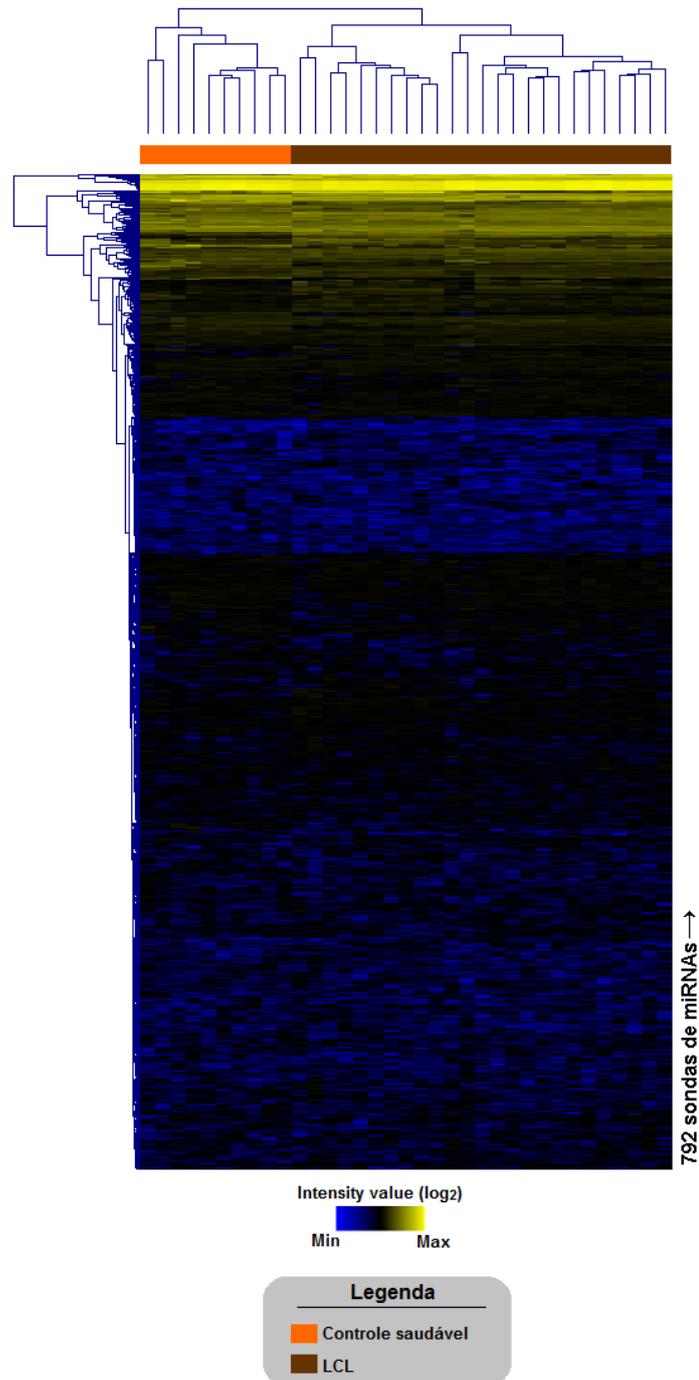


Figura 9. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de pele de leishmaniose e controle saudável com base nas expressões de microRNAs em GSE55664. O *heat map* mostra o perfil de expressão de 792 sondas de miRNAs na plataforma GSE55664 (plataforma Illumina HT12 v4) em 10 amostras controle e 25 de LCL. O eixo Y representa as sondas de miRNAs e o eixo X representa as amostras. A barra de escala simboliza a intensidade de expressão para cada sonda de miRNA (Log₂).

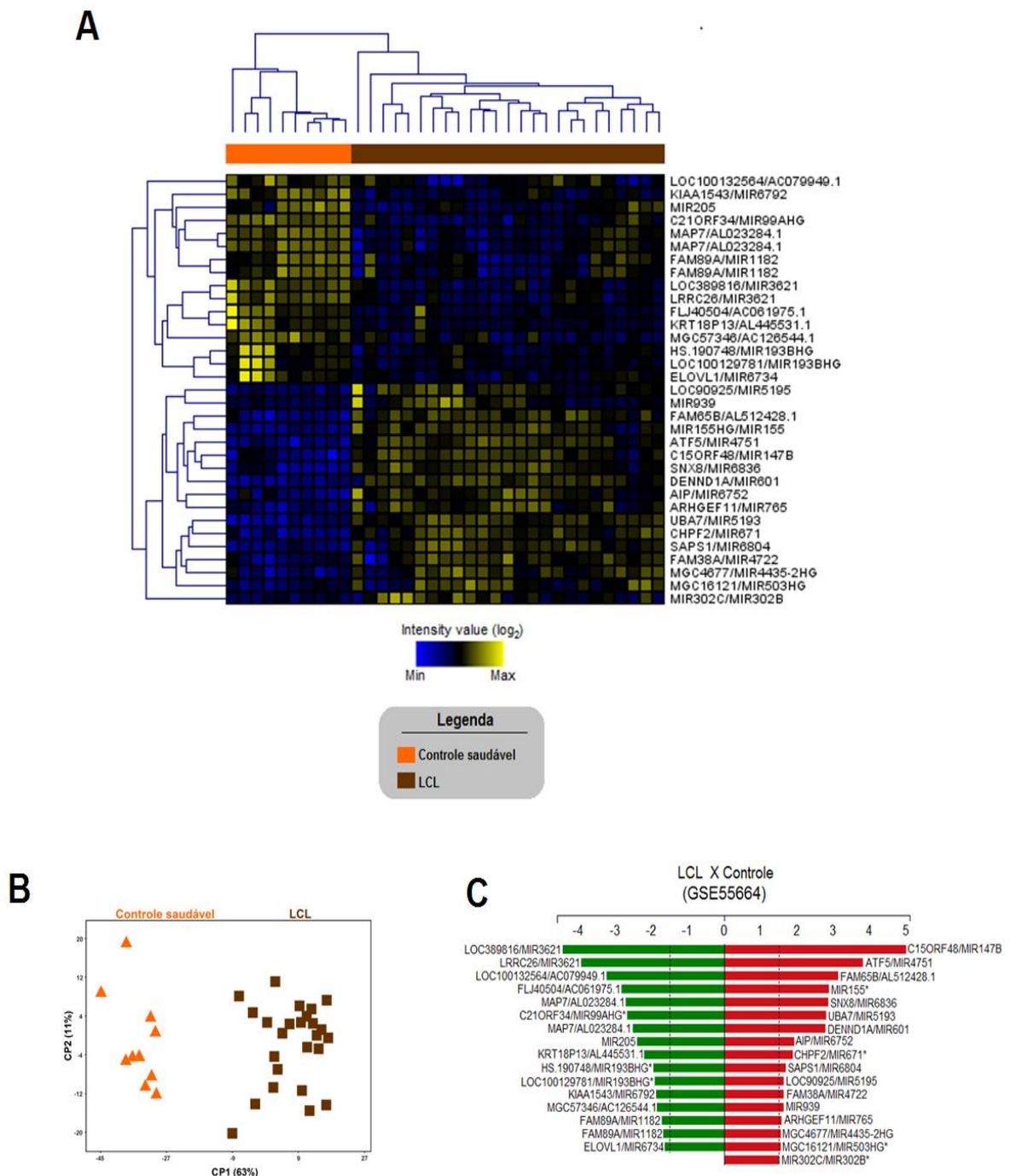


Figura 10. O perfil de expressão de microRNAs alterados durante a leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* no conjunto de dados da plataforma Illumina (GSE55664). Foram incluídos nesta análise apenas miRNAs diferencialmente expressos (p -valor $< 0,05$; $-1,5 < \text{diferença de expressão} > 1,5$) em amostras de biópsias de LCL (barra marrom) comparadas a controles saudáveis (barra laranja). (A) O *heat map* mostra o perfil de expressão de 33 sondas de miRNAs do conjunto de dados (10 amostras controle e 25 LCL), onde o eixo X representa as amostras, enquanto que o eixo Y representa o perfil de expressão dos miRNAs. A barra de escala simboliza a intensidade de expressão para cada sonda de miRNA (\log_2). (B) A Análise de Componentes Principais (CP) utilizando sondas de miRNAs diferencialmente expressas entre as amostras de LCL e controle foram realizadas. Cada símbolo representa uma amostra. (C) Os valores da diferença de expressão (FC) das sondas de miRNAs moduladas em LCL em relação às amostras controles foram ilustrados no gráfico, onde as linhas pontilhadas representam o corte presumido para a expressão diferencial ($-1,5 < \text{diferença de expressão} > 1,5$).

Resultados semelhantes foram obtidos com o segundo conjunto de dados, GSE63931, obtidos com a plataforma Agilent Sure Print GE Human G3v2. A análise comparou 8 biópsias de lesões de pacientes com LCL e 8 amostras controle de pele saudável (OLIVEIRA et al., 2015). O conjunto de dados compreende 50.737 sondas e, dentre elas, apenas 141 abrangem regiões de miRNAs. Apesar do pequeno número de sondas abrangendo miRNAs, a análise de agrupamento foi capaz de distinguir as amostras de lesões das amostras de pele saudável (Figura 11).

Este padrão de agrupamento foi mantido mesmo após restringir a análise às sondas significativamente moduladas (valor de $p < 0,05$; diferença de expressão $\geq 1,5$ para mais ou para menos). Foram encontradas 44 sondas de miRNA diferencialmente expressas entre amostras de lesões e controles (Figura 12A). Este padrão também foi confirmado pelo CP (Figura 12B). A partir destas 44 sondas de miRNAs (Tabela S2), 24 estavam induzidas (vermelho) e 20 estavam inibidas (verde) em lesões de pacientes com LCL em comparação com os controles de pele saudável (Figura 12C). Esses dados apontam que o perfil de expressão de miRNAs é amplamente modulado em lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis*.

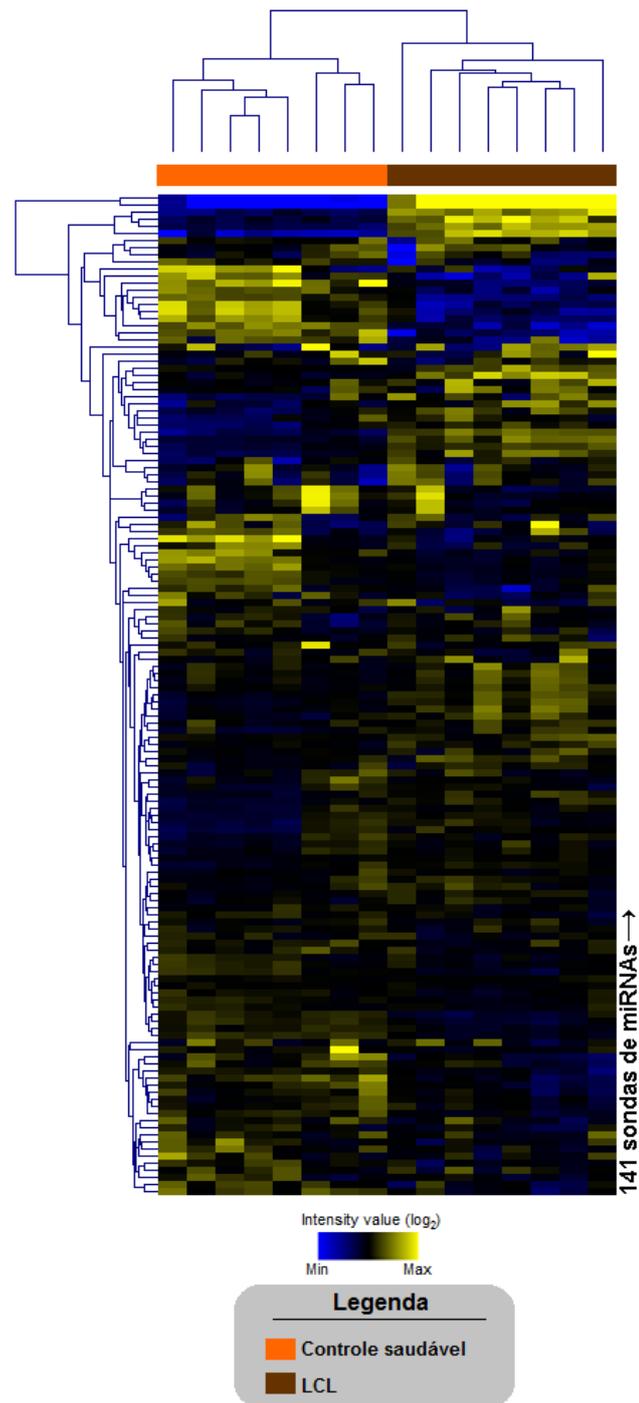


Figura 11. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de pele de leishmaniose e controle saudável com base nas expressões de microRNAs em GSE63931. O *heat map* mostra o perfil de expressão de 141 sondas de miRNAs na plataforma GSE63931 (plataforma AgilentSure Print GE Human G3v2) em 8 amostras controle e 8 de LCL. O eixo Y representa as sondas de miRNAs e o eixo X representa as amostras. A barra de escala simboliza a intensidade de expressão para cada sonda de miRNA (Log_2).

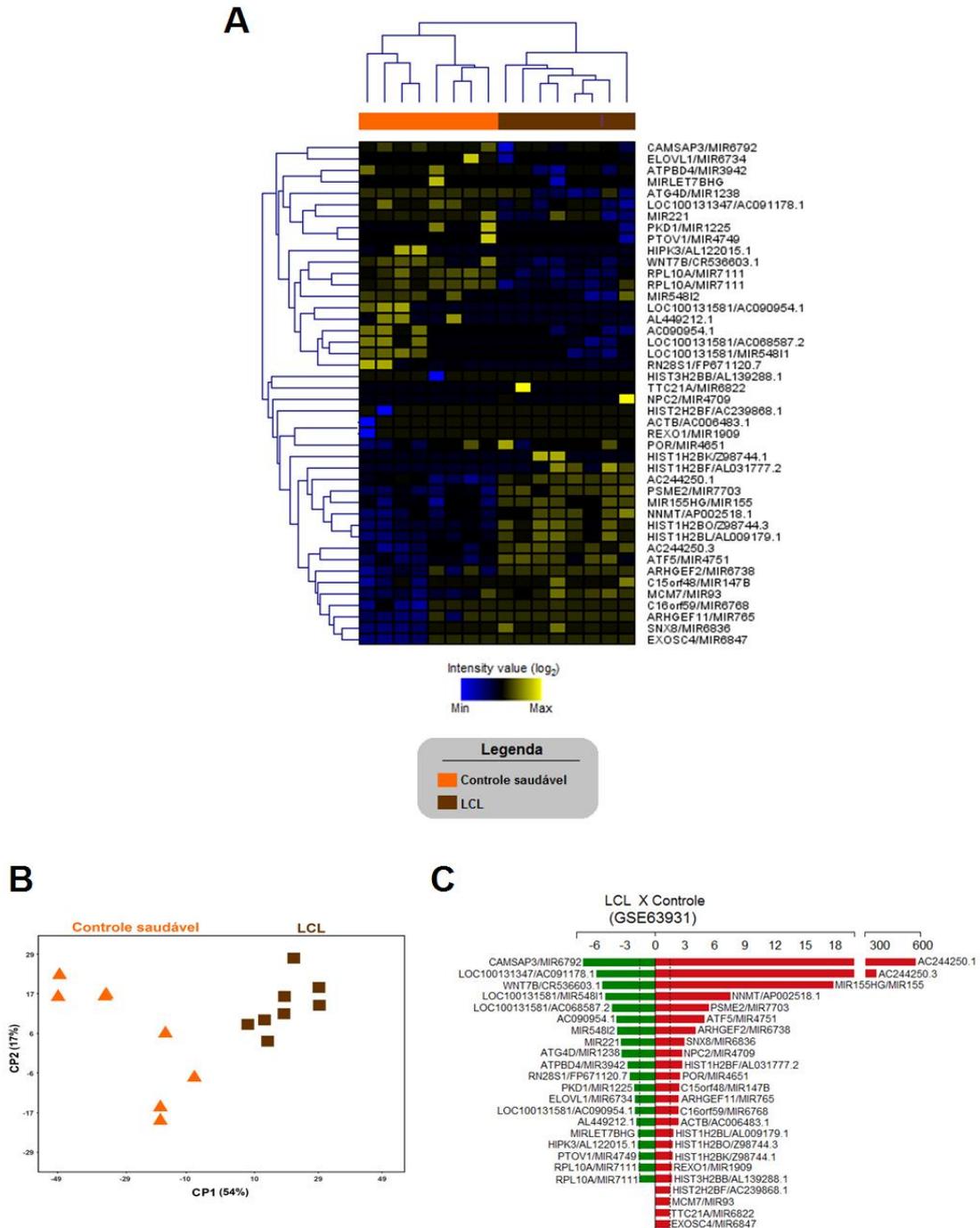


Figura 12. O perfil de expressão de microRNAs alterados durante a leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* no conjunto de dados da plataforma Agilent (GSE63931). Apenas foram incluídos nesta análise miRNAs diferencialmente expressas ($p < 0,05$ e $-1,5 < \text{diferença de expressão} > 1,5$) em amostras de biópsias de LCL (barra marrom) comparadas a controles saudáveis (barra laranja). (A) O *heat map* mostra o perfil de expressão de 44 sondas de miRNAs do conjunto de dados (8 amostras controle e 8 de LCL), onde o eixo X representa as amostras, enquanto que o eixo Y representa o perfil de expressão dos miRNAs. A barra de escala simboliza a intensidade de expressão para cada sonda de miRNA (\log_2). (B) A Análise de Componentes Principais (CP) usando sondas de miRNAs diferencialmente expressas entre as amostras de LCL e controle foram realizadas. Cada símbolo representa uma amostra. (C) Os valores da diferença de expressão (FC) das sondas de miRNAs moduladas em LCL em relação às amostras controles foram ilustrados no gráfico, onde as linhas pontilhadas representam o corte presumido para a expressão diferencial ($-1,5 < \text{diferença de expressão} > 1,5$).

