



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**MIGUEL ÁNGEL CÁCERES DURÁN**

**MECANISMOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NA HANSENÍASE:  
EM BUSCA DE NOVOS BIOMARCADORES**

BELÉM – PA  
ABRIL, 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**MIGUEL ÁNGEL CÁCERES DURÁN**

**MECANISMOS GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS NA HANSENÍASE:  
EM BUSCA DE NOVOS BIOMARCADORES**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos Santos (UFPA)

BELÉM – PA  
ABRIL, 2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

C118m Cáceres Durán, Miguel Ángel.  
Mecanismos genéticos e epigenéticos na hanseníase: em busca  
de novos biomarcadores / Miguel Ángel Cáceres Durán. — 2023.  
157 f. : il. color.

Orientador(a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Ândrea Kely Campos Ribeiro dos  
Santos

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de  
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular, Belém, 2023.

1. Hanseníase. 2. microRNA. 3. Expressão diferencial. 4.  
Biomarcador. I. Título.

CDD 576.5

---

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

1. Universidade Federal do Pará (UFPA)
  - 1.1. Laboratório de Genética Humana e Médica (LGHM)
  - 1.2. Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO)
  - 1.3 Laboratório de Dermato-Imunologia (LDI)
2. Unidade de Referência Especializada Dr. Marcello Cândia

## **FONTES FINANCIADORAS**

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). CNPq/MCTI/FNDCT (407922/2021-0) e Bolsa de Doutorado (142091/2019-7)
2. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Rede de Pesquisa em Genômica Populacional Humana (RPGPH –Biologia Computacional: No. 3381/2013) – Edital 51/2013/CAPES (recursos financeiros para o projeto).
3. Unidade de Referência em Dermatologia Sanitária Marcello Cândia, New York Community Trust by Heiser Program for Research in Leprosy P15-000827, P16-000796, and P18-000250.
4. Fulbright Scholar to Brazil 2019-2020, VALE S.A. 27756/2019.

*A la memoria de Fernanda Rodríguez*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que me apoiaram durante a jornada de desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Foram anos de estudo, esforço e dedicação desafiadores por ser um imigrante em um país com língua, culinária e costumes distintos e por estar longe da família e de pessoas queridas. No entanto, acredito que nós, seres humanos, somos adaptáveis e capazes de aprender além de quaisquer circunstâncias. Felizmente, tive a sorte de contar com a companhia de pessoas maravilhosas que tornaram essa experiência ainda mais gratificante. Portanto, minha sincera gratidão a todos que contribuíram, de alguma forma, para o sucesso deste trabalho e para tornar minha estadia no Brasil mais agradável. Vocês foram fundamentais para que eu pudesse superar os desafios e alcançar todo o meu potencial.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Prof. Dra. Ândrea Ribeiro dos Santos, por ter aberto as portas do laboratório e permitido que eu realizasse minha tese sob sua supervisão. Além disso, seus ensinamentos, apoio e conselhos foram fundamentais ao longo de toda essa jornada.

À banca examinadora por suas valiosas contribuições, as quais foram fundamentais para aprimorar este trabalho. Suas observações e sugestões foram de extrema importância para tornar este trabalho ainda mais completo e relevante.

Aos meus pais, que mesmo estando distantes geograficamente, sempre me apoiaram e encorajaram em todos os meus esforços. Seu amor incondicional e apoio inabalável foram fundamentais para eu chegar até aqui. Este logro não teria sido possível sem vocês e eu serei eternamente grato pelo amor e suporte que me deram ao longo da minha vida.

Aos meus irmãos, pelo carinho e palavras de incentivo sempre que precisei. Agradeço imensamente pela presença constante em minha vida, pelos momentos de alegria compartilhados e pelo apoio incondicional em todas as circunstâncias

Aos meus amigos e colegas de laboratório, pelo apoio e carinho recebidos durante este período, especialmente a Caio, Cintia, Rebeca, Tati e Camille.

A Leandro e Giordano, por suas valiosas contribuições e compromisso com este trabalho. A sua participação foi fundamental para alcançar este resultado.

Aos meus grandes amigos venezuelanos Alex e Yetsenia, por se tornarem minha família e estarem sempre presentes quando mais precisei.

Ao laboratório de Genética Humana e Médica, por ter sido minha casa durante este tempo.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Biologia Celular, por tudo o que aprendi durante o doutorado.

Ao Laboratório de Dermato-Imunologia (LDI) e à Unidade de Referência Especializada Dr. Marcello Cândia pela coleta das amostras e dados dos participantes.

Às instituições que forneceram financiamento a este trabalho, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À Universidade Federal do Pará (UFPA) por me conceder a oportunidade de realizar meu doutorado nesta instituição de excelência acadêmica. Sinto-me honrado em fazer parte da maior universidade do Norte do país, e agradeço por todos os recursos e suporte fornecidos durante minha jornada acadêmica.

A Belém do Pará e ao Brasil, por terem se tornado minha casa durante todo esse tempo. Foi uma experiência maravilhosa que guardarei com muito carinho para sempre.

E ao meu país, Venezuela, mesmo enfrentando todas as adversidades, agradeço por continuar me dando a força necessária para seguir lutando por um futuro melhor. A esperança é a última que morre.

*¡Muchas gracias!*

## SUMARIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1. Hanseníase.....	12
1.2. Breve histórico da hanseníase.....	12
1.3. Aspectos clínicos gerais da hanseníase e susceptibilidade da infecção.....	14
1.4. Epidemiologia da hanseníase.....	15
1.5. Classificação da hanseníase.....	18
1.6. Diagnóstico da hanseníase.....	25
1.7. Etiologia da hanseníase.....	26
1.7.1. <i>Mycobacterium leprae</i> .....	26
1.7.2. Genoma do <i>M. leprae</i> .....	30
1.8. Aspectos genéticos e imunes da hanseníase.....	32
1.9. Resposta imune inata na hanseníase.....	37
1.10. Resposta imune adaptativa na hanseníase.....	41
1.11. Análises de expressão diferencial na busca de novos biomarcadores para a hanseníase.....	43
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	46
Objetivo geral.....	46
Objetivos específicos.....	46
<b>3. CAPÍTULO I</b> .....	47
<b>4. CAPÍTULO II</b> .....	58
<b>5. CAPÍTULO III</b> .....	104
<b>6. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	132
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	140
<b>8. ANEXOS</b> .....	147
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido.....	147
Artigos publicados durante o doutorado.....	149
Artigos aceitos para publicação.....	152
Artigos submetidos.....	153
Artigos em preparação.....	155
Prêmio Recibido.....	157



## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

**Figura 1.** Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2021.

**Figura 2.** Cortes histológicos do espectro da hanseníase.

**Figura 3.** Diagrama dos componentes básicos da parede celular micobacteriana. Complexo MAP.

**Figura 4.** Mapa circular do genoma do *M. leprae*.

**Figura 5.** Vias proeminentes que envolvem genes associados à hanseníase.

**Figura 6.** Possíveis causas para a polarização da hanseníase.

**Tabela 1.** Principais sistemas de classificação da hanseníase e sua correlação.

**Tabela 2.** Características das lesões na hanseníase polar.

**Tabela 3.** Classificação da hanseníase segundo a OMS.

**Tabela 4.** Classificação taxonômica do *M. leprae* e *M. lepromatosis*.

## RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que pode resultar em deficiências físicas e sociais permanentes se não for diagnosticada precocemente. Apesar de ser uma doença antiga, ainda constitui um importante problema de saúde pública em função do seu diagnóstico tardio. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar biomarcadores genéticos e epigenéticos atrelados ao seu processo de adoecimento. Para isso, realizou-se a validação de um conjunto de miRNAs e uma análise de transcriptoma em amostras de sangue de pacientes com hanseníase (LP) e de contatos domiciliares sem hanseníase (não-LP). As duas abordagens experimentais incluíram: (1) A validação de um conjunto de nove miRNAs por RT-qPCR, dos quais, cinco miRNAs (*hsa-miR-144-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-1291*, *hsa-miR-106b-5p* e *hsa-miR-16-5p*) apresentaram expressão diferencial significativa nas distintas comparações realizadas, com um AUC > 0,75. (2) Na segunda abordagem, verificou-se a expressão global de genes por meio de RNA-Seq. Os genes mais diferencialmente expressos foram selecionados para avaliação de biomarcadores potenciais para a hanseníase, dos quais foram escolhidos 10 genes hiperexpressos e nove hipoexpressos. Entre os hiperexpressos, seis genes: *SHISA7*, *MARCHF8*, *FOXO3*, *TSPAN5*, *WINK1* e *RPIA*, foram capazes de discriminar com alta precisão os grupos LP e não-LP, mostrando uma AUC  $\geq$  0,85. Da mesma forma, entre os hipoexpressos, dois genes: *RBBP4P2* e *PSAT1*, também foram capazes de discriminar com alta precisão os grupos LP e não-LP, com um AUC  $\geq$  0,85. As análises de enriquecimento revelaram vias e processos importantes no desenvolvimento da doença, como a apoptose, autofagia e mitofagia, que são mecanismos celulares importantes na defesa contra *M. leprae*. Quando os genes que participam destas vias estão desregulados, podem levar a uma resposta inflamatória exacerbada. Outra via significativamente identificada foi a da ferroptose, um processo de morte celular regulado pelo ferro que pode estar envolvida como um mecanismo de defesa contra o bacilo da hanseníase. Vias que compreendem a diferenciação de células mieloides, o metabolismo de vitamina D e outras relacionadas ao sistema imune também se mostraram enriquecidas. Em conclusão, este estudo fornece informações importantes sobre a relação entre o perfil genético e epigenético do hospedeiro e a patogênese da hanseníase. Novos genes e miRNAs foram identificados como possíveis biomarcadores de diagnóstico precoce, com capacidade de diferenciar pacientes doentes de contatos domiciliares, o que é essencial na prevenção da progressão da doença, assim como na redução de sua transmissão.

**Palavras chave:** hanseníase, microRNA, expressão diferencial, biomarcador.

## **ABSTRACT**

Leprosy is a chronic infectious disease that can result in permanent physical and social disabilities if not diagnosed early. Despite being an ancient disease still constitutes an important public health problem due to late diagnosis. Therefore, the aim of this study was to investigate genetic and epigenetic biomarkers linked to leprosy disease process. To achieve this a set of miRNAs was validated and a transcriptome analysis was performed in blood samples from leprosy patients (LP) and household contacts without leprosy (non-LP). The two experimental approaches included: (1) Validating a set of nine miRNAs by RT-qPCR, of which five miRNAs (*hsa-miR-144-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-1291*, *hsa-miR-106b-5p*, and *hsa-miR-16-5p*) showed significant differential expression in different comparisons with an AUC > 0.75. (2) In the second approach, global gene expression was assessed through RNA-Seq. The most differentially expressed genes were selected for potential biomarker evaluation for leprosy of which, 10 hyperexpressed and nine hypoexpressed genes were chosen. Among the hyperexpressed genes, six genes: *SHISA7*, *MARCHF8*, *FOXO3*, *TSPAN5*, *WINK1* and *RPIA* were able to discriminate the LP and non-LP groups with high accuracy, showing an AUC  $\geq$  0.85. Similarly, among the downregulated genes, two genes, *RBBP4P2* and *PSAT1* were also able to discriminate with high accuracy, between LP and non-LP groups with an AUC  $\geq$  0.85. Enrichment analyses revealed important pathways and processes within the disease development, such as apoptosis, autophagy, and mitophagy, which are important cellular mechanisms against *M. leprae*, but when regulated defectively can lead to an exacerbated inflammatory response. Another significantly identified pathway was ferroptosis, a cell death process regulated by iron that might be involved as a defensive mechanism against the leprosy bacillus. Pathways comprising myeloid cell differentiation, vitamin D metabolism and other immune-related pathways were also enriched. In conclusion, this study provides important insights into the correlation between the host's genetic and epigenetic profile and the pathogenesis of leprosy. New genes and miRNAs were identified as potential early diagnostic biomarkers with the ability to differentiate LP from household contacts. These findings are crucial for preventing disease progression and reducing its transmission.

**Keywords:** leprosy, microRNA, differential expression, biomarker

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Hanseníase**

A hanseníase é uma doença granulomatosa crônica que, embora curável, continua a ser um problema de saúde pública em várias partes do mundo e é considerada uma doença negligenciada. É uma infecção ocasionada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, a qual pode acometer principalmente os nervos periféricos e a pele. Outros órgãos como os olhos, mucosas do trato respiratório superior, ossos e testículos também podem ser afetados, produzindo um espectro fenotípico clínico típico da doença (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; PINHEIRO; SCHMITZ; SILVA, 2018; MI; LIU; ZHANG, 2020).

Normalmente quando não tratada em seus estágios iniciais, a hanseníase pode resultar em deformidades e incapacidade física nos pacientes (WHO, 2020). A frequência estimada desta infecção consiste em menos de 1:10.000 pessoas, na maioria das populações mundiais, e frequentemente está associada à pobreza. Hoje, o maior número de casos novos de hanseníase tem origem em regiões do sudeste da Ásia, nas Américas e na África. O tratamento da hanseníase está baseado em poliquimioterapia, correspondendo a tríade de rifampicina, dapsona e clofazimina, na maioria dos casos. Portanto, a detecção e o tratamento precoces podem ajudar a evitar muitas das complicações e sequelas incapacitantes (WHO, 2020).

### **1.2. Breve histórico da hanseníase**

A hanseníase parece ser uma das mais antigas doenças que acometem o homem, deixando marcas registradas e duradouras sobre religião, literatura e artes. Acredita-se que seja originária da Ásia ou da África, mas ainda hoje, pairam muitas dúvidas e informações conflitantes sobre a origem e a descrição da doença. Nos textos antigos sobre a hanseníase não se encontra uma descrição clara e precisa de sua prática clínica, possibilitando confundir

sua história e evolução em diferentes regiões do mundo ao longo do tempo (COUTO DAL SECCO et al., 2017; EIDT, 2004; SEHGAL, 2006).

Registros mostram que infecções por micobactérias afetam a humanidade por milênios. Restos humanos no Mediterrâneo Oriental datados de 9.000 anos contêm evidências de DNA de micobactérias tuberculosas, além disso, DNA micobacteriano foi recuperado de ossos doentes de um bisão preso no pergelissolo de cerca de 17.000 anos atrás. A primeira descrição médica da hanseníase foi encontrada em um tratado indiano, conhecido como Sushruta Samhita, datado de 600 a.C. Na China, a primeira descrição clínica consistente com a hanseníase data do século III a.C. (ROBBINS et al., 2009). Por outro lado, a doença foi importada pelo exército de Alexandre o Grande, da Índia, por volta de 327-326 a.C. Até o Velho e o Novo Testamento da Bíblia Sagrada mencionam a hanseníase em vários detalhes. A primeira evidência biológica de hanseníase encontrada em seres humanos foi identificada graças à paleontologia e à biologia molecular. O DNA de *M. leprae* foi isolado dos ossos de um esqueleto humano datado do século I a.C. e encontrado em uma sepultura perto de Jerusalém (MATHESON et al., 2009). No período, o atendimento médico era organizado em hospitais especiais chamados “leprosários” ou “lazaretos” construídos às margens dos rios. Foram organizados escritórios de serviços especiais e até serviços para o tratamento e isolamento das pessoas infectadas. Embora existam referências à hanseníase nos escritos egípcios antigos, gregos e romanos, o flagelo da hanseníase parecia atingir o pico na Idade Média à medida que a doença se espalhava pela Europa, onde foi endêmica desde o século XII ao século XIII, porém, atualmente encontra-se restrita a algumas regiões (FALUS, 2011; O’BRIEN; MALIK, 2017; REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).