7.2 microRNAs *HIGH CONFIDENCE* DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM LESÕES DE PACIENTES INFECTADOS COM *L. BRAZILIENSIS* EM DIFERENTES ÁREAS ENDÊMICAS.

A identificação de miRNAs *high confidence* foi realizada com base nos critérios de confiança estabelecidos pelo banco de dados miRBase 21 (AMBROS et al., 2003; GRIFFITHS-JONES et al., 2008; GRIFFITHS-JONES et al., 2010; KOZOMARA & GRIFFITHS-JONES, 2014). Considerando os dois conjuntos de dados avaliados, foram identificados 77 sondas de miRNAs (abrangendo 49 miRNAs) cuja expressão é modulada em lesões LCL causadas por *L. braziliensis* (Tabela S3). Destes, 23 miRNAs estão na plataforma GSE55664 e 26 na plataforma GSE63931, mas deste total, apenas 8 são considerados miRNAs *high confidence* e, entre eles, apenas o miR-155 é comum a ambos conjuntos de dados.

Na plataforma GSE55664, dos 6 miRNAs encontrados, 4 tiveram a expressão induzida, enquanto 2 tiveram a expressão inibida. Na plataforma GSE6393, dos 3 miRNAs identificados, 2 estavam com a expressão induzida e 1 com a expressão inibida (Figura 13).

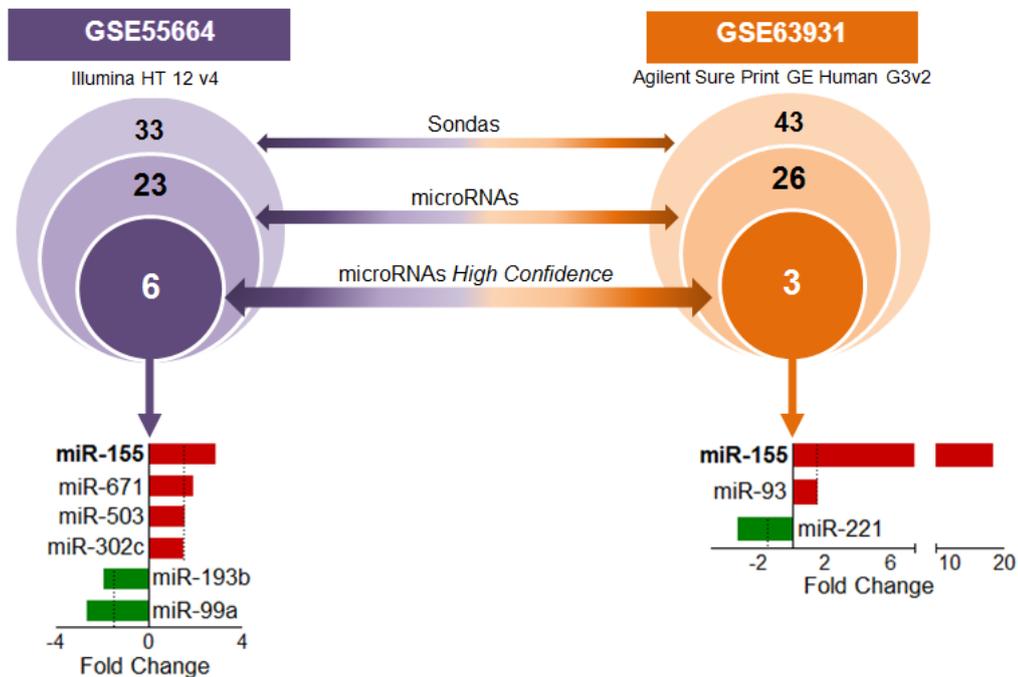


Figura 13. Expressão de microRNAs *high confidence* é modulada em lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis*. O número total de sondas, sequências ou miRNAs *high confidence* para cada conjunto de dados, GSE55664 (roxo) e GSE63931 (laranja), dos círculos externos aos internos, respectivamente (p-valor <0,05). Os gráficos de barras mostram a diferença de expressão dos miRNAs *high confidence* diferencialmente expressos de ambos os conjuntos de dados. As barras vermelhas representam os miRNAs induzidos e as barras verdes representam os miRNAs inibidos.

7.3 VALIDAÇÃO DOS microRNAs EM NOVAS AMOSTRAS.

Para validar tecnicamente esses achados e confirmar a expressão dos miRNAs, foram realizados ensaios de qRT-PCR com *primers* comercialmente validados (disponíveis para: hsa-miR-155, hsa-miR-503, hsa-miR-193b, hsa-miR-99a e hsa-miR-221) (Figura 14A) utilizando novas biópsias de lesões cutâneas de pacientes que residem em outra área endêmica para *L. braziliensis* na Bahia. Não foi possível validar o miR-671, miR-302c e miR-93 (Figura 14B).

Comparando os valores da mudança da expressão (*Fold change*) entre os dados dos microarranjos e os resultados do qRT-PCR, existe uma correlação positiva ($r = 0,7$) entre essas plataformas para todos os miRNAs testados, reforçando que os achados obtidos com diferentes plataformas convergem para o mesmo padrão. Esse resultado valida a expressão alterada dos miRNAs em três diferentes coortes de pacientes com LCL.

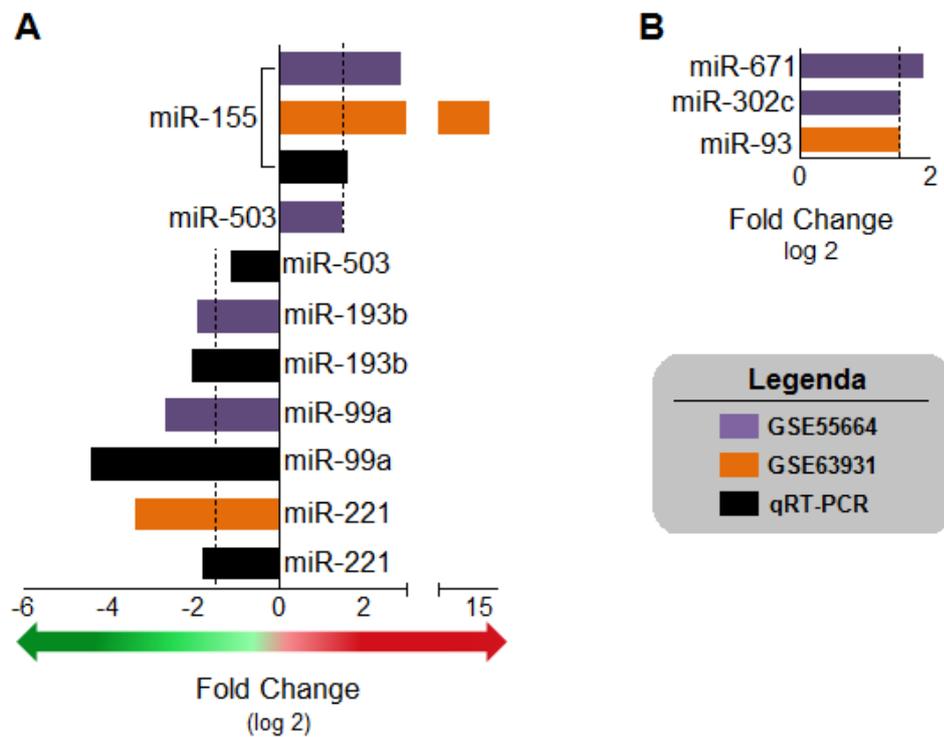


Figura 14. Validação dos microRNAs *high confidence* em nova coorte. (A) A expressão relativa dos miRNAs *high confidence* foi validada por qRT-PCR em novas amostras de biópsias de pele de pacientes com LCL em comparação com o controle. Os níveis de expressão foram normalizados utilizando os endógenos SNORD46, SNORD8 e SNORA70. O perfil de expressão de cada miRNA *high confidence*, estão representados em barras roxas (GSE55664) e barras laranjas (GSE63931). As barras pretas representam o perfil de expressão dos miRNAs na validação por qRT-PCR. As setas indicam a expressão induzida (vermelho) ou inibida (verde) (> -1.5 diferença de expressão > 1.5) (B) O miR-671, miR-302c e miR-93, não foram validados.

7.4 VIAS CANÔNICAS ASSOCIADAS À RESPOSTA IMUNE INATA DURANTE LCL.

A resposta imune inata é crucial para a defesa do hospedeiro contra *Leishmania* que possui mecanismos de evasão para estabelecer a infecção (GEIGER et al., 2016). Portanto, a modulação da resposta imune inata através de miRNAs poderia representar um aspecto importante na imunopatogenia da LCL. Para identificar potenciais genes cujos RNAm podem ser inibidos pelos miRNAs modulados durante a LCL, foi realizada uma análise de vias canônicas associadas à doença para ambos conjuntos de dados utilizando o software IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) (Tabela S4), com foco em vias associadas à resposta imune inata. Foram encontradas 13 vias inflamatórias (Tabela S5) com valor de p significativo ($p < 0,05$) e comuns aos dois conjuntos de dados (Figura 15A). Após a correção de Bonferroni, 6 vias permaneceram significativamente associadas à LCL (*Cut-off* = 0,00192308). As 6 vias mais significantes no conjunto de dados GSE55664 (Figura 15B) são as mesmas no GSE63931 (Figura 15C), reforçando o envolvimento dessas vias na patogênese da LCL.

Após a seleção das vias, foram identificadas todas as moléculas que formavam cada uma das vias. Dentre estas moléculas, aquelas consideradas alvos dos 8 miRNAs *high confidence* modulados durante a LCL, foram identificados (Figura 8). Foram encontrados, em média, 30-40% das moléculas envolvidas na resposta imune inata contra *L. braziliensis* como alvos potenciais dos miRNAs significativamente modulados (Figura 15B,C). Juntos, esses achados sugerem que a resposta inflamatória descontrolada observada na LCL também pode ser devido a um desequilíbrio nos mecanismos reguladores mediados por miRNAs.

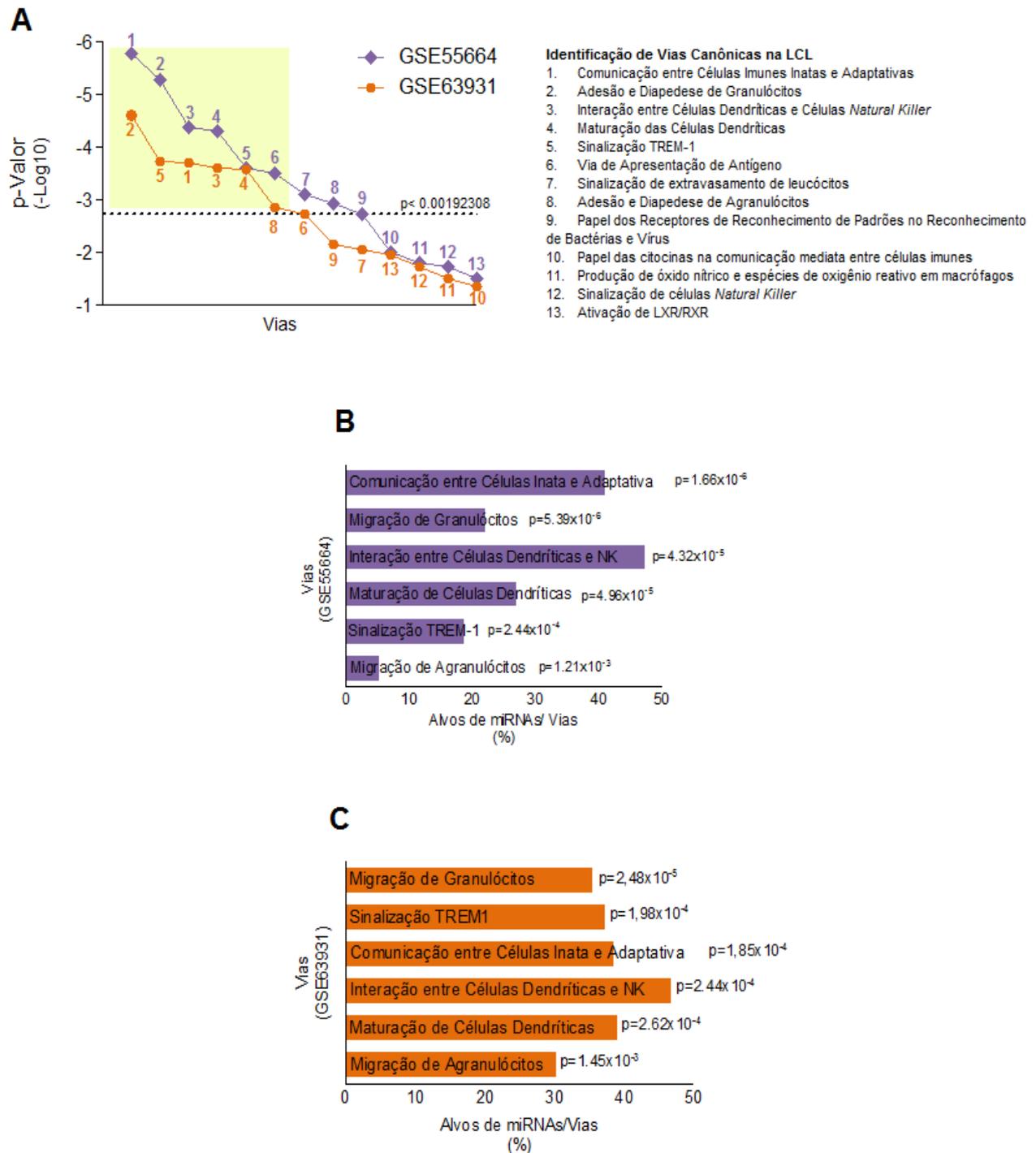


Figura 15. Vias canônicas associadas à resposta imune inata identificadas na LCL. (A) p-valor de 13 vias canônicas comuns para ambos os conjuntos de dados, GSE55664 (roxo) e GSE63931 (laranja), relacionados à resposta imune inata. Cada símbolo representa uma via identificada por números e listado à direita. As vias mais significativas em GSE66554(B) e GSE63931(C) são identificadas pelo p-valor e pelo percentual moléculas que são alvos para miRNAs.

7.5 ALVOS DOS microRNAs IMPLICADOS NA LCL.

Os potenciais genes alvos dos miRNAs foram definidos por análise de pareamento de expressão (Figura 8). Esta abordagem considera apenas os genes alvos com a expressão oposta a do miRNA (HUANG et al., 2007). Essa análise foi realizada para ambos os conjuntos de dados que comparam lesões de LCL com os controles de pele saudável. Assim, apenas um pequeno subconjunto dos genes totais previstos pelo TargetScan foi definido como alvo dos miRNAs. De fato, 6 dos 8 miRNAs *high confidence* não tem RNAm alvos que correspondem a esses critérios. Foram encontrados apenas o gene STAT3 como um alvo potencial para miR-671 e 11 genes-alvo para miR-193b considerando ambos os conjuntos de dados (Figura 16).