No território das Américas, mais especificamente na América do Sul, os primeiros casos de hanseníase foram observados na Colômbia em indivíduos de origem espanhola, dessa forma, pode-se hipotetizar que esta doença chegou ao continente por meio dos colonizadores espanhóis e portugueses. Provavelmente, o maior fator de expansão da hanseníase nas Américas foi o tráfico de escravos. Acredita-se que franceses e africanos introduziram a doença

na América do Norte pelo estado da Flórida, mas os chineses a difundiram na costa do Pacífico. No Brasil, os primeiros casos foram relatados em 1600, na cidade do Rio de Janeiro, depois disso, a doença foi identificada em outras regiões brasileiras. Na atualidade, a hanseníase é incidente em todos os países sul-americanos, sendo o Brasil o que apresenta a prevalência mais alta desta doença (EIDT, 2004).

### **1.3. Aspectos clínicos gerais da hanseníase e susceptibilidade da infecção**

Ao longo da história, a hanseníase tem sido considerada contagiosa e indivíduos afetados eram isolados e muitas vezes banidos do convívio da sociedade. As pessoas temiam que apenas tocar uma pessoa infectada pudesse espalhar a doença. Hoje, cientistas sabem que a hanseníase precisa de um contato direto e prolongado para a sua transmissão, mas os mecanismos exatos de adoecimento e transmissão ainda precisam ser melhor compreendidos (SEHGAL, 2006).

A patogênese da hanseníase não foi definitivamente esclarecida. No entanto, alguns pontos são indiscutíveis: o agente etiológico é o *M. Leprae*; a doença se desenvolve em indivíduos suscetíveis, e em países endêmicos onde o ambiente (baixo nível socioeconômico, superlotação, entre outras características) desempenham um papel importante na transmissão da infecção. A hanseníase e suas manifestações clínicas são resultado de um processo interativo dinâmico entre o bacilo e a imunidade mediada por células (IMC) de indivíduos geneticamente predispostos (MI; LIU; ZHANG, 2020; NUNZI; MASSONE, 2012).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) indica que a hanseníase tem baixa patogenicidade, e que entre 90 e 95% das pessoas que contraem o *M. leprae* tem resistência natural e não desenvolvem a doença (BENNETT; PARKER; ROBSON, 2008; DA SILVA et al., 2018; WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015; WHO, 2017). Embora as razões exatas não sejam completamente compreendidas, uma série de fatores biológicos ou não, aumentam

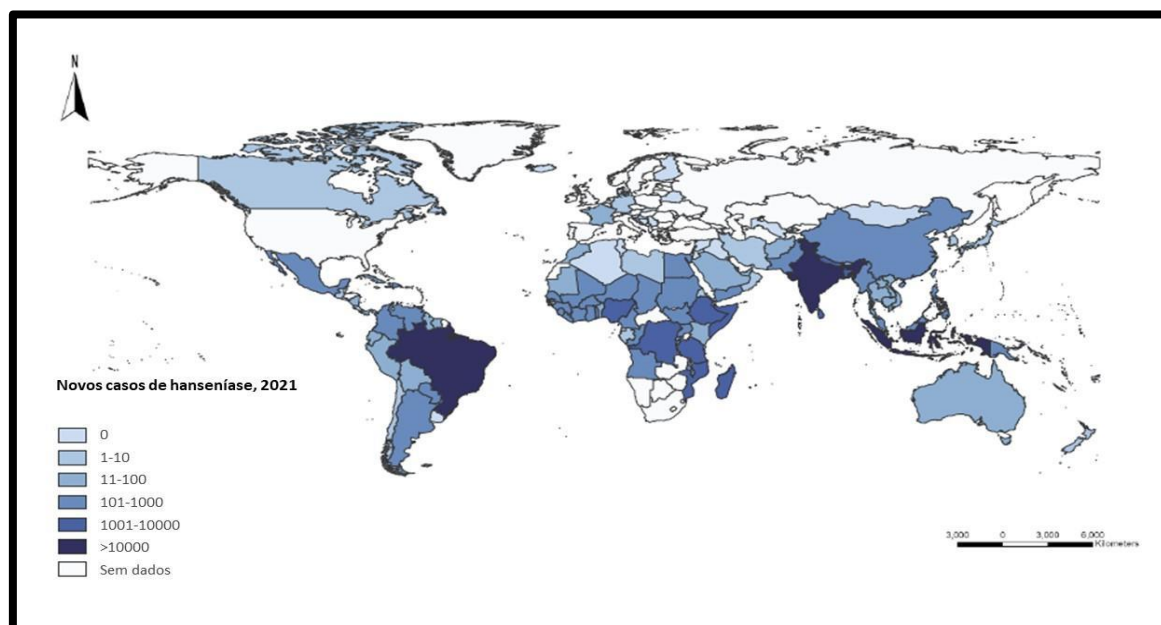
significativamente o risco de desenvolver hanseníase. Estes incluem pessoas em idade mais avançada que apresentam uma menor resposta imunológica e maior probabilidade de exposição ao bacilo, sexo masculino, contato com pessoas com a forma mais grave da doença (forma multibacilar -MB-), fatores genéticos e exposição por um período de tempo prolongado com um paciente (por exemplo, pessoas que habitam a mesma morada de um paciente com hanseníase – principalmente assintomáticos e/ou não diagnosticados) (WHO, 2017).

Os contatos domiciliares de pacientes com a forma MB têm demonstrado um risco maior de desenvolver hanseníase, de 5 a 8 vezes, que a população geral, enquanto os contatos dos pacientes PB, um risco 2 vezes maior. A má nutrição, os hábitos anti-higiênicos, as condições constitucionais (tuberculose, alcoolismo) parecem favorecer também a sua propagação. Aquelas que desenvolvem a doença, após um período de incubação de vários anos, podem ter apenas uma única lesão que muitas vezes se auto cura. Quando a auto cura não acontece, e quando a única lesão não é tratada, a doença pode progredir para os estágios paucibacilar (PB) ou MB. Aqueles que desenvolvem a doença demonstram uma baixa resposta IMC ao bacilo, e há evidências que sugerem que pode haver uma predisposição genética no hospedeiro (JACOBSON; KRAHENBUHL, 1999; NUNZI; MASSONE, 2012; 2018; SHEGAL, 2006;).

#### **1.4. Epidemiologia da hanseníase**

De acordo com dados divulgados pela OMS em 2022, a hanseníase continua sendo um problema global de saúde pública. Em 2021, foram detectados 140.594 novos casos em todo o mundo, com uma taxa de detecção de 17,83 por milhão de habitantes, representando um aumento de 10,2% em relação a 2020. No entanto, essa aparente diminuição de casos em 2020 pode estar relacionada à menor detecção durante a pandemia de COVID-19. Apenas 127 países forneceram dados epidemiológicos em 2020, enquanto em 2019, esse número foi de 160 países (WHO, 2021).

O Brasil, a Índia e a Indonésia relataram > 10.000 novos casos de hanseníase, enquanto 10 países relataram, cada um, de 1.001 a 10.000 novos casos, 36 países entre 101 e 1.000 casos, 58 países < 100 novos casos e 36 países notificaram 0 casos. A distribuição geográfica dos novos casos detectados em 2021 é apresentada no mapa da Figura 1 (WHO, 2022). Desse total de novos casos, 19.826 ocorreram na região das Américas, sendo notificados 18.318 novos casos só no Brasil, representando 92,4% dos casos na região. Do total de casos novos diagnosticados no país, 761 (3,84%) ocorreram em indivíduos menores de 15 anos. Quanto ao grau de incapacidade física, 1.737 (7,7%) dos novos casos avaliados no diagnóstico, apresentaram incapacidade de grau 2 (WHO, 2022).