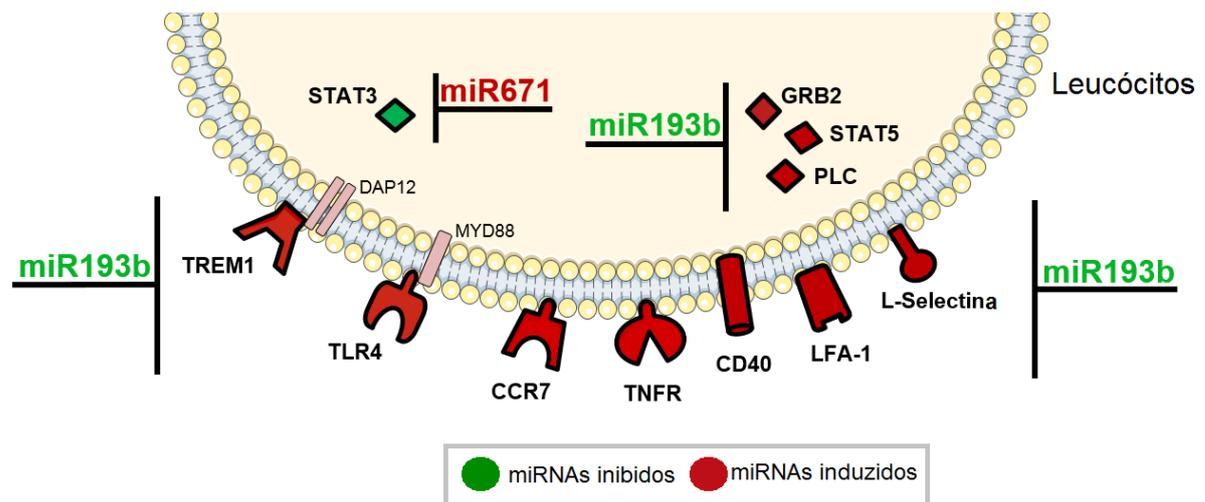


Figura 16. Identificação de microRNAs e seus alvos implicados na LCL. Imagem representativa de moléculas de vias de resposta imune inata e seus respectivos miRNAs com expressão oposta (alvo ↑ miR ↓ ou alvo↑ miR ↑).

7.6 microRNAs E SEUS GENES ALVO ESTÃO RELACIONADOS COM A GRAVIDADE DA LCL.

No intuito de associar a expressão dos miRNAs e seus genes alvos com o desfecho da LCL, as informações clínicas dos pacientes publicamente disponíveis para o conjunto de dados GSE55664 (NOVAIS et al., 2015) foram avaliadas. Primeiramente, uma análise de correlação foi realizada entre os níveis de expressão dos miRNAs e seus genes alvo com o tamanho da lesão, como marcador de gravidade da doença. A matriz de correlação apresentada na Figura 17A resume esses resultados. Surpreendentemente, quase todos os genes avaliados correlacionam-se com o tamanho da lesão. No entanto, o nível de significância indica que, TREM1 pode ter um papel mais preponderante neste contexto por apresentar o maior valor de p dentre todos os genes (Figura 17B). Apenas o miR-193b tem uma correlação negativa com seus alvos e com o tamanho da lesão. Esses dados sugerem que o miR-193b, miR-671 e seus alvos, em especial o TREM-1, desempenham um papel significativo na amplificação da resposta inflamatória observada na LCL.

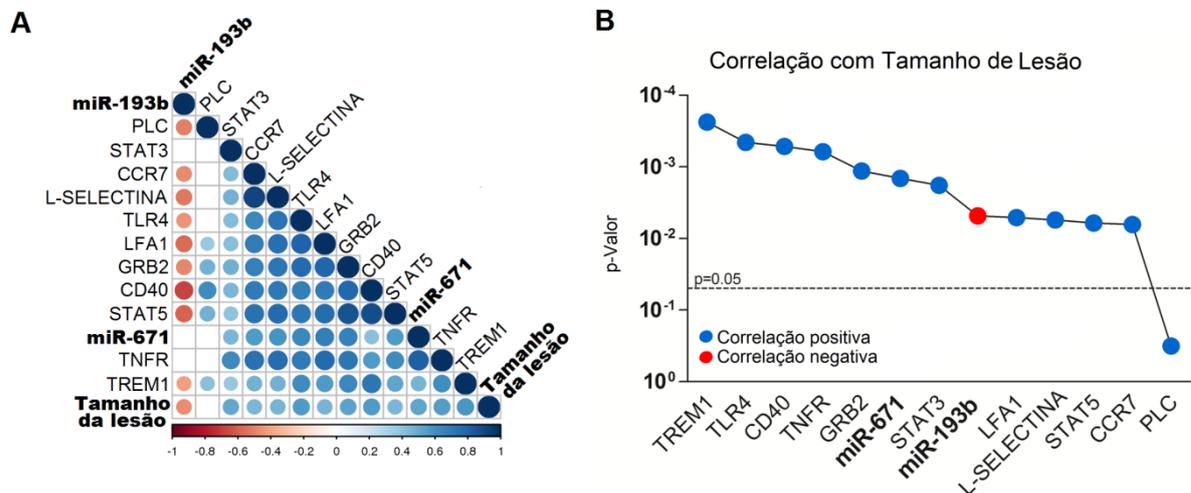


Figura 17. microRNAs e seus genes alvos correlacionados com a gravidade da LCL. (A) Matriz de correlação (correlação de Spearman) entre a expressão de miRNAs, seus alvos e o tamanho da lesão. O tamanho dos círculos e seus tamanhos representam valores significativos ($p < 0,05$). As cores representam o direcionamento da correlação. (B) O p-valor das correlações de Spearman entre o tamanho da lesão e miRNAs ou genes alvo. Cada símbolo representa uma correlação.

7.7 miR-193b, miR-671 e TREM-1 ESTÃO CORRELACIONADOS COM O DESFECHO DA LCL.

Utilizando dados sobre o tempo de cura dos pacientes obtidos no estudo GSE55664 (NOVAIS et al., 2015), foram construídas redes de correlações de Spearman entre este dado clínico e miRNAs/genes alvos. As correlações foram aplicadas entre os grupos de pacientes com diferentes tempos de cura: menos de 59 dias (N=7), entre 60-89 dias (N=11) ou mais de 90 dias (N=7). O perfil de correlação é distinto para cada grupo de pacientes, especialmente para aqueles com tempo de cura reduzido (0-59 dias). Existe uma correlação negativa entre os miR-193b e miR-671 com TREM-1 somente neste grupo (Figura 18). Surpreendentemente, no grupo com maior tempo de cura (acima de 90 dias), estas correlações são perdidas e estes pacientes apresentam mais correlações apenas entre os genes alvo. Estes achados sugerem que um melhor prognóstico para a LCL envolve as correlações entre miR-193b, miR671 e TREM1.

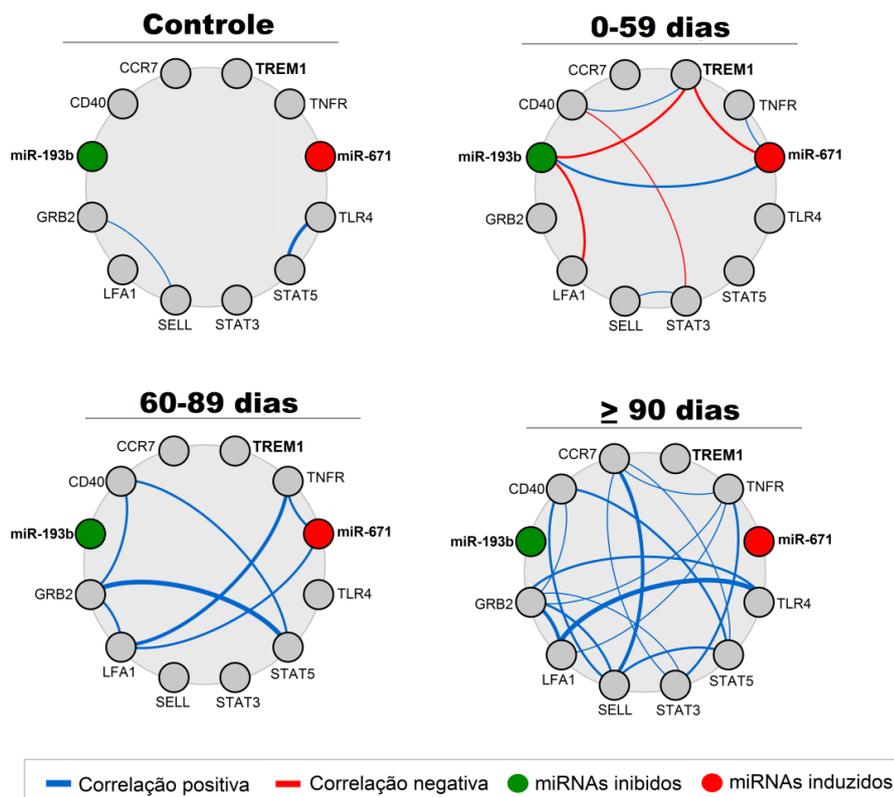


Figura 18. miR-193b, miR-671 e TREM-1 no desfecho da LCL. A análise de redes mostra correlações de Spearman ($-0,6 < r < 0,6$) entre miRNAs e os genes alvo de acordo com a resposta ao tratamento (tempo de cura em até 59 dias, 60-89 dias ou > 90 dias). As cores representam o direcionamento da correlação (vermelho, correlação negativa; azul, correlação positiva; vermelho, miRNAs ou genes induzidos; verde, miRNAs ou genes inibidos).

CAPÍTULO 2

8 JUSTIFICATIVA

A susceptibilidade da pele à doenças está relacionada com sua exposição ao ambiente, onde agentes químicos, físicos, microorganismos ou o próprio sistema imune podem desencadear alterações, levando à distúrbios cutâneos. O processo inflamatório exacerbado e a desregulação de moléculas envolvidas nesse contexto têm papel fundamental no desenvolvimento dessas doenças. Estudos recentes têm revelado a importância dos miRNAs para a regulação de mecanismos cruciais em diferentes de doenças inflamatória de pele. Para cada estudo referente à determinada doença inflamatória de pele, um perfil específico de miRNA tem sido encontrado, demonstrado importância funcional e biológica específicas. Portanto, esse capítulo tem o intuito de avaliar a expressão de miRNAs em diferentes doenças inflamatórias de pele a fim de determinar a especificidade do padrão de miRNAs.

9 HIPÓTESE

A expressão microRNAs é específica para cada doença inflamatória de pele avaliada.

10 OBJETIVOS

10.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar o perfil de expressão de microRNAs em doenças inflamatórias de pele.

10.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de expressão de microRNAs disponíveis em bancos públicos em outras doenças inflamatórias da pele que não a LCL;
- Identificar microRNAs comuns expressos entre as diferentes doenças inflamatórias de pele.

11 DESENHO EXPERIMENTAL

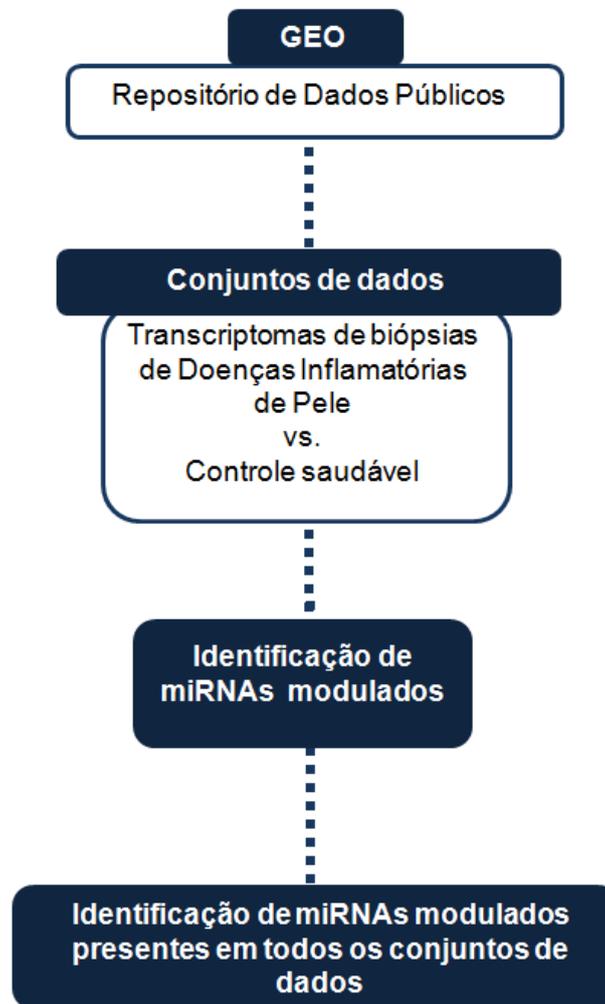


Figura 19. Representação esquemática do estudo. Utilização de ferramentas genômicas para avaliação do perfil de expressão de miRNAs em doenças inflamatórias de pele.

12 MATERIAIS E MÉTODOS

12.1 ANÁLISE DE DADOS PÚBLICOS REFERENTE A DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE.

O repositório público GEO (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) foi utilizado mais uma vez para buscar transcriptomas que avaliassem doenças inflamatórias de pele na mesma plataforma que tinha o maior número de sondas de miRNAs, Illumina HT12 v4. As análises foram realizadas da mesma maneira que na leishmaniose (Capítulo 1), no intuito de comparar os resultados. Foram considerados apenas os conjuntos de dados que analisavam biópsias de pele humana em comparação a controles saudáveis. Nesses critérios, 3 conjuntos de dados foram encontrados, GSE53431, GSE72535 e GSE58095 referentes a Psoríase, Lúpus e Esclerodermia, respectivamente (Figura 20). Todos os dados foram analisados pelas ferramentas GEO e MeV.

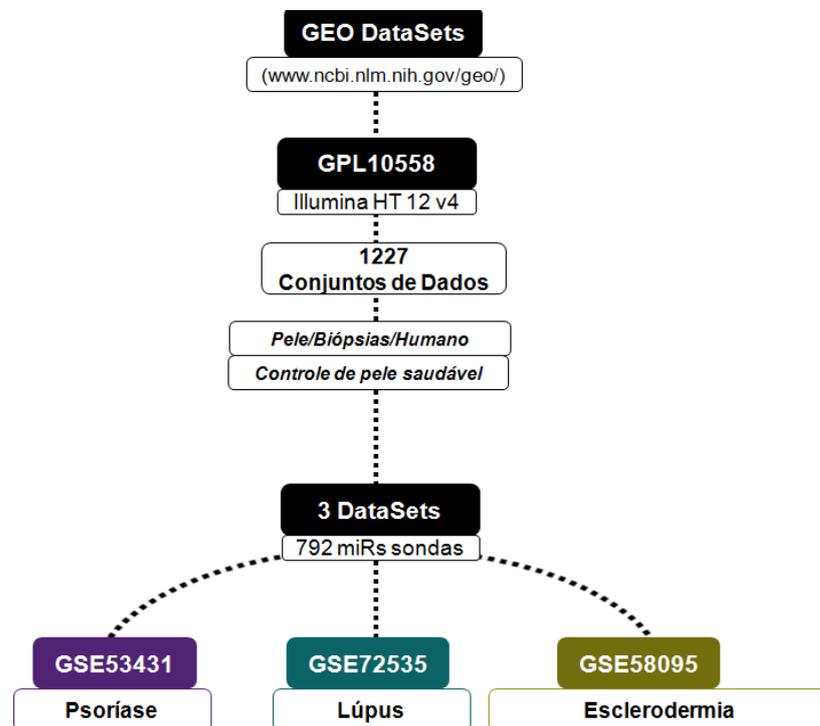


Figura 20. Pipeline da busca dos transcriptomas referente às doenças inflamatórias de pele na plataforma Illumina. Illumina HT 12 v4 *Beadchip* (GPL10558) foi usado com novos filtros para analisar o perfil de expressão de miRNAs em outras doenças inflamatórias de pele em comparação a amostras controle. Cada conjunto de dados tem as mesmas 792 sondas para miRNAs avaliadas anteriormente na leishmaniose. GSE53431, GSE72535 e GSE58095 foram encontrados nesta pesquisa como equivalentes a Psoríase, Lúpus e Esclerodermia, respectivamente.

13 RESULTADOS

13.1 COMPARAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DE microRNAs ENTRE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE.

Análises transcriptômicas de doenças inflamatórias de pele foram realizadas a fim de confirmar a especificidade do perfil de expressão de miRNAs em cada doença. O banco de dados GEO foi utilizado para pesquisar microarranjos realizados na mesma plataforma da Illumina HT 12 v4, cujo número total de sondas para miRNAs é maior. Foram encontrados 3 transcriptomas: GSE53431 para Psoríase, GSE72535 para Lúpus e GSE58095 para Esclerodermia (Figura 20). O primeiro conjunto de dados comparou os padrões globais da expressão gênica entre 47 amostras (35 biópsias de pele de pacientes com Psoríase e 12 amostras de controle saudável), o segundo avaliou 17 amostras (9 biópsias de pele de pacientes com Lúpus e 8 amostras de controle saudável) e o terceiro avaliou 102 amostras (59 biópsias de pele de pacientes com Esclerodermia e 43 amostras de controle saudável). Após a identificação dos transcritos (de um total de 47.305), as mesmas 792 sondas de miRNAs avaliadas na leishmaniose foram analisadas. O perfil de expressão dos miRNAs não agrupou as amostras das lesões cutâneas separadamente dos controles de pele saudável em nenhuma das doenças avaliadas (Figuras 21 a 23), diferentemente do que foi encontrado para LCL (Figuras 9 e 11).

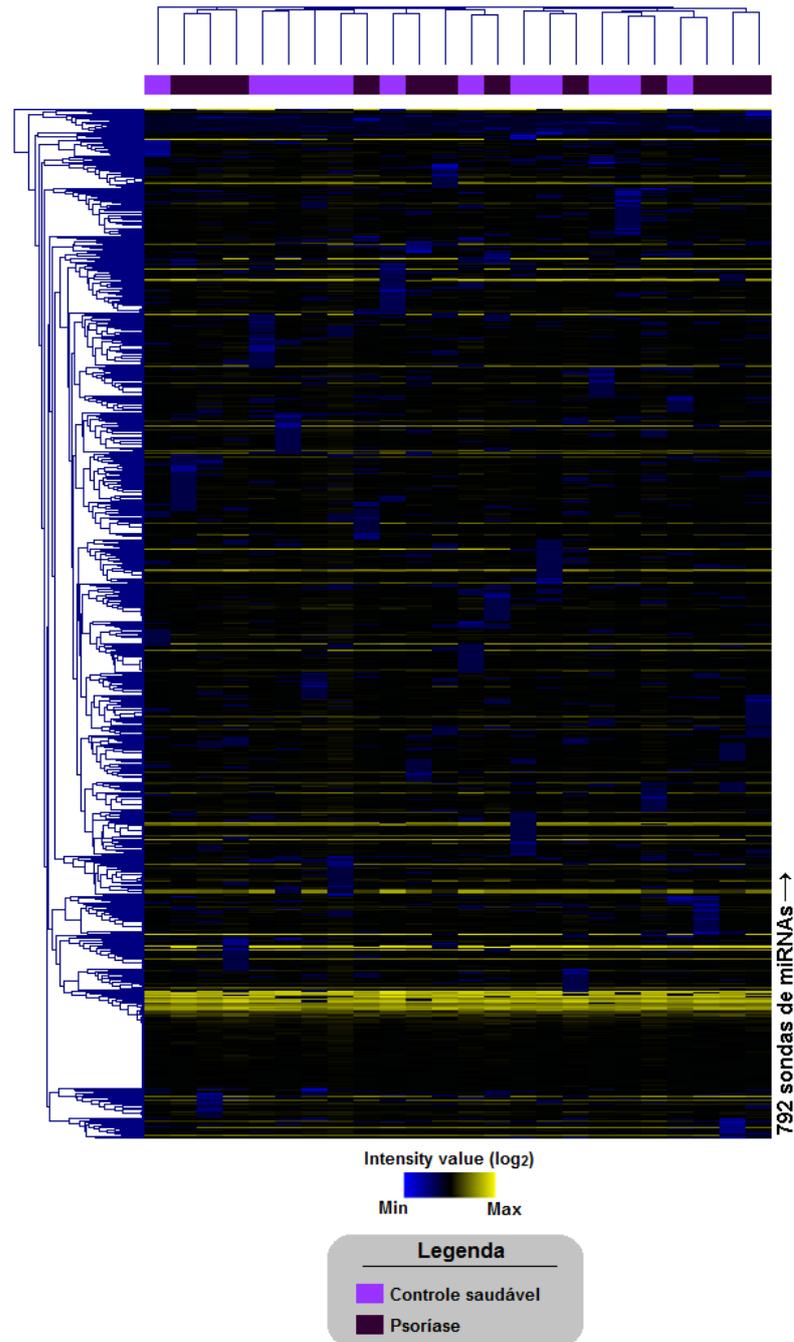


Figura 21. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de pele de Psoríase e controle saudável com base nas expressões de microRNAs em GSE53431. O *heat map* mostra o perfil de expressão de 792 sondas de miRNAs na plataforma GSE53431 (plataforma Illumina HT12 v4) em 12 amostras controle e 35 amostras de pacientes com psoríase. O eixo Y representa as sondas de miRNAs e o eixo X representa as amostras. A barra de escala simboliza a intensidade de expressão para cada sonda de miRNA (Log₂).

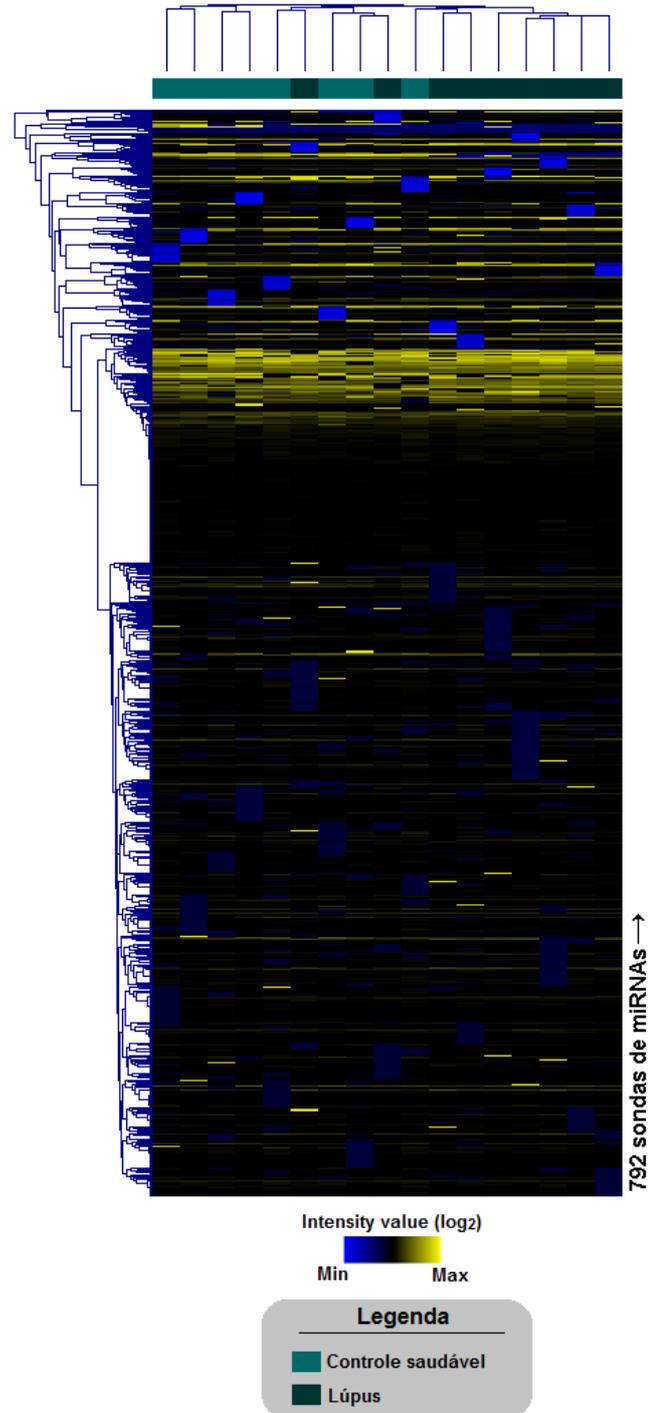


Figura 22. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de pele de Lúpus e controle saudável com base nas expressões de microRNAs em GSE72535. O *heat map* mostra o perfil de expressão de 792 sondas de miRNAs na plataforma GSE72535 (plataforma Illumina HT12 v4) em 8 amostras controle e 9 amostras de pacientes com lúpus. O eixo Y representa as sondas de miRNAs e o eixo X representa as amostras. A barra de escala simboliza a intensidade de expressão para cada sonda de miRNA (Log₂).

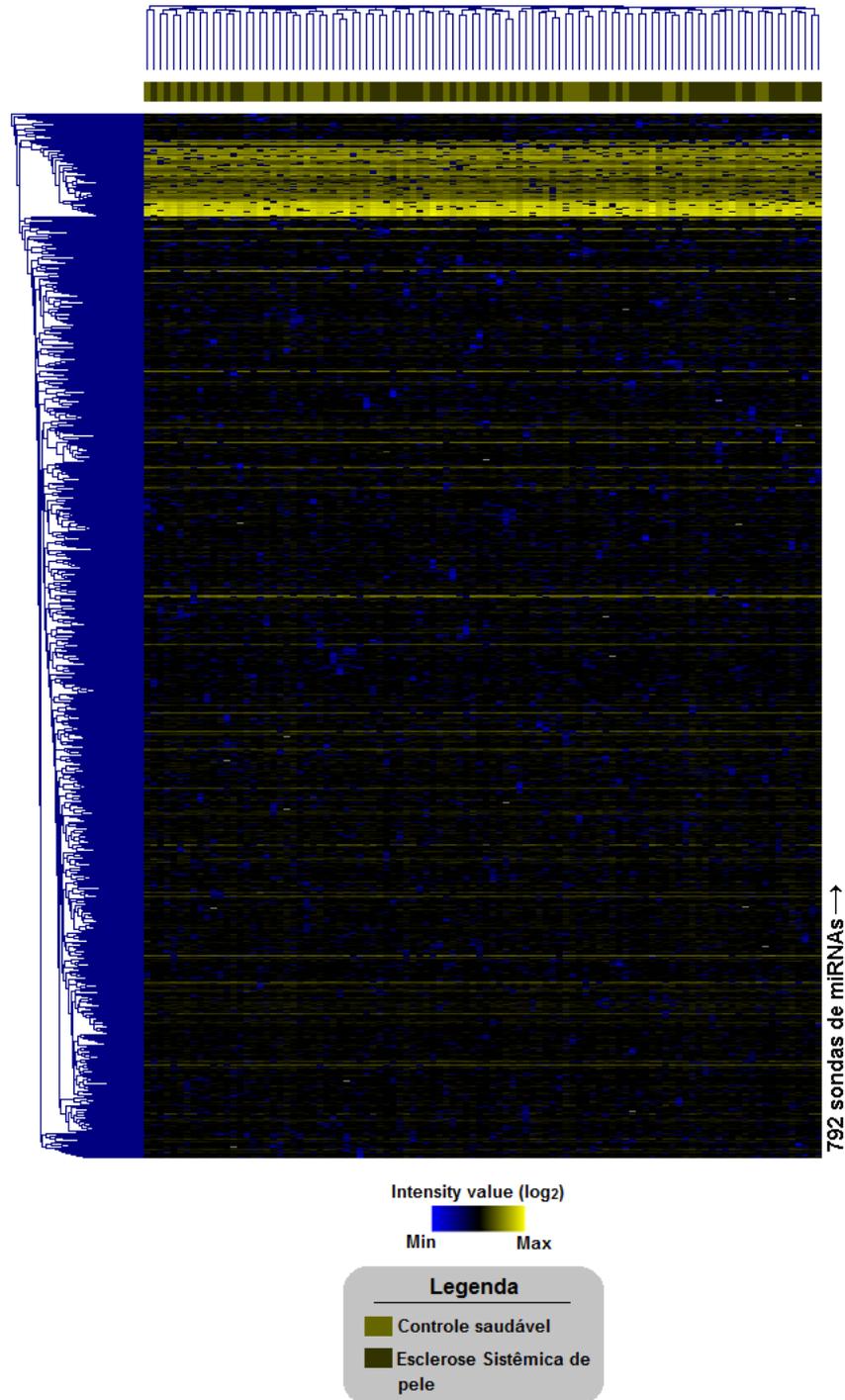


Figura 23. Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado de biópsias de Esclerodermia e controle saudável com base em expressões de microRNAs em GSE58095. O *heat map* mostra o perfil de expressão de 792 sondas de miRNAs na plataforma GSE58095 (plataforma Illumina HT12 v4) em 43 amostras controle e 59 amostras de pacientes com Esclerodermia. O eixo Y representa as sondas de miRNAs e o eixo X representa as amostras. A barra de escala simboliza a intensidade de expressão para cada sonda de miRNA (Log₂).

13.2 microRNAs MODULADOS EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE.

Considerando as sondas de miRNAs significativamente moduladas entre pacientes e controles (valor de $p < 0.05$; diferença de expressão $\geq 1,5$ para mais ou para menos), foram encontradas 20 sondas de miRNAs no conjunto de dados da Psoríase (Figura 24A). Deste total, 10 sondas estavam induzidas (barras em vermelho) e 10 sondas inibidas (barras em verde), das quais, 14 são miRNAs conhecidos e apenas 1 miRNA *high confidence* (Figura 24B). No conjunto de dados para Lúpus, foram encontradas apenas 4 sondas de miRNAs significativamente moduladas (Figura 24A), das quais 1 sonda estava induzida (barra em vermelho) e 3 sondas inibidas (barras em verde). Todas estas sondas identificadas codificam miRNAs conhecidos e apenas 2 são miRNAs *high confidence* (Figura 24B). Não foram encontrados miRNAs significativamente modulados na análise do conjunto de dados para Esclerodermia (Figura 24B). Em conjunto, os achados das análises de todas as doenças de pele avaliadas reforçam que o perfil de expressão de miRNAs é específico para cada enfermidade, mesmo quando todas apresentam um caráter inflamatório importante para sua patogênese.

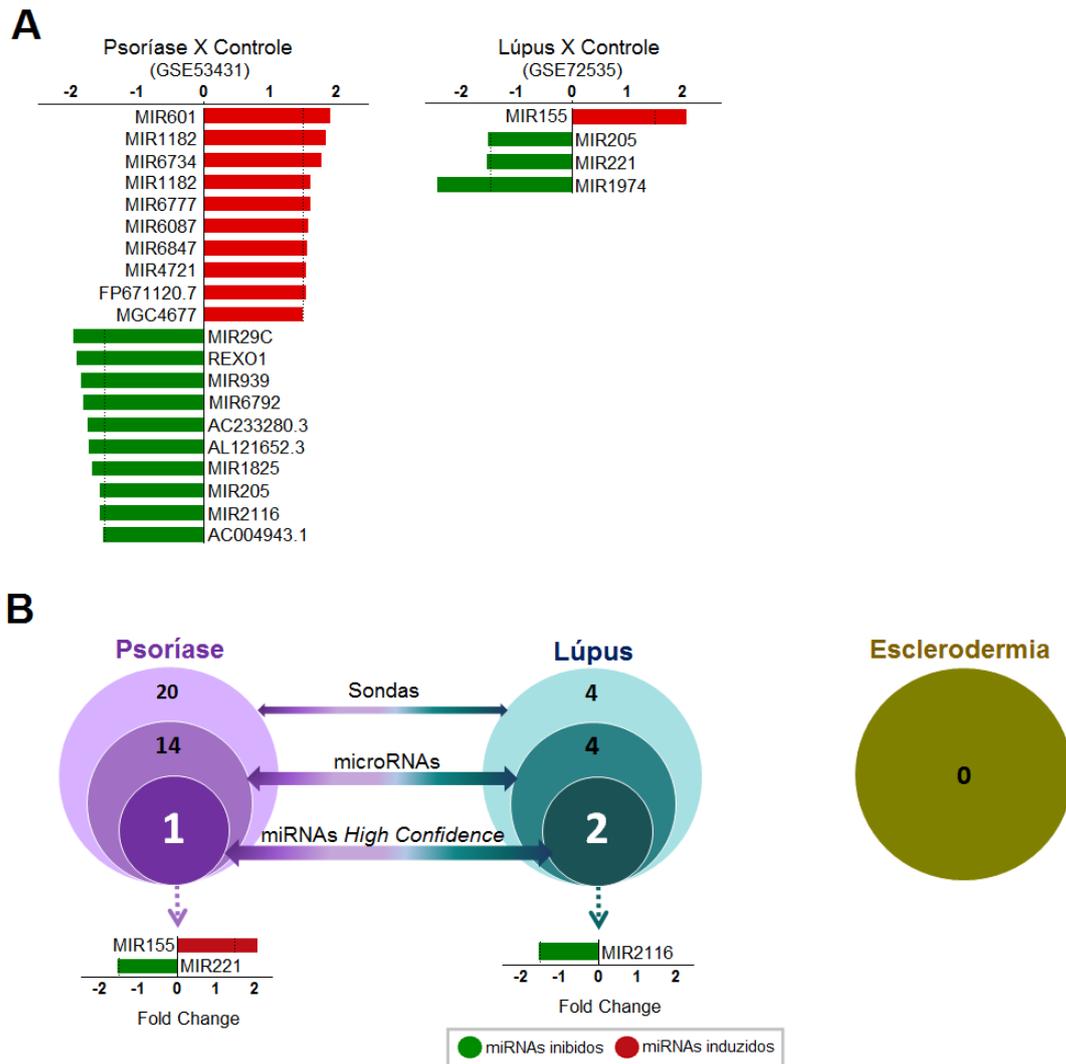


Figura 24. Expressão diferencial de microRNAs em doenças inflamatórias de pele. (A) O gráfico mostra a diferença de expressão (FC) das sondas de miRNAs moduladas na Psoríase (GSE53431) e Lúpus (GSE72535) em relação às amostras controles. As linhas pontilhadas representam o corte para a expressão diferencial ($-1,5 < \text{diferença de expressão} > 1,5$). (B) O número total de sondas, sequências ou miRNAs *high confidence* para cada conjunto de dados, GSE53431 (roxo) e GSE72535 (laranja) dos círculos externos aos internos, respectivamente ($p\text{-valor} < 0,05$). Os gráficos de barras mostram a diferença de expressão dos miRNAs *high confidence* diferencialmente expressos de ambos os conjuntos de dados. As barras vermelhas representam os miRNAs induzidos e as barras verdes representam os miRNAs inibidos. No conjunto de dados GSE58095 (mostarda), não foram encontrados miRNAs significativamente modulados.