**Figura 1.** Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2021. Fonte: WHO, 2022.

No entanto, os dados publicados pela OMS devem ser observados com bastante atenção e cautela, por causa da subnotificação existente. Salgado e colaboradores (2018) reportaram a presença de muitas lacunas na notificação de novos casos de hanseníase em diversas regiões do mundo, onde países de alta renda com sistemas de saúde bem estruturados relataram casos, ao passo que muitos países de baixa renda, onde geralmente existem condições favoráveis para hanseníase, não relataram. Especificamente, no Brasil,



foram revelados mais casos ocultos do que a taxa nacional de detecção de novos casos por meio diagnóstico de casos passivos, inclusive em áreas do país consideradas de baixa endemicidade. Essas descobertas ilustram a importância da vigilância ativa e da descoberta de casos entre os contactantes domiciliares com os recém diagnosticados. Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação do Brasil mostraram que cerca de 50% da população residente em 19 dos 27 estados está exposta a taxas elevadas ou hiperendêmicas da infecção, e, portanto, seria viável encontrar mais casos de hanseníase usando sistemas de informação geográfica e análise sorológica para a vigilância nessas áreas em específico. Deste modo, o número estimado de casos ocultos de hanseníase é provavelmente até oito vezes maior do que a prevalência na área (SALGADO et al, 2016; SALGADO et al, 2018).

Em 2019, o estado do Pará foi classificado como hiperendêmico para a doença tanto na população em geral, com uma taxa de 29,82 casos por 100.000 habitantes, quanto em crianças com menos de 15 anos, com uma taxa de 9,60 casos por 100.000 habitantes. Em 2020, a taxa na população em geral foi de 18,91 casos por 100.000 habitantes, e em crianças de 6,49 casos por 100.000 habitantes. No entanto, essa diminuição nas taxas pode estar relacionada aos efeitos do menor número de diagnósticos causados pela sobrecarga dos serviços de saúde e pelas restrições durante a pandemia da covid-19. O estado é considerado o terceiro com maior incidência da doença, e a taxa anual de detecção de casos em crianças é 3,26 vezes mais alta do que a média nacional, sugerindo que o diagnóstico de hanseníase em adultos no estado está sendo realizado tardiamente (Ministério da Saúde, 2023).

Diante desse cenário, o Brasil é classificado como um país de alta carga para a doença, ocupando o segundo lugar na relação de países com maior número de casos no mundo, estando atrás apenas da Índia (Ministério da Saúde, 2021).

## 1.5. Classificação da hanseníase

O diagnóstico de hanseníase é muitas vezes complicado e tem sido definido como as manifestações “espectrais” da doença, que se devem à variabilidade no tipo e força da resposta imune do corpo à bactéria. De modo geral, uma forte resposta IMC origina uma forma mais branda de manifestação, enquanto uma fraca resposta IMC leva a uma forma mais grave da doença. Esta apresentação espectral resultou no desenvolvimento de vários sistemas de classificação para a hanseníase, dois dos mais importantes sendo a classificação Ridley e Jopling e a classificação da OMS (Tabela 1) (KUMAR; UPRETY; DOGRA, 2017).

**Tabela 1.** Principais sistemas de classificação da hanseníase e sua correlação

Classificação	Espectro da Hanseníase				
<b>Sistema Ridley- Jopling</b>	Tuberculoide (TT)	Borderline Tuberculoide (BT)	Borderline- borderline (BB)	Borderline Lepromatosa (BL)	Lepromatosa (LL)
<b>Sistema OMS</b>	Paucibacilar/TT e maioria BT		Multibacilar/Alguns BT, BB, BL e LL		

Fonte: (KUMAR; UPRETY; DOGRA, 2017)

Em 1941, Rabello foi um dos primeiros a estabelecer o conceito de hanseníase polar. Indivíduos com hanseníase indeterminada (I), não tratados, evoluem para forma polar tuberculoide (T) ou para o polo lepromatoso (L), dependendo da resposta imune ao *M. leprae*. No Congresso de Hanseníase de 1953, que ocorreu em Madri, os critérios propostos por Rabello foram mantidos e um novo grupo de pacientes foi adicionado, nomeado por especialistas ingleses como borderline (B). Em países de língua portuguesa e espanhola, o termo borderline pode ser traduzido como dimórfico. Esse grupo clinicamente instável ao longo de seu curso é caracterizado por manifestações que não se encaixam nas formas polares. A melhor denominação seria interpolar, pois esses pacientes não se apresentam simplesmente

com as duas formas polares da doença. Clinicamente, eles podem apresentar características próximas aos pólos T ou L, e também às formas intermediárias (CRUZ et al., 2017).

Em 1966, Ridley e Jopling propuseram um sistema de classificação para a hanseníase que foi desenvolvida para fins de pesquisa e ainda é usada na prática clínica em muitas partes do mundo, incluindo os EUA e a maioria dos países europeus. Essa classificação baseia-se não apenas em características clínicas, mas também em histopatológicas, grau de IMC contra *M. leprae* e a carga bacteriana (KUMAR; UPRETY; DOGRA, 2017; RIDDLEY; JOPLING; 1966).

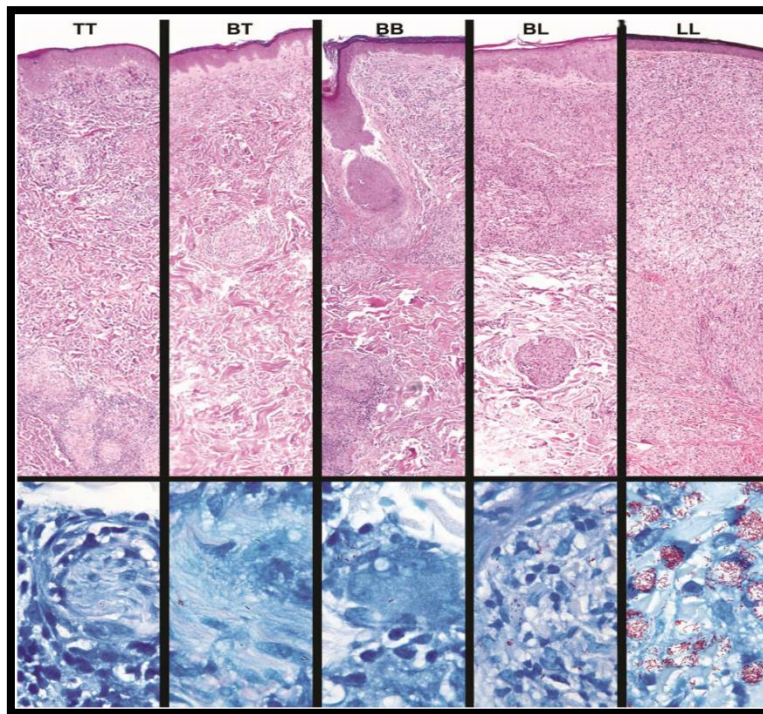
O sistema Ridley-Jopling classifica a hanseníase como uma doença espectral, onde apresenta de um lado, a hanseníase tuberculoide (TT), e do outro, a lepromatosa (LL) (Tabelas 1 e 2). Estas duas extremidades do espectro são consideradas clinicamente estáveis. Imunologicamente, uma forte resposta IMC se correlaciona com o tipo TT e uma fraca resposta IMC se correlaciona com o tipo LL da doença. Entre essas extremidades observa-se o espectro limítrofe clinicamente instável, que pode ser subdividido em borderline tuberculoide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL), dos quais o BB é o menos estável. A hanseníase frequentemente sofre alterações na apresentação clínica, dependendo do estado imunológico do indivíduo (RIDLEY; JOPLING, 1966).