13.3 APENAS UM microRNA É COMUM A TODAS AS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS DE PELE AVALIADAS.

O total de sondas para miRNAs modulados significativamente (p -valor < 0.05 ; diferença de expressão $\geq 1,5$ para mais ou para menos) em todas as doenças de pele foram avaliadas através do Diagrama de Venn no intuito de identificar miRNAs em comum. Os dados para Esclerodermia não foram incluídos, uma vez que, não foram identificadas sondas para miRNAs moduladas significativamente. O resultado desta análise indica que o miR-205 é o único miRNA em comum entre as doenças avaliadas (Figura 25A). Além disso, seu perfil de expressão está inibido em todas estas enfermidades (Figura 25B), sugerindo que o miR-205 deve exercer um papel mais fundamental no processo inflamatório independente da sua etiologia.

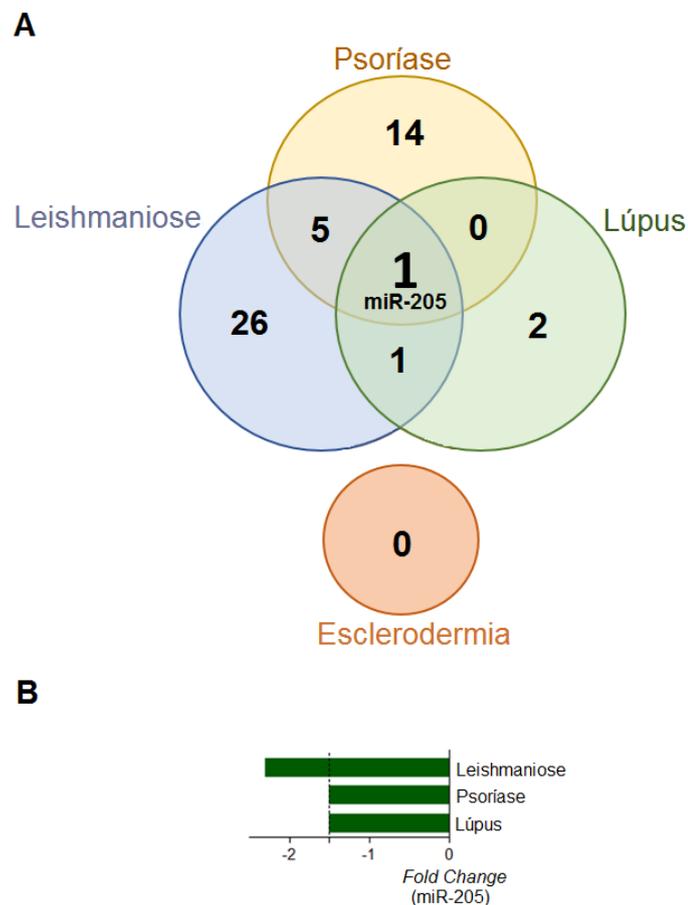


Figura 25. Diagrama de Venn para detectar microRNAs em comum nas doenças inflamatórias de pele. (A) O diagrama identificou um miRNA (miR-205) em comum a todas as doenças inflamatórias de pele, exceto para Esclerodermia. (B) O perfil de expressão do miR-205 é de inibição (barras verde) em todos os conjuntos de dados.

14 DISCUSSÃO

A análise integrativa de conjuntos de dados de diferentes coortes contribuiu para a compreensão de interações complexas de redes envolvidas na patogênese das doenças (ZHU, M. et al., 2011; ANDRES-TERRE et al., 2015; WANG et al., 2015). Essa abordagem permitiu identificar a expressão de miRNAs em amostras de biópsias de LCL causada por *L. braziliensis* em diferentes áreas endêmicas. Com essa abordagem, foi possível distinguir a lesão humana causada por LCL das amostras de pele saudável. Além disso, vias relacionadas com a LCL foram identificadas a fim de analisar como os miRNAs e seus genes alvos estavam implicados na doença e como eles se correlacionavam com dados clínicos dos pacientes (capítulo 1).

Avaliou-se também o mesmo conjunto de miRNAs em outras doenças inflamatórias de pele, a fim de comparar os padrões de expressão em cada enfermidade. Entretanto, não foi possível separar em grupos distintos cada uma das doenças avaliadas dos seus respectivos grupos controle com base no perfil de miRNAs, o que reforça a especificidade dos achados na LCL (capítulo 2).

Os miRNAs foram validados em três áreas endêmicas distintas para *L. braziliensis*. Considerando que foram utilizados apenas ensaios comercialmente disponíveis, dos 8 miRNAs encontrados nas análises de microarranjos, apenas 5 foram validados (hsa-miR-99a, hsa-miR-155, hsa-miR-193b, hsa-miR-503 e hsa-miR-221). As diferenças nas escalas observadas para cada técnica podem ser devido à sensibilidade dos ensaios, dos iniciadores de PCR ou dos antecedentes genéticos dos pacientes de diferentes coortes. No entanto, os achados dos microarranjos e do PCR convergem para o mesmo padrão de resultado.

Estudos mostram os miRNAs como importantes reguladores da resposta imune inata e adaptativa em distúrbios (BALTIMORE et al., 2008; O'CONNELL et al., 2012) como doenças autoimunes (YAN et al., 2015), diabetes (REGAZZI et al., 2013), toxoplasmose (ZEINER et al., 2010), infecção bacteriana (KUMAR et al., 2015) e infecções virais (JOPLING et al., 2005). Para identificar potenciais moléculas que pudessem ser alvos dos miRNAs modulados durante a LCL, foram identificadas vias canônicas associadas à doença para ambos conjuntos de dados. São elas: Comunicação entre células imunes inatas e adaptativas; Adesão de granulócitos e diapedese; *Crosstalk* entre células dendríticas e células *Natural killer*; Maturação de células dendríticas; Sinalização do TREM-1; e Adesão de

agranulócitos e diapedese. Essas vias são comuns em ambos os conjuntos de dados avaliados (GSE55664 e GSE63931).

A maioria das vias identificadas foram descritas na literatura como importante para a patogênese LCL (BOGDAN et al., 2012; ATHAYDE et al., 2016; FEIJÓ et al., 2016), exceto a via de "Sinalização do TREM-1". No entanto, Carneiro e colaboradores identificaram genes expressos em vias significativamente enriquecidas relacionadas à LCL, entre essas vias, a "Sinalização do TREM-1" estava fortemente associada à resposta inflamatória e controle de infecção (WEBER et al., 2014; CARNEIRO et al., 2016). Essas descobertas evidenciam a importância de estudar o papel do miRNAs nesse contexto.

Oito miRNAs *high confidence* compõem o perfil de miRNAs encontrado na LCL, onde as expressões dos miR-193b, miR-671 e seu alvo TREM1 estão fortemente correlacionadas com o tamanho da lesão. Além disso, uma correlação entre miR-193b, miR-671 e TREM1 é observada apenas em pacientes com melhor prognóstico (tempo de cura entre 0-59 dias), sugerindo que este eixo desempenha um papel significativo na LCL. Sendo assim, essas moléculas podem ser candidatos potenciais para o desenvolvimento de novas ferramentas para a doença.

A análise do pareamento de expressão entre os miRNAs e os alvos, resultou em um conjunto mais restrito de miRNAs, uma vez que a predição de seus alvos identifica apenas RNAs com a expressão oposta ao miRNA (ZHU et al., 2011). A partir desta análise, apenas o miR-193b e o miR-671 e 11 alvos preenchem esses critérios.

O envolvimento do miR-193b na regulação de genes-alvo relevantes já foi descrito para diferentes tipos de câncer (LIN et al., 2017; MOORE et al., 2017; TORRES-FERREIRA et al., 2017) e para infecção de hepatite B em seres humanos (REE et al., 2017). Alguns estudos mostram o papel do miR-671 na apoptose neuronal (NAN et al., 2017), na resposta inflamatória de células epiteliais do cólon (CHUANG et al., 2016) e no câncer colorretal (RUTNAM & YANG, 2012; CHEN et al., 2016). No entanto, não há nenhum relato na literatura descrevendo a expressão alterada de miR-193b e miR-671 no mesmo contexto. Neste estudo, esses dois miRNAs foram identificados como reguladores da expressão gênica e estão fortemente associados ao tamanho da lesão na LCL humana.

Diversas moléculas estão envolvidas em processos inflamatórios como receptores, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e moléculas amplificadoras, onde estes podem ser possivelmente alvos de miRNAs. Os potenciais genes-alvo do miR-193b e miR-671 foram preditos e selecionados pelo critério de pareamento de expressão (ZHU et al., 2011). O receptor de ativação expresso em células mieloides 1 (TREM1 do inglês *Triggering receptor*

expressed on myeloid cells 1), foi o gene alvo mais significativamente correlacionado com o tamanho da lesão ($r = 0,6$; $p = 0,0002394$). O TREM-1 é um receptor de superfície descrito na literatura como importante em reconhecimento e amplificação da inflamação. Sua ação aumenta a liberação de mediadores inflamatórios, como TNF, IL-8, quimiocinas e induz a degranulação celular (BOUCHON et al., 2001). A inflamação é crucial para a eliminação de patógenos e a sobrevivência do hospedeiro, mas sua amplificação mediada pelo TREM-1 pode causar instabilidade hemodinâmica, falência de órgãos, além de morte (PELHAM et al., 2014). Já foi demonstrado que muitas doenças, infecciosas ou não, apresentam níveis alterados da proteína TREM-1 e sua forma solúvel. A gravidade da sepse, choque séptico (DIMOPOULOU et al., 2012) e pancreatite aguda (SUN et al., 2017) correlacionam-se positivamente com os níveis séricos de TREM-1. Além disso, já foi demonstrado que a etiologia de doenças inflamatórias crônicas, como distúrbios reumáticos autoimunes e doenças inflamatórias intestinais, envolve TREM-1 (SCHENK et al., 2007; MURAKAMI et al., 2009). Na leishmaniose, foi demonstrado que a infecção de macrófagos murinos por *L. major* desencadeia uma resposta de padrão inflamatório, mediada por TREM-1 e citocinas /quimiocinas (FILARDY et al., 2014). No entanto, o papel prejudicial do TREM-1 para a infecção por *L. major* foi relatado *in vivo*, onde a deficiência de TREM-1 atenua a gravidade da LCL sem afetar o controle do parasito (WEBER et al., 2014).

Neste sentido, o presente estudo identifica o miR-193b como candidato antagonista a expressão de TREM-1 em condições inflamatórias de maneira endógena. A realização de experimentos do grupo definirá o papel do TREM-1 na patogênese da infecção por *L. braziliensis* que, em última instância, pode determinar o desfecho e o prognóstico da doença. Além disso, a manipulação do eixo miR-193b e TREM-1 também pode ser útil para outras doenças inflamatórias, já que o mecanismo pelo qual o TREM-1 promove a inflamação pode ser comum para diferentes doenças imuno mediadas.

TREM-1 também apresenta um papel sinérgico com o receptor Toll-like 4 (TLR4), induzindo liberação de citocinas inflamatórias (BOUCHON et al., 2001). O receptor Toll-like (TLR) está presente em vários tipos celulares no contexto da resposta imune inata, sendo responsáveis por reconhecer Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPs) ou Padrões Moleculares Associados ao Dano Celular (DAMPs). O TLR4, receptor amplamente descrito por sua ativação por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), é capaz de reconhecer à *Leishmania* e contribuir para o amplo processo inflamatório da LCL (MURRAY et al., 2013; TOLOUEI et al., 2013). Além disso, esta ativação contribui para a liberação do fator de necrose tumoral (TNF), aumentando os níveis de expressão do receptor de TNF (TNFR),

potencial alvo do miR-193b. Estudos mostram que o TNF promove a eliminação de *Leishmania* em macrófagos através de óxido nítrico (NO) (GREEN et al., 1990). Neste contexto, a expressão de CD40 em macrófagos e sua interação com CD40L foram mostradas críticas para a indução de respostas anti-leishmanial (BOGDAN et al., 1996). Resultados semelhantes não foram encontrados na literatura.

A expressão diferencial de miRNAs tem sido aplicada em diferentes contextos de doenças humanas. Eles podem atuar como biomarcadores de asma alérgica (MILGER et al., 2016), de progressão de doenças hepáticas (CAI et al., 2015), de doenças ósseas (HACKL et al., 2016), de doenças cardíacas (CREEMERS et al., 2012), e doenças crônicas de pele (MANNUCCI et al., 2017). Também já foi descrita a utilização de miRNAs como ferramenta terapêutica, a exemplo da infecção humana pelo vírus da hepatite C (JANSSEN et al., 2013), além de serem potenciais marcadores de prognósticos para diferentes tipos de câncer (LIU et al., 2017; MIAO et al., 2017; ZHU et al., 2017). No entanto, pouco se sabe sobre os perfis de expressão de miRNAs em doenças parasitárias humanas.

Alguns estudos identificaram miRNAs circulantes em modelos murinos de infecção por *Schistosoma japonicum* (CAI et al., 2015), *S. mansoni* (HOY et al., 2014) e *Toxoplasma gondii* (JIA et al., 2014) como alvos potenciais para biomarcadores de progressão ou diagnóstico da doença. Estes perfis de expressão de miRNAs no plasma são específicos para cada doença avaliada, mas esses achados precisam ser validados em amostras humanas. Outros estudos demonstraram, por exemplo, que o miR-451 é significativamente enriquecido em glóbulos vermelhos humanos infectados por *Plasmodium falciparum* (XUE et al., 2008). Mais importante ainda, foi o mecanismo de atuação descrito para este miRNA na malária humana, onde ele é translocado para o parasito, protegendo o hospedeiro por afetar negativamente a sobrevivência parasitária (LAMONTE et al., 2012). Essas descobertas fornecem a primeira evidência do papel protetor de um miRNA específico na malária humana.

Alguns estudos descritos na literatura já avaliaram a modulação da expressão de miRNAs durante a infecção por *Leishmania* em células cultivadas *in vitro* ou em modelos experimentais de infecção. A maioria deles avalia espécies causadoras da leishmaniose visceral (GHOSH et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2015; PANDEY et al., 2016; SINGH et al., 2016; BHATTACHARYYA et al., 2017; TIWARI et al., 2017; VERMA et al., 2017) ou espécies do Velho Mundo que causam a LCL (KELADA et al., 2013; LEMAIRE et al., 2013; FRANK et al., 2015; MILLAR et al., 2015; MUXEL et al., 2017) ou ambas (GERACI et al.,

2015), deixando em aberto uma lacuna no conhecimento sobre os miRNAs envolvidos na LCL humana causada por espécies do Novo Mundo, em especial a *L. braziliensis*.

Os mecanismos de evasão do sistema imune que a *Leishmania* possui são bem descritos e conhecidos na literatura. No entanto, o envolvimento de miRNAs neste mecanismo tem sido identificado mais recentemente. Os principais estudos sugerem que a *L. donovani* sobrevive mais eficientemente através da indução/inibição de miRNAs implicados nas respostas Th1 e Th17, favorecendo um padrão de resposta Th2 (MUKHERJEE et al., 2015; PANDEY et al., 2016). Além disso, esse parasito é capaz de alterar a homeostasia do fígado, por modulação do miRNAs, no intuito de manter sua sobrevivência (GHOSH et al., 2013).

Recentemente, Muxel e colaboradores avaliaram a expressão de 84 miRNAs em macrófagos de camundongos infectados por *L. amazonensis* em diferentes tempos. Eles mostraram que o miR-294 e miR-721 são induzidos pela infecção, tendo como alvo o metabolismo de NOS2 e L-arginina, favorecendo o estabelecimento do parasita (MUXEL, et al., 2017). No entanto, a expressão alterada destes miRNAs não foi observada em nenhum outro estudo que investigou a infecção por *Leishmania* em diferentes contextos.

Outro estudo identificou a inibição do miR-494 na infecção *in vitro* de macrófagos humanos de linhagem (THP1) por *L. donovani*, a fim de favorecer a sobrevivência desse parasito (VERMA et al., 2017). Millar e colaboradores identificaram 698 genes diferencialmente expressos, dos quais 5 eram miRNAs, em macrófagos THP1 infectados com *L. mexicana*. De acordo com a literatura, esses miRNAs atuam na inibição da morte celular, que é um mecanismo de escape da *L. mexicana*, a fim de manter a sobrevivência dentro do vacúolo parasitóforo (MILLAR et al., 2015).

No entanto, há relatos na literatura do papel do miRNAs no controle da infecção. Singh e colaboradores avaliaram a expressão do miR-30a-3p, que estava induzido na infecção de macrófagos THP1 por *L. donovani*, onde esse miRNA inibe a BECLN1, um regulador da autofagia (SINGH et al., 2016). A autofagia pode ser um mecanismo induzido por patógenos intracelulares a fim de obter nutrientes, assim como, pode ser uma defesa do hospedeiro junto à resposta imune inata para restringir nutrientes a outros patógenos (ORVEDAHL e LEVINE, 2009; KROEMER et al., 2010). Juntos, esses estudos apontam a especificidade do perfil de expressão de miRNAs em cada modelo de doença, uma vez que os resultados obtidos foram observados apenas nas condições testadas. De fato, isso reforça a importância de avaliar as alterações diretamente em amostras obtidas de pacientes

naturalmente infectados, onde a complexidade do organismo humano é considerada e os artefatos potenciais dos modelos experimentais são evitados.

Neste sentido, o presente estudo é o primeiro a avaliar o perfil de expressão de miRNA em lesões humanas causadas por *L. braziliensis*, uma importante causa da LCL na América do Sul. Foram observados 8 miRNAs *high confidence* que são modulados significativamente durante a LCL: 3 miRNAs inibidos (miR-193b, miR-99a e miR-221) e 5 miRNAs induzidos (miR-155, miR-671, miR-503, miR-302c e miR-93). Este conjunto de miRNAs parece ser específico para LCL humana, uma vez que foram encontrados diferentes perfis para outras doenças inflamatórias da pele em seres humanos (Figura 21-23). Além disso, não foram encontrados relatos na literatura que tenham descrito este perfil ou um perfil semelhante de miRNAs.

Em resumo, este é o primeiro estudo a revelar um perfil de expressão previamente desconhecido de miRNAs envolvidos na regulação de vias que são importantes para a imunopatogênese da LCL humana, abrindo novas perspectivas para a regulação dos mecanismos envolvidos na gravidade e prognóstico da doença. É tentador especular que o eixo miR-193b, miR-671 e TREM-1 possa ser um candidato potencial para o desenvolvimento de novas ferramentas para gerenciar esta doença e outros distúrbios inflamatórios da pele.

15 PRINCIPAIS ACHADOS

- O perfil de expressão de microRNAs distingue grupos de amostras com lesão de pele causadas por *L. braziliensis* das amostras de pele saudável;
- Na LCL, 8 microRNAs *high confidence* estão significativamente modulados;
- A expressão dos miR-193b, miR-671 e seu gene alvo TREM1 está correlacionada com o tamanho da lesão e ao bom prognóstico dos pacientes com LCL;
- TLR4 e outras moléculas fundamentais na inflamação (como CCR7, TNFR e CD40) estão fortemente correlacionadas com o tamanho da lesão e todos eles são alvos potenciais do miR-193b;
- O perfil de expressão dos microRNAs parece ser específico para cada doença inflamatória de pele;
- O miR-205 foi o único microRNA em comum nas doenças inflamatórias de pele avaliadas;
- O miR-205 parece exercer funções mais genéricas (migração de queratinócitos e reepitelização) em inflamações cutâneas.

16 CONCLUSÃO

O perfil de expressão dos miR-193b, miR-671 e seu gene alvo TREM1 está fortemente correlacionado com a gravidade da LCL humana causada por *L. braziliensis* e esse perfil de expressão parece ser específico para Leishmaniose.

No entanto, o mir-205 e o único miRNA inibido em diferentes doenças inflamatórias de pele de modo independente da sua etiologia.

17 PERSPECTIVAS

- Estudar o perfil de expressão do miR-193b e miR-671 em macrófagos humanos transfectados com mimics ou inibidores dos miRNAs e infectados ou não com *L. braziliensis*;
- Analisar a expressão dos alvos diante da inibição/indução desses microRNAs nas culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis*;
- Dosar mediadores inflamatórios e citocinas no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com *L. braziliensis*;
- Avaliar a viabilidade celular, carga parasitária e viabilidade/eliminação de parasitos;
- Identificar o perfil de expressão do mir-205 e dos seus alvos em experimentos *in vitro* com queratinócitos humanos expostos a *Leishmania braziliensis*;
- Avaliar a reepitelização/cicatrização diante da habilidade de migração dos queratinócitos submetidos a um processo de inibição/indução do miR-205.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVES-FERREIRA, E. V. C. et al. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal Leishmania braziliensis Isolates from the Same Patient. (A. Acosta-Serrano, Ed.) **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004018, 2015. Public Library of Science.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, 105 (2008) 1–9 Review.
- AMBROS, V. et al. A uniform system for microRNA annotation. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 9, n. 3, p. 277–279, 2003.
- AMBROS, V.; HORVITZ, H. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 226, n. 4673, p. 409–416, 1984.
- ANDRES-TERRE, M. et al. Integrated, Multi-cohort Analysis Identifies Conserved Transcriptional Signatures across Multiple Respiratory Viruses. **Immunity**, v. 43, n. 6, p. 1199–1211, 2015.
- ASANGANI, I. A. et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. **Oncogene**, v. 27, n. 15, p. 2128–2136, 2008.
- ATHAYDE, S. et al. Leishmania infantum and Leishmania braziliensis: Differences and Similarities to Evade the Innate Immune System. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. August, p. 1–10, 2016.
- BALTIMORE, D. et al. MicroRNAs : new regulators of immune cell development and function. **Nature Immunology**, v. 9, n. 8, p. 839–845, 2008.
- BARRETTO, A. C. et al. Características Epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma Região. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, p. 59–65, 1984.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, 2009.
- BENZ, F. et al. Circulating MicroRNAs as biomarkers for sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1, p. 78, 2016.

BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. May, p. 69, 2012.

BOGDAN, C. et al. Invasion, control and persistence of Leishmania parasites. **Current Opinion in Immunology**, v. 8, n. 4, p. 517–525, 1996.

BOUCHON, A. et al. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. **Nature**, Apr 26;410(6832):1103-7, 2001.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** , 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar.** 2017.

CHAKRABARTY; BHATTACHARYYA. Leishmania donovani restricts mitochondrial dynamics to enhance miRNP stability and target RNA repression in host macrophages. **Molecular Biology Cell**, v. 28, n. 15, p. 2091-2105, 2017.

CAI, P. et al. Circulating miRNAs: Potential novel biomarkers for hepatopathology progression and diagnosis of schistosomiasis japonica in two murine models. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1–18, 2015.

CAI, Y. et al. Toxoplasma gondii inhibits apoptosis via a novel STAT3-miR-17-92-Bim pathway in macrophages. **Cellular Signalling**, v. 26, n. 6, p. 1204–1212, 2014.

CARDOSO, T. M. et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in Leishmania braziliensis infection. **Infection and immunity**, v. 83, n. 3, p. 898–906, 2015.

CARNEIRO, M. W. et al. Gene Expression Profile of High IFN- γ Producers Stimulated with Leishmania braziliensis Identifies Genes Associated with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005116, 2016.

CHAKRABORTY. Modulation of macrophage mannose receptor affects the uptake of virulent and avirulent Leishmania donovani promastigotes. **The Journal of Parasitology**, v. 87, n. 5, p. 1023–1027, 2001.

CHANG, J. et al. miR-122, a Mammalian Liver-Specific microRNA, is Processed from hcr mRNA and May Downregulate the High Affinity Cationic Amino Acid Transporter CAT-1. **RNA Biology**, v. 1, n. 2, p. 106–113, 2014. Taylor & Francis.

CHEN, Z. et al. Tissue microRNA-21 expression predicted recurrence and poor survival in patients with colorectal cancer – A meta-analysis. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 2615–2624, 2016.

CHENDRIMADA, T. P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 740–744, 2005.

CHUANG, A. Y et al. NOD2 Expression is Regulated by microRNAs in Colonic Epithelial HCT116 Cells. , v. 1848, n. 1, p. 3047–3054, 2016.

CONCEIÇÃO, J. et al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004715, 2016.

- CONNELL, R. M. O. et al. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. **PNAS**, v. 104, n. 5, p. 1604–1609 2007.
- COSTA, J.M.L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 3–17, 2005.
- COSTA, J. M.L. et al. Comparative study of American tegumentary leishmaniasis between childhood and teenagers from the endemic areas Buriticupu, Maranhao and Corte de Pedra, Bahia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 279–288.
- DAWIT.G.; SIMENEW.K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 4, n. 2, 2013.
- DENG, X. et al. The Role of MicroRNAs in Autoimmune Diseases with Skin Involvement. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, n. 3, p. 153–165, 2015.
- DENLI, A. M. et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 231–235, 2004.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.
- DIMOPOULOU, I. et al. Early serum levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in septic patients: Correlation with monocyte gene expression. **Journal of Critical Care**, v. 27, n. 3, p. 294–300, 2012. Elsevier Inc.
- DU, T.; ZAMORE, P. D. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 21, p. 4645–4652, 2005.
- CREEMERS et al. Circulating MicroRNAs Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? **Circulation Research**, v. 110, n. 3, p. 483-495, 2012.
- EULALIO, A.; SCHULTE, L.; VOGEL, J. The mammalian microRNA response to bacterial infections. **RNA Biology**, v. 9, n. 6, p.742-750, 2012.
- FANG, H. et al. Up-regulated microRNA-155 expression is associated with poor prognosis in cervical cancer patients. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 64–69, 2016.
- FEIJÓ, D. et al. Dendritic Cells and Leishmania Infection : Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**, 3967436, 2016.
- FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E. A. et al. Down-Regulation of TLR and JAK/STAT Pathway Genes Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A Gene Expression Analysis in NK Cells from Patients Infected with *Leishmania mexicana*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004570, 2016.
- FILARDY, A. A. et al. Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- FRANK, B. et al. Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 404, 2015.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

GABRIELY, G. et al. MicroRNA 21 Promotes Glioma Invasion by Targeting Matrix Metalloproteinase Regulators. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 17, p. 5369–5380, 2008.

GEIGER, A. et al. Escaping deleterious immune response in their hosts: Lessons from trypanosomatids. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n.212, p. 1–21, 2016.

GERACI N.S. et al. Characterization of microRNA expression profiles in Leishmania - infected human phagocytes. **Parasite Immunology**, 37, (1) p.43–51 2015.

GHOSH, J et al. Leishmania donovani targets dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 3, p. 277–288, 2013.

GHOSH, J. et al. miRNomics-The bioinformatics of microRNA genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, n. 1, p. 6-11, 2007.

GIRARD, M. et al. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 4, p. 648–56, 2008.

GRACIAS, D. T. et al. The microRNA miR-155 controls CD8 + T cell responses by regulating interferon signaling. **Nature Immunology** , v. 14, n. 6, p.593-604, 2013.

GREEN, S. J. et al. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **Journal of immunology**, v. 145, n. 12, p. 4290–7, 1990.

GREGORY, D. J. et al. Comparison of the Effects of Leishmania major or Leishmania donovani Infection on Macrophage Gene Expression. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1186–1192, 2008.

GREGORY, R. I. et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. **Nature**, v. 432, n. 7014, p. 235–240, 2004.

GRIFFITHS-JONES, S. MiRBase: MicroRNA sequences and annotation. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 34, n.29, p. 1291–12910, 2010.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: Tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 1, p. 154–158, 2008.

GRIMALDI, G.; DAVID, J. R.; MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 36, n. 2, p. 270–287, 1987.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.

HACKL, M. et al. Circulating microRNAs as novel biomarkers for bone diseases – Complex signatures for multifactorial diseases? **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 432, p. 83–95, 2016.

- HAKE, S. MicroRNAs: A Role in Plant Development. **Current Biology**, v. 13, n. 21, p. 851–852, 2003.
- HAKIMI, M.; CANNELLA, D. Apicomplexan parasites and subversion of the host cell microRNA pathway. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 11, p. 481–486, 2011.
- HATA, A.; LIEBERMAN, J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. **Science Signaling**, v. 8, n. 368, p. 1–12, 2015.
- HE, L. et al. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 7, p. 522–31, 2004.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p.1191-9, 1999.
- HOY, A. M. et al. Parasite-Derived MicroRNAs in Host Serum As Novel Biomarkers of Helminth Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.
- HU, R. et al. miR-155 promotes T follicular helper cell accumulation during chronic, low-grade inflammation. **Immunity**, v. 41, n. 4, p. 605–19, 2014.
- HU, S. C.-S. et al. Neutrophil extracellular trap formation is increased in psoriasis and induces human β -defensin-2 production in epidermal keratinocytes. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 31119, 2016.
- HUANG, J. C. et al. Using expression profiling data to identify human microRNA targets. **Nature Methods**, v. 4, n. 12, p. 1045–1049, 2007.
- JANSSEN, H. L. A. et al. Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 18, p. 1685–1694, 2013.
- JIA, B. et al. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for the early detection of *Toxoplasma gondii* infection. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 433, 2014.
- JIANG, J.; EUN, J. L.; SCHMITTGEN, T. D. Increased expression of microRNA-155 in Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid cell lines. **Genes Chromosomes and Cancer**, v.45, n.1, p.103-6, 2006.
- JONES, T. C. et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **The Journal of infectious diseases**, v. 156, n. 1, p. 73–83, 1987.
- JOPLING, C. L. et al. Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a. **Science**, v. 1, n. 2005, p. 1577–1581, 2005.
- KATIYAR-AGARWAL, S.; JIN, H. Role of small RNAs in host-microbe interactions. **Annual review of phytopathology**, v. 48, p. 225–246, 2010.
- KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 287, 2017.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v.9, n.8, p.604-15, 2011.
- KELADA, S. et al. miR-182 and miR-10a Are Key Regulators of Treg Specialisation and Stability during Schistosome and *Leishmania*-associated Inflammation. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

- KIM, Y. K. et al. Functional links between clustered microRNAs: Suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 5, p. 1672–1681, 2009.
- KOLBERT, C. P. et al. Multi-Platform Analysis of MicroRNA Expression Measurements in RNA from Fresh Frozen and FFPE Tissues. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e52517, 2013.
- KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 1, p. 152–157, 2011.
- KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D68–D73, 2014.
- KROEMER, G. et al. Autophagy and the Integrated Stress Response. **Cell Press**, v.40, n.2, p.280-93, 2010.
- KUMAR, R. et al. MicroRNA 17-5p regulates autophagy in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages by targeting Mcl-1 and STAT3. **Cellular microbiology**, v.18 n.5, p.679-91, 2015.
- LAMONTE, G. et al. Translocation of sickle cell erythrocyte microRNAs into Plasmodium falciparum inhibits parasite translation and contributes to malaria resistance. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 2, p. 187–99, 2012.
- LEE, R. C. et al. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.
- LEE, Y. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, v. 425, n. 6956, p. 415–419, 2003.
- LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 20, p. 4051–4060, 2004.
- LEMAIRE, J. et al. MicroRNA Expression Profile in Human Macrophages in Response to Leishmania major Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, 2013.
- LI, N. et al. microRNAs : important regulators of stem cells. **Stem Cell Research & Therapy** v. 8, n.110, p. 1–7, 2017.
- LIN, S.-R. et al. MiR-193b Mediates CEBPD-Induced Cisplatin Sensitization Through Targeting ETS1 and Cyclin D1 in Human Urothelial Carcinoma Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1563–1573, 2017.
- LINDSAY, M. A. microRNAs and the immune response. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 4, p. 514–520, 2009.
- LIU, C. et al. MicroRNA-141 suppresses prostate cancer stem cells and metastasis by targeting a cohort of pro-metastasis genes. **Nature Communications**, v. 8, p. 14270, 2017.
- MANNUCCI, C. et al. Involvement of microRNAs in skin disorders: A literature review. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 38, n. 1, p. 9–15, 2017.

- MARETTI-MIRA, A. C. et al. Transcriptome Patterns from Primary Cutaneous *Leishmania braziliensis* Infections Associate with Eventual Development of Mucosal Disease in Humans. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, 2012.
- MARTINEZ, J. et al.. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. **Genes and Development**, v. 18, n. 9, p. 975–980, 2004.
- MASHIMA, R. Physiological roles of miR-155. **Immunology**, v. 155, n.145, p. 323–333, 2015.
- MASOTTI, A. et al. Computational challenges in miRNA target predictions: To be or not to be a true target? **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, 2009.
- MAUDET. MicroRNAs in the interaction between host and bacterial pathogens. **FEBS Letters**, p. 4140–4147, n.508, 2014.
- MEHTA, A.; BALTIMORE, D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 5, p. 279–294, 2016.
- MENG, F. et al. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. **Gastroenterology**, v. 133, n. 2, p. 647–658, 2007.
- MIAO, Y. et al. MicroRNA-130b targets PTEN to mediate drug resistance and proliferation of breast cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway. **Scientific Reports**, v. 7, n. July 2016, p. 41942, 2017.
- MILGER, K. et al. Identification of a plasma miRNA biomarker-signature for allergic asthma: a translational approach. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016.
- MILLAR, J. A. et al. *Coxiella burnetii* and *Leishmania mexicana* residing within similar parasitophorous vacuoles elicit disparate host responses, v. 6, n. 6 p. 1–8, 2015.
- MOORE, C.; PARRISH, J. K.; JEDLICKA, P. MiR-193b, downregulated in Ewing Sarcoma, targets the ErbB4 oncogene to inhibit anchorage-independent growth. **Plos One**, v. 12, n. 5, p. e0178028, 2017.
- MOSS, E. G.; LEE, R. C.; AMBROS, V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA. **Cell**, v. 88, n. 5, p. 637–646, 1997.
- MUKHERJEE, B. et al. Antimony-Resistant *Leishmania donovani* Exploits miR-466i To Deactivate Host MyD88 for Regulating IL-10/IL-12 Levels during Early Hours of Infection. **Journal of immunology**, v. 195, n. 6, p. 2731–42, 2015.
- MURAKAMI, Y. et al. Intervention of an inflammation amplifier, triggering receptor expressed on myeloid cells 1, for treatment of autoimmune arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 60, n. 6, p. 1615–1623, 2009.
- MURRAY, H. et al. Regulatory Actions of Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 in *Leishmania donovani* Infection in the Liver. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 7, p. 2318–2326, 2013.