A hanseníase tuberculoide (TT) se manifesta em indivíduos com uma intensa resposta IMC. Caracteriza-se pela presença de lesões únicas ou de pequeno porte, mostrando bordas bem definidas e elevadas (pápulas e placas) (Tabela 2). As lesões podem apresentar diminuição do suor, perda de pêlos do corpo e perda/diminuição da sensibilidade. Os nervos são geralmente muito engrossados na hanseníase TT, e menos nos grupos borderline. Vale ressaltar que, casos TT puros são raros (RIDLEY; JOPLING, 1966; VIRMOND; GRZYBOWSKI; VIRMOND, 2015). As biópsias dessas lesões revelam granulomas epitelioides bem desenvolvidos e bacilos álcool-ácido resistentes raros (Figura 2) (SCOLLARD, 2016).

**Tabela 2.** Características das lesões na hanseníase polar

Característica	Tuberculoide (TT)	Lepromatosa (LL)
Número de lesões	Poucas	Muitas (até mais de 100)
Distribuição	Assimétrica, em qualquer lugar	Simétrica, evitando áreas "poupadas"
Definição e clareza	Borda definida, hipopigmentada	Borda vaga, leve hipopigmentação
Anestesia	Precoce, marcada, definida, localizada para lesões cutâneas ou nervo periférico principal	Tardia, inicialmente leve, mal definida, mas extensa, sobre áreas do corpo "frias"
Perda autônoma	No início das lesões cutâneas e nervosas	Tardia, extensa quanto à anestesia
Alargamento do nervo	Marcado, em alguns nervos	Leve, mas difundida
Mucosa e sistêmica	Ausente	Comuns, reações severas tipo 2
Número de <i>M. Leprae</i>	Não detectável	Numerosos em todos os tecidos afetados

Fonte: RIDLEY; JOPLING; 1966; SCOTT et al., 2018; VIRMOND; GRZYBOWSKI; VIRMOND, 2015



**Figura 2.** Cortes histológicos do espectro da hanseníase. De esquerda para direita: TT, BT, BB, BL e LL. Os infiltrados granulomatosos epitelioides bem formados vistos em lesões TT tornam-se cada vez mais desorganizados em cada incremento sucessivo na escala BT, BB e BL, até se tornarem agregados completamente desorganizados de histiócitos espumosos, com apenas linfócitos ocasionais, em lesões LL. Fonte: SCOLLARD, 2016.

A hanseníase borderline tuberculoide (BT) apresenta lesões cutâneas semelhantes às observadas na TT, porém maiores e mais abundantes. As lesões podem variar de tamanho, forma e cor, no mesmo paciente. Pequenas lesões por satélite próximas às lesões maiores podem ser observadas, e a cor varia de hipocrômico para vermelho. Reações de reversão (RR), com envolvimento nervoso grave, são comuns na BT. As manchas de pele podem ser negativas ou positivas, e o índice bacteriológico geralmente não excede de 2+ (RIDLEY; JOPLING, 1966; VIRMOND; GRZYBOWSKI; VIRMOND, 2015).

A hanseníase borderline-borderline (BB) é altamente instável e rara. As lesões de pele conhecidas como "queijo suíço", são caracterizadas por placas infiltradas com pele normal aparente no centro e borda interna bem definida e bordas externas definidas incertas. Entre as lesões típicas, pode haver máculas, placas, pápulas, e nódulos, que geralmente são encontrados em combinação com as lesões típicas (RIDLEY; JOPLING, 1966; VIRMOND; GRZYBOWSKI; VIRMOND, 2015).

A hanseníase borderline lepromatosa (BL) exibe uma redução da resistência imunológica. As lesões são disseminadas e distribuídas simetricamente. Lesões maculares podem aumentar de tamanho para se tornarem eritematosas e infiltradas. As bordas destas são irregulares e invadem a pele normal. Podem aparecer lesões semelhantes a placas, pápulas e nódulos, simulando a forma LL. A RR e o eritema nodoso hansênico (ENH) são comuns nesses casos (RIDLEY; JOPLING, 1966; VIRMOND; GRZYBOWSKI; VIRMOND, 2015).

A hanseníase lepromatosa (LL) é causada por uma forte incapacidade do sistema imunológico em combater o bacilo. Se não tratada, a doença se espalha amplamente no paciente com repercussões sistêmicas (Tabela 2). Além das lesões cutâneas, olhos, nariz, ossos, testículos, baço, fígado e glândulas suprarrenais podem ser comprometidos. As lesões cutâneas são difusas com bordas imprecisas no tipo polar. No tipo subpolar, os pacientes apresentam alguma reação fraca aos bacilos e as máculas, nódulos e placas apresentam limites mais precisos, embora as lesões sejam generalizadas através da superfície corporal, exceto

pelo couro cabeludo, solas dos pés e outros locais com temperaturas mais altas (RIDLEY; JOPLING, 1966; VIRMOND; GRZYBOWSKI; VIRMOND, 2015).

Em 1998, o Comitê de Especialistas em Hanseníase da Organização Mundial da Saúde (OMS) determinou que as baciloscopias não eram essenciais para iniciar o tratamento, criando assim, para fins práticos e para aprovar critérios em todo o mundo, uma classificação rápida e concisa que qualquer médico poderia usar, sem equipamento diagnóstico ou risco de trabalho: (i) caso paucibacilar (PB) é definido com cinco (5) ou menos lesões cutâneas; e (ii) paciente que apresenta seis (6) ou mais lesões cutâneas é classificado como multibacilar (MB) (Tabela 3). Mesmo assim, diferentes estudos mostram que essa classificação tem algumas falhas, pois desta forma há um número não considerável de pacientes MB que são classificados como PB, o que acaba impactando no tratamento (EICHELMANN et al., 2012; GUPTA et al., 2012; RODRIGUES JUNIOR et al., 2016; PARKASH, 2009).

Segundo a OMS, um paciente com hanseníase pode apresentar uma ou mais das seguintes características:

- Lesões de pele hipopigmentadas com perda de sensação;
- Comprometimento ou envolvimento dos nervos periféricos como demonstrado por: perda definitiva de sensação; fraqueza das mãos e pés ou face; distúrbios da função autônoma, como anidrose (pele seca);
- Presença de deformidades visíveis;
- Sinais da doença com presença demonstrada de bacilos em esfregaço de pele ou confirmação histopatológica (WHO, 2017; WHO, 2020).

**Tabela 3.** Classificação da hanseníase segundo a OMS

<b>Classificação clínica</b>	<b>Paucibacilar (PB)</b>	<b>Multibacilar (MB)</b>
Número de lesões na pele	1 até 5	6 ou mais
Esfregaço de pele	Negativo em todos os locais	Positivo em qualquer local
Distribuição	Assimétrica	Mais simétrica
Perda de sensação	Perda de sensação definida	Perda de sensação extensiva
Dano nos nervos (perda de sensação ou fraqueza muscular)	-	Qualquer neurite, independentemente do número de lesões cutâneas

Fonte: WHO, 2017; WHO, 2020.

A maioria das pessoas com hanseníase não são infectantes, pois a micobactéria permanece intracelular. Pacientes com hanseníase LL, chamada também de virchowiana, entretanto, excretam bacilos da sua mucosa nasal e da pele e são infecciosos antes de iniciar o tratamento com poliquimioterapia. Os contatos desses pacientes apresentam, portanto, maior risco de desenvolver a doença. A magnitude desse risco depende da proximidade do contato, sendo os contatos domiciliares de maior risco. O risco de doença nos contatos também está relacionado à carga bacteriana do caso primário, sendo maior nos contatos dos casos MB do que nos PB (RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011).