- MUXEL S.M. et al. Leishmania (*Leishmania*) amazonensis induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44141, 2017.
- NAN, A. et al. A novel regulatory network among LncRpa, CircRar1, MiR-671 and apoptotic genes promotes lead-induced neuronal cell apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 4, p. 1671–1684, 2017.
- NI, Y. et al. Upregulation of a potential prognostic biomarker , miR-155 , enhances cell proliferation in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 117, n. 2, p. 227–233, 2014.
- NOVAIS, F. O. et al. Genomic Profiling of Human *Leishmania braziliensis* Lesions Identifies Transcriptional Modules Associated with Cutaneous Immunopathology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 1, p. 94–101, 2015.
- O'CONNELL, R. M. et al. microRNA Regulation of Inflammatory Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 30, n. 1, p. 295-312, 2012.
- O'CONNELL, R. M. et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 111–122, 2010.
- O'NEILL, L. A. et al. MicroRNAs: the fine-tuners of Toll-like receptor signalling. **Nature reviews. Immunology**, v. 11, n. 3, p. 163–175, 2011.
- OLIVEIRA, P. R. S. et al. IL2RA Genetic Variants Reduce IL-2 – Dependent Responses and Aggravate Human Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v.194, n. 6, p.2664-2672, 2015.
- OLIVIER, M. et al. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.
- ORVEDAHL, A.; LEVINE, B. Eating the enemy within : autophagy in infectious diseases. **Cell Death and Differentiation**, v.16, p. 57–69, 2009.
- PANDEY, R. K.; SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Differential expression of miRNA regulates T cell differentiation and plasticity during visceral leishmaniasis infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 206, 2016.
- PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**, v. 39, n. 7, p. 839–847, 2007.
- PELHAM, C. J.; PANDYA, A. N.; AGRAWAL, D. K. Triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family modulators: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 12, p. 1383–1395, 2014.
- PENG, Y.; CROCE, C. M. The role of MicroRNAs in human cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, n. 15004, 2016.
- POMPEU, M. L. et al. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. A quantitative approach. **Acta Tropica**, v. 48, n. 3, p. 185–193, 1991.

- RAISCH, J. et al. Role of microRNAs in the immune system , inflammation and cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 20, p. 2985–2996, 2013.
- VAN DER REE, M. H. et al. Plasma microRNA levels are associated with HBeAg status and treatment response in chronic hepatitis B patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v.215, n. 9, p.1421-1429, 2017.
- REGAZZI, R.; GUAY, C.; REGAZZI, R. Circulating microRNAs as novel biomarkers for diabetes mellitus. **Nature Review Endocrinology**, v. 9, n. 10, p. 513–52186, 2013.
- REINER, N. E. et al. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 138, n. 6, p. 1926–1932, 1987.
- REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, 2000.
- RUTNAM, Z. J.; YANG, B. B. The involvement of microRNAs in malignant transformation. **Histology and histopathology**, v. 27, n. 10, p. 1263–70, 2012.
- SCARIA, V. et al. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. **Retrovirology**, v. 3, p. 68, 2006.
- SCHENK, M. et al. TREM-1–expressing intestinal macrophages crucially amplify chronic inflammation in experimental colitis and inflammatory bowel diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 10, p. 3097-3106, 2007.
- SCHRANER, C. et al. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 12, p. e120-4, 2005.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Review Immunology**, v.16, n.9, p.581-92, 2016.
- SHIO, M. T. et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. **Journal of Tropical Medicine**, v.2012, p.1-14, 2011.
- SINGH, A. Ket al. MicroRNA expression profiling of *Leishmania donovani*-infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy. **Autophagy**, v. 12, n. 10, p. 1817–1831, 2016.
- SKALSKY, R. L.; CULLEN, B. R. Viruses, microRNAs, and host interactions. **Annual Review of Microbiology**, v. 64, p. 123–141, 2010.
- SONG, J. et al. miR-155 is involved in Alzheimer's disease by regulating T lymphocyte function. **Frontiers in Human Neuroscience**, v. 7, n. 61, p. 1–8, 2015.
- SONKOLY, E.; PIVARCSI, A. microRNAs in inflammation. **International reviews of immunology**, v. 28, n. Cmm, p. 535–561, 2009.
- SONKOLY, E. et al. MicroRNAs: Novel Regulators Involved in the Pathogenesis of Psoriasis? **PLoS ONE**, v. 2, n. 7, p. 1–8, 2007.
- STAEDEL, C.; DARFEUILLE, F. MicroRNAs and bacterial infection. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 1496–1507, 2013.

- SUN, X.-G. et al. Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in cerebrospinal fluid of subarachnoid hemorrhage patients. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 35, n. 7, p. 139–143, 2017.
- TAGANOV, K. D. NF- B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **PNAS**, v.3, n. 33 p. 12481–12486, 2006.
- TAMBYAH, P. A. et al. microRNAs in Circulation Are Altered in Response to Influenza A Virus Infection in Humans. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–11, 2013.
- TEIXEIRA, M. J. et al. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n.1, p. 32-40, 2006.
- TIWARI, N. et al. Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection: Delineation of their roles in macrophage dysfunction. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 314, p. 1–11, 2017.
- TOLOUEI, S. et al. TLR2 and TLR4 in Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania major*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.78, p. 478–484, 2013.
- TORRES-FERREIRA, J. et al. MiR-193b promoter methylation accurately detects prostate cancer in urine sediments and miR-34b/c or miR-129-2 promoter methylation define subsets of clinically aggressive tumors. **Molecular Cancer**, v. 16, n. 1, p. 26, 2017.
- VANNIER-SANTOS, M. A; MARTINY, A; SOUZA, W. DE. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.
- VERMA, J. K.; RASTOGI, R.; MUKHOPADHYAY, A. *Leishmania donovani* resides in modified early endosomes by upregulating Rab5a expression via the downregulation of miR-494. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 6, p. 1–25, 2017.
- WANG, H. et al. Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 73, n. 4, p. 850–854, 2012.
- WANG, T. et al. Identification and characterization of essential genes in the human genome. **Science**, v. 350, n. 6264, p. 1096–1101, 2015.
- WEBER, B. et al. TREM-1 deficiency can attenuate disease severity without affecting pathogen clearance. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 1, p. e1003900, 2014.
- WHO. Control of the Leishmaniases **WHO Technical Report Series**. 2010.
- WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 855–862, 1993.
- XIAO, C.; RAJEWSKY, K. MicroRNA Control in the Immune System : Basic Principles. **Cell** , v.2009, n.136, p. 26-36, 2008.
- XUE, X. et al. No miRNA were found in *Plasmodium* and the ones identified in erythrocytes could not be correlated with infection. **Malaria Journal**, v. 7, n. 1, p. 47, 2008.
- YAN, S. et al. NF-κB-induced microRNA-31 promotes epidermal hyperplasia by repressing protein phosphatase 6 in psoriasis. **Nature Communications**, v. 6, n. 47, p. 1-6, 2015.

YONG, S. L.; DUTTA, A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. **Genes and Development**, v. 21, n. 9, p. 1025–1030, 2007.

ZEINER, G. M. et al. Toxoplasma gondii infection specifically increases the levels of key host microRNAs. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. 1-8, 2010.

ZHU, H. T. et al. Serum microRNA profiles as diagnostic biomarkers for HBV-positive hepatocellular carcinoma. **Liver International**, n. 2016, p. 888–896, 2017.

ZHU, M. et al. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of mouse mammary tumor models identifies miRNA signatures associated with mammary tumor lineage. **Genome Biology**, v. 12, n. 8, p. R77, 2011.

ZHU, W. et al. Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: A case control study. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 393, 2011.

ZIBERT, J. R. et al. MicroRNAs and potential target interactions in psoriasis. **Journal of Dermatological Science**, v. 58, n. 3, p. 177–185, 2010.

Tabela Suplementar 1. 33 sondas de microRNAs identificadas na plataforma Illumina HT 12 v4 (GSE55664).

ILMN HT 12 V4	Illumina	Ensembl	Nome final (miR)	miRBase ID(s)	High Confidence	p-Valor corrigido	Fold Change
ILMN_1794927	LOC90925	MIR5195	MIR5195	hsa-mir-5195		1.00e-04	1.645
ILMN_1727315	DENN1A	MIR601	MIR601	hsa-mir-601		1.09e-11	2.789
ILMN_1784428	MGC57346	AC126544.1	AC126544.1			1.16e-07	-1.849
ILMN_1752249	FAM38A	MIR4722	MIR4722	hsa-mir-4722		1.17e-03	1.643
ILMN_1809208	KIAA1543	MIR6792	MIR6792	hsa-mir-6792		1.19e-09	-1.867
ILMN_3308265	MIR302C	MIR302B	MIR302C	hsa-mir-302b	hsa-mir-302b	1.27e-02	1.506
ILMN_1690703	C21ORF34	MIR99AHG	MIR99AHG	hsa-mir-99a	hsa-mir-99a	1.47e-09	-2.657
ILMN_3310371	MIR939	MIR939	MIR939	hsa-mir-939		1.61e-02	1.626
ILMN_1726153	MGC4677	MIR4435-2HG	MIR4435-2HG			1.90e-05	1.563
ILMN_1726597	FAM65B	AL512428.1	AL512428.1			2.10e-09	3.138
ILMN_1673409	MGC16121	MIR503HG	MIR503HG	hsa-mir-503	hsa-mir-503	2.18e-03	1.551
ILMN_3308295	MIR205	MIR205	MIR205	hsa-mir-205		2.29e-04	-2.395
ILMN_1804051	SNX8	MIR6836	MIR6836	hsa-mir-6836		2.38e-08	2.868
ILMN_1859127	HS190748	MIR193BHG	MIR193BHG	hsa-mir-193b	hsa-mir-193b	2.52e-04	-1.940
ILMN_3248910	MIR155HG	MIR155	MIR155	hsa-mir-155	hsa-mir-155	2.71e-09	2.888
ILMN_1652677	FAM89A	MIR1182	MIR1182	hsa-mir-1182		2.75e-04	-1.670
ILMN_1733861	ARHGEP11	MIR765	MIR765	hsa-mir-765		2.91e-05	1.579
ILMN_1712719	MAP7	AL023284.1	AL023284.1			2.99e-08	-2.713
ILMN_2285817	FAM89A	MIR1182	MIR1182	hsa-mir-1182		3.39e-04	-1.699
ILMN_1669113	ATF5	MIR4751	MIR4751	hsa-mir-4751		3.54e-11	3.811
ILMN_3243644	LOC100132564	AC079949.1	LOC100132564			3.61e-03	-3.227
ILMN_1798123	ELOVL1	MIR6734	MIR6734	hsa-mir-6734		4.36e-04	-1.627
ILMN_2103841	AIP	MIR6752	MIR6752	hsa-mir-6752		4.45e-06	1.931
ILMN_1805410	C15ORF48	MIR147B	MIR147B	hsa-mir-147b		5.05e-08	5.776
ILMN_1772991	CHPF2	MIR671	MIR671	hsa-mir-671	hsa-mir-671	5.34e-09	1.880
ILMN_3263974	KRT18P13	AL445531.1	AL445531.1			5.40e-06	-2.189
ILMN_2216815	MAP7	AL023284.1	AL023284.1			5.73e-08	-2.497
ILMN_1680757	LRRC26	MIR3621	MIR3621	hsa-mir-3621		5.74e-09	-3.918
ILMN_1794085	SAP51	MIR6804	MIR6804	hsa-mir-6804		6.09e-07	1.702
ILMN_1794612	UBA7	MIR5193	MIR5193	hsa-mir-5193		6.18e-12	2.809
ILMN_3273229	LOC100129781	MIR193BHG	MIR193BHG	hsa-mir-193b	hsa-mir-193b	6.19e-04	-1.908
ILMN_2249018	LOC389816	MIR3621	MIR3621	hsa-mir-3621		6.49e-09	-4.438
ILMN_2041222	FLJ40504	AC061975.1	AC061975.1			8.95e-06	-2.809

Tabla Suplementar 2. 44 sondas de microRNAs identificadas na plataforma Agilent SurePrint GE Human G3v2 (GSE63931).

AGNT Sureprint v2	Agilent	Ensembl	Nome (miR)	miRBase ID(s)	High Confidence	p-Valor corrigido	Fold Change
A_33_P3346807	LOC100131581	AC090954.1	AC090954.1			1.12e-02	-1.967
A_33_P3312682	REXO1	MIR1909	MIR1909	hsa-mir-1909		1.13e-03	1.780
A_23_P8013	HIST1H2BL	AL009179.1	AL009179.1			1.20e-03	1.861
A_33_P3307447		AL449212.1	AL449212.1			1.51e-02	-1.851
A_32_P62008	RPL10A	MIR7111	MIR7111	hsa-mir-7111		1.53e-03	-1.519
A_32_P137939	ACTB	AC006483.1	AC006483.1			1.55e-05	2.388
A_33_P3327058	ARHGEP2	MIR6738	MIR6738	hsa-mir-6738		1.69e-07	4.094
A_19_P00811954	MIRLET7BHG	MIRLET7BHG	MIRLET7BHG			1.74e-02	-1.699
A_33_P3549091	LOC100131347	AC091178.1	AC091178.1			1.74e-05	-5.823
A_33_P3279545	HIPK3	AL122015.1	AL122015.1			1.80e-02	-1.670
A_23_P65427	PSME2	MIR7703	MIR7703	hsa-mir-7703		1.92e-09	5.455
A_24_P911607	WNT7B	CR536603.1	CR536603.1			1.98e-05	-5.196
A_23_P426809	ARHGEP11	MIR765	MIR765	hsa-mir-765		2.11e-03	2.421
A_33_P3253501	HIST2H2BF	AC239868.1	AC239868.1			2.13e-02	1.627
A_23_P119337	ATF5	MIR4751	MIR4751	hsa-mir-4751		2.14e-07	4.997
A_33_P3399911		AC090954.1	AC090954.1			2.24e-04	-3.789
A_23_P394043	CAM5AP3	MIR6792	MIR6792	hsa-mir-6792		2.70e-03	-7.119
A_33_P3304707		AC244250.3	AC244250.3			2.74e-08	278.795
A_23_P48717	NPC2	MIR4709	MIR4709	hsa-mir-4709		2.90e-06	2.817
A_23_P325080	PTOV1	MIR4749	MIR4749	hsa-mir-4749		2.97e-02	-1.617
A_33_P3410895	POR	MIR4651	MIR4651	hsa-mir-4651		3.11e-02	2.570
A_33_P3412722	SNX8	MIR6836	MIR6836	hsa-mir-6836		3.23e-05	3.033
A_23_P251593	RPL10A	MIR7111	MIR7111	hsa-mir-7111		3.51e-03	-1.603
A_23_P428248	TTC21A	MIR6822	MIR6822	hsa-mir-6822		3.53e-02	1.551
A_23_P26557	C16orf59	MIR6768	MIR6768	hsa-mir-6768		3.68e-03	2.406
A_33_P3245858	LOC100131581	AC068587.2	AC068587.2			3.81e-04	-4.266
A_23_P23380	ELOVL1	MIR6734	MIR6734	hsa-mir-6734		3.87e-02	-1.977
A_33_P3336632	RN28S1	FP671120.7	FP671120.7			4.11e-02	-2.497
A_33_P3229083	HIST1H2BK	Z98744.1	Z98744.1			4.17e-03	1.783
A_23_P59069	HIST1H2BO	Z98744.3	Z98744.3			4.45e-04	1.784
A_33_P3229122	HIST1H2BF	AL031777.2	AL031777.2			4.68e-04	2.762
A_23_P77502	PKD1	MIR1225	MIR1225	hsa-mir-1225		5.24e-03	-2.030
A_23_P101342	ATG4D	MIR1238	MIR1238	hsa-mir-1238		5.63e-06	-3.321
A_33_P3353732	LOC100131581	MIR5481I	MIR5481I	hsa-mir-5481i-1		5.79e-04	-4.879
A_32_P108156	MIR155HG	MIR155	MIR155	hsa-mir-155	hsa-mir-155	6.34e-08	17.937
A_33_P3408529	PIEZO1	MIR5481I	MIR5481I	hsa-mir-5481i-2		6.42e-03	-3.711
A_23_P140738	MCM7	MIR4722	MIR4722	hsa-mir-4722		6.44e-02	1.835
A_23_P93690	MCM7	MIR93	MIR93	hsa-mir-93	hsa-mir-93	6.79e-03	1.554
A_33_P3229335	HIST3H2BB	AL139288.1	AL139288.1			7.29e-03	1.749
A_23_P26024	C15orf48	MIR147B	MIR147B	hsa-mir-147b		7.31e-03	2.495
A_23_P127584	NNMT	AP002518.1	AP002518.1			8.07e-07	7.595
A_33_P3364959		AC244250.1	AC244250.1			8.41e-08	551.991
A_23_P77135	ATPBD4	MIR3942	MIR3942	hsa-mir-3942		8.42e-04	-2.689
A_19_P00804859	MIR221	MIR221	MIR221	hsa-mir-221	hsa-mir-221	9.68e-03	-3.365

Tabela Suplementar 3. Identificação de microRNAs após o refinamento dos dados.

ILLUMINA				AGILENT			
ILMN HT 12 V4	miRNA	p-Valor corrigido	Fold Change	AGNT Sureprint v2	miRNA	p-Valor corrigido	Fold Change
ILMN_2249018	MIR3621	6.49e-09	-4,4383	A_23_P394043	MIR6792	2.70e-03	-7,119
ILMN_1690703	MIR99AHG	1.47e-09	-2,6574	A_33_P3353732	MIR5481I	5.79e-04	-4,879
ILMN_3308295	MIR205	2.29e-04	-2,3950	A_33_P3408529	MIR548I2	6.42e-03	-3,711
ILMN_1859127	MIR193B	2.52e-04	-1,9399	A_19_P00804859	MIR221	9.68e-03	-3,365
ILMN_1809208	MIR6792	1.19e-09	-1,8674	A_23_P101342	MIR1238	5.63e-06	-3,321
ILMN_2285817	MIR1182	3.39e-04	-1,6994	A_23_P771135	MIR3942	8.42e-04	-2,689
ILMN_1798123	MIR6734	4.36e-04	-1,6268	A_23_P77502	MIR1225	5.24e-03	-2,030
ILMN_1805410	MIR147B	5.05e-08	5,7757	A_23_P23380	MIR6734	3.87e-02	-1,977
ILMN_1669113	MIR4751	3.54e-11	3,8106	A_19_P00811954	MIRLET7BHG	1.74e-02	-1,699
ILMN_3248910	MIR155	2.71e-09	2,8879	A_23_P325080	MIR4749	2.97e-02	-1,617
ILMN_1804051	MIR6836	2.38e-08	2,8679	A_23_P251593	MIR7111	3.51e-03	-1,603
ILMN_1794612	MIR5193	6.18e-12	2,8089	A_32_P62008	MIR7111	1.53e-03	-1,519
ILMN_1727315	MIR601	1.09e-11	2,7895	A_33_P3301410	MIR6847	8.84e-02	1,550
ILMN_2103841	MIR6752	4.45e-06	1,9305	A_23_P428248	MIR6822	3.53e-02	1,551
ILMN_1772991	MIR671	5.34e-09	1,8803	A_23_P93690	MIR93	6.79e-03	1,554
ILMN_1794085	MIR6804	6.09e-07	1,7017	A_33_P3312682	MIR1909	1.13e-03	1,780
ILMN_1794927	MIR5195	1.00e-04	1,6449	A_23_P26557	MIR6768	3.68e-03	2,406
ILMN_1752249	MIR4722	1.17e-03	1,6426	A_23_P426809	MIR765	2.11e-03	2,421
ILMN_3310371	MIR939	1.61e-02	1,6256	A_23_P26024	MIR147B	7.31e-03	2,495
ILMN_1733861	MIR765	2.91e-05	1,5790	A_33_P3410895	MIR4651	3.11e-02	2,570
ILMN_1726153	MIR4435-2	1.90e-05	1,5627	A_23_P48717	MIR4709	2.90e-06	2,817
ILMN_1673409	MIR503	2.18e-03	1,5508	A_33_P3412722	MIR6836	3.23e-05	3,033
ILMN_3308265	MIR302C	1.27e-02	1,5063	A_33_P3327058	MIR6738	1.69e-07	4,094
				A_23_P119337	MIR4751	2.14e-07	4,997
				A_23_P65427	MIR7703	1.92e-09	5,455
				A_32_P108156	MIR155	6.34e-08	17,937

Tabela Suplementar 4. Conjuntos de dados brutos de vias canônicas relacionadas com LCL encontrados no Ingenuity Pathways Analysis (IPA).

Ingenuity Canonical Pathways (IPA) - GSE5664	P-Valor ajustado	Ingenuity Canonical Pathways (IPA) - GSE63931	P-Valor ajustado
<i>Th1 and Th2 Activation Pathway</i>	0.000000674	<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	0.00002478798
<i>Communication between Innate and Adaptive Immune Cells</i>	0.000001660	<i>Th1 and Th2 Activation Pathway</i>	0.00004957595
<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	0.000005395	<i>TREM1 Signaling</i>	0.00018502399
<i>Th1 Pathway</i>	0.0000006197	<i>Communication between Innate and Adaptive Immune Cells</i>	0.00019830381
<i>Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells</i>	0.000043158	<i>Th1 Pathway</i>	0.00021253676
<i>Dendritic Cell Maturation</i>	0.000049576	<i>Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells</i>	0.00024414063
<i>T Helper Cell Differentiation</i>	0.000065416	<i>Dendritic Cell Maturation</i>	0.00026166344
<i>Th2 Pathway</i>	0.000122070	<i>Th2 Pathway</i>	0.00042507352
<i>TREM1 Signaling</i>	0.000244141	<i>T Helper Cell Differentiation</i>	0.00069055397
<i>Antigen Presentation Pathway</i>	0.000322145	<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	0.00144973005
<i>Leukocyte Extravasation Signaling</i>	0.000793215	<i>Antigen Presentation Pathway</i>	0.00189971669
<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	0.001210652	<i>Phagosome Formation</i>	0.00248937623
<i>Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses</i>	0.001835005	<i>ICOS-COSL Signaling in T Helper Cells</i>	0.00567958015
<i>B Cell Development</i>	0.002107868	<i>Tee Kinase Signaling</i>	0.005833925488
<i>OX40 Signaling Pathway</i>	0.003544997	<i>Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses</i>	0.00723896923
<i>Complement System</i>	0.006524124	<i>Leukocyte Extravasation Signaling</i>	0.00916277304
<i>Interferon Signaling</i>	0.008200912	<i>LXR/RXR Activation</i>	0.01128069684
<i>CD28 Signaling in T Helper Cells</i>	0.008608634	<i>Interferon Signaling</i>	0.01698023223
<i>Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells</i>	0.009820417	<i>Natural Killer Cell Signaling</i>	0.01832554608
<i>ICOS-COSL Signaling in T Helper Cells</i>	0.010896435	<i>MSP-RON Signaling Pathway</i>	0.020065352965
<i>Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages</i>	0.015517070	<i>Role of JAK1 and JAK3 in γ Cytokine Signaling</i>	0.02076071585
<i>Cdc42 Signaling</i>	0.015733680	<i>CD28 Signaling in T Helper Cells</i>	0.02335701951
<i>IL-12 Signaling and Production in Macrophages</i>	0.016064279	<i>B Cell Development</i>	0.02434889311
<i>Natural Killer Cell Signaling</i>	0.018325546	<i>NF-κB Signaling</i>	0.02683016989
<i>Role of NFAT in Regulation of the Immune Response</i>	0.019777447	<i>IL-8 Signaling</i>	0.02895587693
<i>Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis</i>	0.024518253	<i>Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages</i>	0.03081977202
<i>Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F</i>	0.0246688791	<i>Inflammasome pathway</i>	0.04010705930
<i>LXR/RXR Activation</i>	0.031034140	<i>Role of NFAT in Regulation of the Immune Response</i>	0.04450158861
<i>Mur77 Signaling in T Lymphocytes</i>	0.033725882	<i>Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells</i>	0.04575267800
<i>Fcy Receptor-mediated Phagocytosis in Macrophages and Monocytes</i>	0.038473263	<i>OX40 Signaling Pathway</i>	0.04639136158
<i>Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors</i>	0.039830020	<i>HMGB1 Signaling</i>	0.04756614270
<i>PKCθ Signaling in T Lymphocytes</i>	0.040386026	<i>IL-12 Signaling and Production in Macrophages</i>	0.05751172816
<i>Inflammasome pathway</i>	0.058720172	<i>CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes</i>	0.06337246749
<i>IL-10 Signaling</i>	0.080772052	<i>IL-6 Signaling</i>	0.0729301149
<i>Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells</i>	0.081899588	<i>PKCθ Signaling in T Lymphocytes</i>	0.07641501736
<i>Role of JAK1 and JAK3 in γ Cytokine Signaling</i>	0.086569342	<i>IL-15 Signaling</i>	0.07694652583
<i>Tee Kinase Signaling</i>	0.087171479	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells</i>	0.07748173125
<i>CCRS Signaling in Macrophages</i>	0.096054699		
<i>MSP-RON Signaling Pathway</i>	0.099442060		
<i>IM1P Signaling in Neutrophils</i>	0.102237757		
<i>Phagosome Maturation</i>	0.104385990		

Tabela Suplementar 5. Identificação de vias canônicas significativamente moduladas relacionadas à resposta imune inata na LCL.

Illumina	p-valor	Moléculas	%
<i>Communication between Innate and Adaptive Immune Cells</i>	0,0000016604	9/22	41,00%
<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	0,0000053948	6/27	22,20%
<i>Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells</i>	0,0000431584	9/19	47,30%
<i>Dendritic Cell Maturation</i>	0,0000495760	7/26	27%
<i>TREM1 Signaling</i>	0,0002441406	3/16	18,70%
<i>Antigen Presentation Pathway</i>	0,0003221455	5/12	41,60%
<i>Leukocyte Extravasation Signaling</i>	0,0007932152	6/23	26%
<i>Agranulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	0,0012106521	1/19	5,20%
<i>Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses</i>	0,0018350054	6/18	33,30%
<i>Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells</i>	0,0098204170	1/9	11,10%
<i>Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages</i>	0,0155170702	7/17	41,10%
<i>Natural Killer Cell Signaling</i>	0,0183255461	5/13	38,46%
<i>LXR/RXR Activation</i>	0,0310341405	1/11	9,09%
Agilent			
<i>Granulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	0,0000247880	27/76	35,50%
<i>TREM1 Signaling</i>	0,0001850240	16/43	37,20%
<i>Communication between Innate and Adaptive Immune Cells</i>	0,0001983038	17/44	38,60%
<i>Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells</i>	0,0002441406	22/47	46,80%
<i>Dendritic Cell Maturation</i>	0,0002616634	32/82	39,00%
<i>Agranulocyte Adhesion and Diapedesis</i>	0,0014497300	20/66	30,30%
<i>Antigen Presentation Pathway</i>	0,0018997167	12/24	50,00%
<i>Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses</i>	0,0072389692	29/60	48,30%
<i>Leukocyte Extravasation Signaling</i>	0,0091627730	39/70	49,30%
<i>LXR/RXR Activation</i>	0,0112806968	15/45	33%
<i>Natural Killer Cell Signaling</i>	0,0183255461	25/51	49,00%
<i>Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages</i>	0,0308197720	34/72	47,20%
<i>Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells</i>	0,0457526780	4/22	18,10%

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação e caracterização funcional de microRNAs expressos nas lesões ativas de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.

Pesquisador: Natalia Machado Tavares

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 47120215.8.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.377.165

Apresentação do Projeto:

O projeto informa que as leishmanioses ainda estão entre as enfermidades mais negligenciadas no mundo, afetando as populações mais pobres, principalmente em países em desenvolvimento. Existe em todos os estados brasileiros e a Bahia está entre os líderes no país. Segundo o pesquisador, os esforços para identificar alterações na expressão de miRNAs após a infecção por Leishmania são poucos e abordam infecções experimentais, reforçando a necessidade de estudos para identificar o perfil de expressão de miRNAs em pacientes com LCL e, a partir destas informações aplica-las para validação in vitro. Deste modo, o pesquisador propõe ser este um estudo pioneiro na investigação sobre as alterações no perfil de expressão de miRNAs na infecção por esta espécie. Os estudos serão realizados no município de Jiquiriça (Bahia), onde as leishmanioses são endêmicas. Os voluntários serão provenientes do Centro de Referência em Leishmaniose do Vale do Jiquiriça, onde mensalmente são atendidos, cerca de 5 novos casos de LCL. Como critério de inclusão no estudo, serão considerados os indivíduos acometidos por LCL, maiores de idade e que consentem em doar sangue periférico e, fragmento do tecido obtido por biópsia

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.296-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3176-2327

Fax: (71)3176-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 1.377.165

Objetivo da Pesquisa:

Estudar o perfil e o papel de microRNAs expressos em biópsias de lesões de pacientes acometidos por leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania braziliensis*.

Identificar o perfil de expressão de microRNAs em biópsias obtidas de lesões de pacientes acometidos por leishmaniose cutânea localizada;

Selecionar de 3 microRNAs alvos de acordo com os níveis de expressão mais significativos e com as vias de regulação da resposta imune;

Validar in vitro do papel funcional dos microRNAs alvos durante a infecção por *L. braziliensis*.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são decorrentes da retirada de sangue e da realização da biópsia. Esta última será realizada pelos médicos que atendem os pacientes e que possuem experiência neste procedimento.

Benefícios: Contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos no tratamento desta enfermidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta relevância científica e, contempla informações relativas à acesso ao pesquisador e CEP e direitos fundamentais do sujeito de pesquisa (informação, privacidade, recusa e desistência). Foi classificado como pendente pelo CPq/GM/FIOCRUZ, através do parecer consubstanciado 1.358.066, tendo sido encaminhada lista de pendências, a qual foi respondida através de alterações no projeto e Termos de apresentação obrigatória e carta-resposta. A proponente atendeu as recomendações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Resposta às pendências, conforme a carta-resposta.

1. Apresentar a Cartas de anuência da instituição e do pesquisador Dr. Carlos Henrique Serezani.

RESPOSTA: A carta foi anexada. ATENDIDO.

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.296-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3176-2327

Fax: (71)3176-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 1.377.165

2. Responder no formulário de biorrepositório, quanto às Informações associadas às amostras, em relação à dissociação dos dados dos pacientes e ao acesso restrito.

RESPOSTA: O formulário preenchido foi anexado à lista de documentos obrigatórios. ATENDIDO.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em cumprimento da Res. 466/2012 e Norma Complementar vigente, enviar relatórios semestrais a partir desta data, e relatório final em até um mês após o término da vigência do projeto conforme cronograma aprovado neste protocolo. Caso haja inclusão de outra fonte de financiamento após esta aprovação, informar ao CEP como emenda ao protocolo incluindo o Termo de Outorga ou documento equivalente e realizando as alterações pertinentes na Folha de Rosto para indicar modificação do patrocinador principal.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_535063.pdf	09/12/2015 15:12:19		Aceito
Outros	CartaResposta3.pdf	09/12/2015 15:10:36	Natalia Machado Tavares	Aceito
Outros	SupportIUPUI.pdf	09/12/2015 15:06:56	Natalia Machado Tavares	Aceito
Outros	Formulario_Biorrepositorio.pdf	09/12/2015 15:01:43	Natalia Machado Tavares	Aceito
Outros	CartalSC.pdf	29/10/2015 13:26:05	Natalia Machado Tavares	Aceito
Outros	CV_Sandro.pdf	29/10/2015 13:24:52	Natalia Machado Tavares	Aceito
Outros	PendenciasCEP2.pdf	29/10/2015 13:23:24	Natalia Machado Tavares	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes.pdf	29/10/2015 13:20:02	Natalia Machado Tavares	Aceito
Outros	AtestadoCEPsigned.pdf	17/09/2015	Natalia Machado	Aceito

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.296-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3176-2327

Fax: (71)3176-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 1.377.165

Outros	AtestadoCEPsigned.pdf	12:24:28	Tavares	Aceito
Outros	AnuenciaControlesmiRNA.pdf	17/09/2015 12:14:43	Natalia Machado Tavares	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcontroles.pdf	17/09/2015 12:09:54	Natalia Machado Tavares	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetomiRNACEPfinal.pdf	17/09/2015 12:09:05	Natalia Machado Tavares	Aceito
Folha de Rosto	CEPNatalia.pdf	17/09/2015 10:04:09	Natalia Machado Tavares	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 20 de Dezembro de 2015

**Assinado por:
THEOLIS COSTA BARBOSA BESSA
(Coordenador)**

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121
Bairro: Candeal **CEP:** 40.296-710
UF: BA **Município:** SALVADOR
Telefone: (71)3176-2327 **Fax:** (71)3176-2285 **E-mail:** cep@bahia.fiocruz.br