A porta de entrada do patógeno no corpo ainda é debatida. Evidências sugerem duas principais portas de entrada, sendo estas a pele e o trato respiratório superior. A secreção nasal de pacientes não tratados com hanseníase ativa tem sido demonstrada com uma grande quantidade de bacilos. Portanto, a mucosa das vias aéreas superiores é considerada a principal rota de entrada. Estudos mostraram transmissão experimental de hanseníase via aerossóis em camundongos (CLAPASSON; CANATA, 2012). Outros estudos sugerem que a bactéria pode também entrar através da pele após inoculação acidental mediante vacinação ou realização de tatuagem (BRANAGAN et al., 2016; GHORPADE, 2002; SEGHAL, 1970).

O tempo exato de incubação é desconhecido e pode variar de alguns meses até mais de 20 anos (WHO, 2017). A porta de entrada do bacilo pode ser um dos fatores que influencia a posição do paciente no espectro da hanseníase. A inoculação transcutânea está correlacionada às formas hiperérgicas (TT, BT) com um período de incubação mais curto. A entrada do bacilo através da mucosa do trato respiratório superior está relacionada às formas hipoérgicas disseminadas (BB, BL, LL) com períodos de incubação mais longos (NUNZI; MASSONE, 2012).

Quanto aos aspectos histopatológicos da hanseníase, as lesões cutâneas de pacientes TT são caracterizadas por infiltrados inflamatórios contendo granulomas bem formados com macrófagos diferenciados, células epitelióides gigantes e predominância de células T CD4+ na lesão local, com nível de carga bacteriana baixa ou ausente. Os pacientes apresentam uma vigorosa resposta imune específica ao bacilo com perfil Th1, produção de interferon (IFN) - $\gamma$  e um teste de pele positivo (reação de Lepromin ou Mitsuda). No outro polo, pacientes LL apresentam várias lesões cutâneas com preponderância de células T CD8+ *in situ*, ausência de formação de granuloma, alta carga bacteriana e epiderme achatada. O número de bacilos de um paciente LL recém-diagnosticado pode chegar a 1.012 bactérias por grama de tecido. Os pacientes LL têm uma razão CD4:CD8 de aproximadamente 1:2 com uma resposta do tipo Th2 predominante e títulos altos de anticorpos anti-*M. leprae*. A IMC contra *M. leprae* é modesta ou ausente, caracterizada por teste de pele negativo e diminuição da proliferação de linfócitos (PINHEIRO et al., 2011).

Durante o desenvolvimento da doença, podem ocorrer episódios agudos de inflamação. As reações à hanseníase são um problema desafiador porque aumentam a morbidade, devido a danos nos nervos mesmo após a conclusão da poliquimioterapia. Elas são classificadas como reações de reversão ou de tipo I (RR) ou tipo II (ENH). As RR ocorrem em pacientes borderline (BT, BB e BL), enquanto o ENH ocorre nas formas BL e LL. As reações são interpretadas como uma mudança no estado imunológico dos pacientes. Quimioterapia, gravidez, infecções simultâneas e estresse emocional e físico têm sido identificados como



condições de predisposição às reações. Raramente requerem internação, ambos os tipos têm sido encontrados como sendo causa de inflamação nervosa (neurite), representando a causa primária de deformidades irreversíveis (PINHEIRO et al., 2011).

### **1.6. Diagnóstico da hanseníase**

Apesar de ser uma doença antiga, o diagnóstico da hanseníase, especialmente em seus estágios iniciais, ainda é um desafio (VISSCHEDIJK et al, 2000). Isso deve-se ao fato de que a identificação da doença levar em consideração, principalmente, as características clínico-epidemiológicas do paciente, baciloscopia e alterações de sensibilidade nos nervos periféricos. O teste de temperatura, dor e sensação ao toque é essencial para o diagnóstico clínico; no entanto, muitas lesões das formas clínicas MBs podem apresentar sensibilidade normal, ou dor durante as reações (BAHMANYAR et al., 2016; CRUZ et al., 2017; GELUK et al., 2012).

O reconhecimento clínico dos sinais sutis da hanseníase é de grande importância no seu diagnóstico, pois esse reconhecimento auxilia o diagnóstico na maioria dos casos. Sempre que possível, a baciloscopia deve ser feita, e os seguintes testes deveriam estar disponíveis: teste de histamina, teste de pilocarpina e histopatologia (CRUZ et al., 2017). Além disso, métodos mais atuais como a identificação do elemento repetitivo RLEP por meio de PCR em tempo real (qPCR) (CARVALHO et al., 2018; GOBBO et al., 2022) e a detecção de anticorpos anti-PGL-1 no sangue, auxiliam no diagnóstico da hanseníase (MOURA et al., 2008). A eletroneurografia, ultrassom ou ressonância magnética dos troncos nervosos podem ser úteis no diagnóstico de formas neurais (CRUZ et al., 2017). No entanto, testes laboratoriais são muitas vezes indisponíveis em regiões altamente endêmicas. Por outro lado, os esfregaços de raspado dérmico e a histopatologia são ferramentas investigativas simples, mas importantes no diagnóstico da hanseníase. O comitê de especialistas em hanseníase da OMS define o caso de hanseníase como um indivíduo que tem um dos seguintes sinais, mas que não recebeu uma completa poliquimioterapia para o tipo de hanseníase identificada:

- Uma perda definitiva de sensibilidade em uma mancha de pele pálida (hipopigmentada) ou avermelhada;
- Um nervo periférico espesso ou aumentado com perda de sensação e/ou fraqueza nos músculos fornecidos pelo nervo;
- A presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) em um esfregaço de raspado dérmico (KUMAR; UPRETY; DOGRA, 2017).

## **1.7. Etiologia da hanseníase**

### **1.7.1. *Mycobacterium leprae***

*M. leprae* é o agente etiológico da hanseníase. É um BAAR Gram-positivo, pertencente à ordem Actinomycetales e à família Mycobacteriaceae (Tabela 4) que se assemelha muito, em tamanho e forma, ao bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Até o ano de 2008, *M. leprae* era a única bactéria patogênica conhecida por invadir o sistema nervoso periférico, quando então foi descoberto o *Mycobacterium lepromatosis*, um bacilo que causa hanseníase lepromatosa difusa (HAN et al., 2008). Assim como o *M. leprae*, também é um BAAR, não cultivável e capaz de infectar nervos periféricos. *M. leprae* e *M. lepromatosis* divergiram de um ancestral comum após o evento massivo de inativação de genes descrito para *M. leprae* (HANSEN, 1875; HAN et al., 2008; HAN et al., 2009; MUNJAL et al., 2020). Por ter sido descrito por Hansen em 1873, considera-se o *M. leprae* como o primeiro patógeno bacteriano a ser associado a alguma doença humana (SINGH; COLE, 2011).

**Tabela 4.** Classificação taxonômica do *M. leprae* e *M. lepromatosis*

<b>Reino</b>	Monera
<b>Filo</b>	Actinobacteria
<b>Classe</b>	Actinobacteria
<b>Ordem</b>	Actinomycetales
<b>Família</b>	Mycobacteriaceae
<b>Gênero</b>	<i>Mycobacterium</i>
<b>Espécies</b>	<i>M. leprae</i> , <i>M. lepromatosis</i>

Os organismos podem ser identificados em biópsias coradas, esfregaços de secreções nasais ou, mais comumente, esfregaços de pele. Os bacilos estão ocasionalmente presentes em grandes aglomerados conhecidos como globos. Pensa-se que apenas os poucos organismos sólidos de coloração são viáveis, enquanto a grande maioria dos organismos, que mostram manchas irregulares e morfologia fragmentada, são inviáveis. A proporção de organismos com coloração sólida (conhecida como Índice Morfológico ou IM) é geralmente de 4-5% em pacientes com hanseníase LL não tratada (HANSEN, 1875; GILLIS, 2015; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; WALKER; WITHINGTON; LOCKWOOD, 2014).

O bacilo da hanseníase é um parasita intracelular obrigatório. É uma bactéria de crescimento lento, quando comparado com outras bactérias, precisando de 12,5 dias em média para se duplicar. A temperatura ideal para o seu crescimento está entre 27 e 30°C, daí sua predileção por áreas mais frias do corpo humano, como as pontas dos dedos, pele, mucosa nasal e nervos periféricos (JACOBSON; KRAHENBUHL, 1999; SEHGAL, 2006).

*M. leprae* é extremamente exigente em relação aos requisitos de crescimento e ainda deve ser cultivado com sucesso em meios artificiais. No entanto, é possível mantê-lo vivo em meio líquido ou em cultura de macrófagos, mas apenas por um curto período de tempo (CLAPASSON; CANATA, 2012). Para enfrentar esse problema, Shepard em 1960 estabeleceu

um modelo animal que consiste na multiplicação de bacilos nas patas de camundongos. Em 1971, W.E. Kirchheimer e E.E. Storrs conseguiram a disseminação do *M. leprae* em tatus de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) em cativeiro, e logo depois no tatu de sete bandas (*Dasypus hybridus*). Atualmente, *D. novemcinctus* é considerado a espécie de tatu mais apropriada para pesquisas em hanseníase. Algumas espécies de primatas (*Pan troglodytes*, *Cercocebus atys* e *Macaca fascicularis*) e tatus são suscetíveis à infecção por *M. leprae* e são naturalmente infectados (HOCKINGS et al., 2021; OLIVEIRA; DEPS; ANTUNES, 2019).

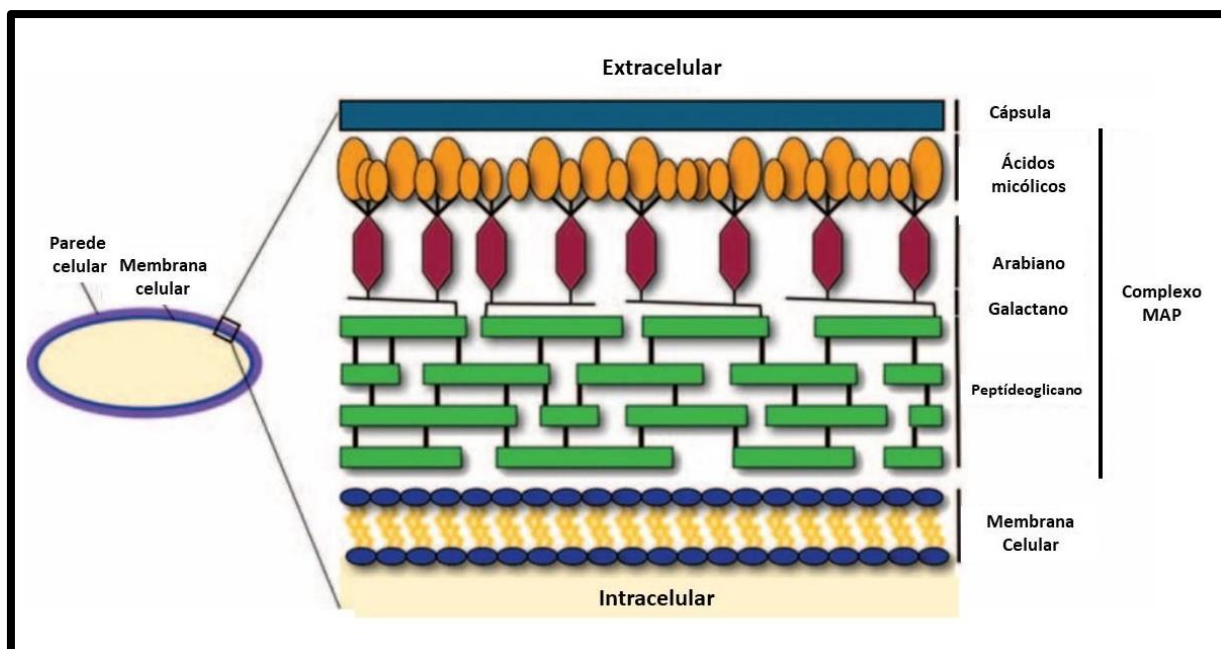
*Dasypus novemcinctus*, além de ser um hospedeiro natural de *M. leprae*, tornou-se a principal fonte do organismo para pesquisas imunológicas e bioquímicas. Isto se deve à baixa temperatura corporal do animal, a qual cria condições ideais de incubação para o bacilo (CONVIT; PINARDI, 1974; WALKER; WITHINGTON; LOCKWOOD, 2014).

Na região amazônica brasileira, no oeste do estado do Pará, considerada hiperendêmica para a hanseníase, Da Silva e colaboradores (2018), realizaram pesquisas tanto na população local, quanto em tatus que habitam na pequena cidade de Belterra. Conseguiram demonstrar que 65% das pessoas tinham algum contato com os tatus, por meio da caça, manipulação para preparo e posterior ingestão da carne, além de que a infecção por *M. leprae* em tatus nesta área atingia 62%. Adicionalmente, foi descoberto que os indivíduos que consumiam carne de tatu mais de uma vez por mês, apresentavam um título de anticorpos significativamente mais alto para o antígeno específico do *M. leprae*, PGL-1, e, conseqüentemente, um risco quase duas vezes maior de ser diagnosticado com a doença. Em vista disso, determinar a extensão da infecção nesses animais selvagens e aplicar o sequenciamento do genoma completo para identificar os tipos de cepas que circulam tanto em tatus quanto em populações humanas que interagem com estes é importante para esclarecer o risco relativo que reservatórios não humanos têm na transmissão desta (e talvez de outras) doença e podem ajudar a melhorar as estratégias de combate à hanseníase.

O bacilo *M. leprae* tem entre 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro, com lados paralelos e extremidades arredondadas. A parede celular da bactéria tem características

próprias da espécie, uma morfologia aberrante, presença de bandas de parede e de estruturas paracristalinas (DRAPER, 1983). A parede celular micobacteriana consiste em uma camada interna e uma camada externa que circundam a membrana plasmática. O compartimento externo consiste em lipídios e proteínas. Os lipídios são frequentemente associados com a parede celular, com alguns ácidos graxos de cadeia longa e curta complementando as cadeias curtas e longas encontradas na camada interna (HETT; RUBIN, 2008).

Essa parede é altamente complexa, contendo proteínas, glicolípídeos fenólicos, peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. Os ácidos micólicos são responsáveis pela manutenção de uma forma celular rígida e podem constituir até 60% do peso seco do organismo (Figura 3). Eles também tornam as bactérias resistentes a lesões químicas, protegendo assim as células contra antibióticos hidrofóbicos. É por causa desse revestimento ceroso que a bactéria ganha suas características hidrofóbicas. Adicionalmente, sua propriedade BAAR é mais fraca que a das demais espécies micobacterianas. Uma característica fundamental do *M. leprae* é sua habilidade em sobreviver e crescer dentro de macrófagos. Fatores de virulência como glicolípídeos fenólicos podem remover e, conseqüentemente, proteger o bacilo de formas tóxicas de oxigênio, enquanto o lipoarabinomanano é um potente repressor de certas funções imunológicas (SEHGAL, 2016; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).



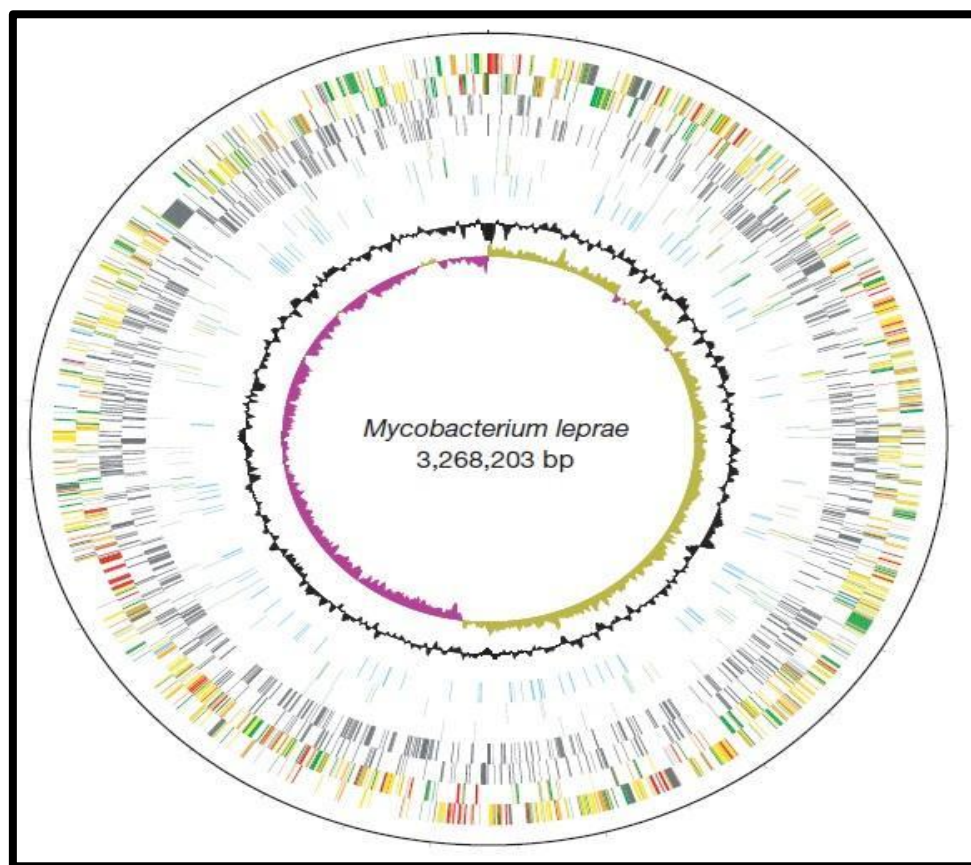
**Figura 3.** Diagrama dos componentes básicos da parede celular micobacteriana. Complexo MAP (micólico- arabinogalactano- peptídeoglicano). Fonte: HETT; RUBIN, 2008

### 1.7.2. Genoma do *M. leprae*

A sequência completa do genoma de *M. leprae* contém 3.268.203 pares de base (pb), e tem um teor médio de G+C de 57,8% (COLE et al., 2001). Esses valores são muito inferiores aos relatados para o genoma de *M. tuberculosis*, que compreende 4.000 genes, 4.411.532 pb e 65,6% G+C (COLE et al., 2001). A comparação do genoma de *M. leprae* com o de *M. tuberculosis* revelou que o bacilo da hanseníase sofreu extensa evolução reductiva resultando em perda funcional de aproximadamente 2.000 genes, quase metade de suas funções metabólicas e ausência de vias metabólicas inteiras que são funcionais em *M. tuberculosis* (PINHEIRO et al., 2011).

A partir da comparação das sequências do genoma e do proteoma de *M. leprae* e de *M. tuberculosis*, observou-se que apenas 49,5% do genoma de *M. leprae* contém genes

codificadores de proteínas e 27% contém pseudogenes reconhecíveis (quadros de leitura inativos com contrapartes funcionais no bacilo da tuberculose). Os 23,5% restantes do genoma não parecem ser codificadores e podem corresponder a sequências reguladoras e a remanescentes genéticos. A distribuição dos 1.116 pseudogenes é essencialmente aleatória (Figura 4) e, se forem excluídos, permanecem 1.604 genes potencialmente ativos, dos quais 1.439 são comuns a ambos os patógenos. (COLE et al., 2001).



**Figura 4.** Mapa circular do genoma do *M. leprae*. Mostra-se a posição e orientação dos genes conhecidos, pseudogenes e sequências repetitivas. Do lado de fora: círculos 1 e 2 (no sentido horário e anti-horário) nos genes - e +, respectivamente; círculos 3 e 4, pseudogenes; 5 e 6, genes específicos de *M. leprae*; 7, sequências repetidas; 8, conteúdo de G + C; 9, desvio G/C  $(G+C)/(G-C)$ . Fonte: COLE et al., 2001.

A dificuldade no cultivo *in vitro* de células de *M. leprae* pode resultar dos efeitos combinados da redução genética e mutações em várias áreas metabólicas. Mutações são encontradas em genes envolvidos na regulação (codificadores de repressores, ativadores, sistemas de dois componentes, serina-treonina-quinases e fosfatases), desintoxicação (genes que codificam peroxidases), reparo do DNA (genes *mutT*, *dnaQ*, *alkA*, *dinX* e *dinP*) e transporte ou efluxo de metabólitos, como aminoácidos (aa) (arginina, ornitina, D-alanina, D-serina e glicina), peptídeos, cátions (magnésio, níquel, mercúrio, amônio, íons ferrosos e férricos e potássio) e ânions (arsenato, sulfato e fosfato). Em geral, os pseudogenes são encontrados com mais frequência em vias degradativas, em vez de sintéticas. Os genes para a síntese da maioria das moléculas pequenas, como aa, purinas, pirimidinas e ácidos graxos, e para a síntese de macro-moléculas como ribossomos, aminoacil tRNAs, RNA e proteínas, estão razoavelmente intactos (VISSA; BRENNAN, 2001).

### **1.8. Aspectos genéticos e imunes da hanseníase**

Atualmente, sabe-se que somente a exposição ao *M. leprae* não é suficiente para causar hanseníase, e apenas uma proporção de pessoas expostas ao bacilo eventualmente desenvolvem a doença. De fato, é provável que uma combinação de fatores ambientais, carga de patógenos, *background* genético e a resposta imune do hospedeiro, seja necessária na patogênese da hanseníase (FAVA; DALLMANN-SAUER; SCHURR, 2020; MI; LIU; ZHANG, 2020).

O reduzido tamanho do genoma do *M. leprae* levou a uma uniformidade da cepa, sugerindo que o *background* genético do hospedeiro é um aspecto central da susceptibilidade à hanseníase, sendo identificada uma série de fatores genéticos de risco. As análises de ligação seguidas por clonagem posicional e abordagens de genes candidatos identificaram vários genes associados à doença. No entanto, foi o avanço das técnicas moleculares que permitiram abranger todo o genoma de milhares de indivíduos, aumentando o número de genes e



variantes identificadas como fatores de risco à hanseníase (FAVA; DALLMANN-SAUER; SCHURR, 2020).

Os estudos de Chakravarti e Vogel (1973), mostraram que a concordância da hanseníase e das formas clínicas resultantes era maior entre gêmeos monozigóticos geneticamente idênticos (60-85%), em comparação com gêmeos dizigóticos (5-20%). Estudos adicionais demonstraram que agrupamentos familiares da doença, e análises de segregação, apoiaram um modelo poligênico de herança que inclui genes de susceptibilidade principais. Esses achados enfatizaram a indispensabilidade da genética do patógeno e do hospedeiro para a patogênese da hanseníase (ABEL; DEMENAI, 1988; CHAKRAVARTTI; VOGEL, 1973; SHEPARD, 1960; SHIELDS; RUSSELL; PERICAK-VANCER, 1987;).

Análises de segregação complexas detectaram repetidamente evidências de um componente genético e concluíram consistentemente a existência de um ou mais genes principais para a hanseníase e seus subtipos. No entanto, não surgiu um consenso sobre o modo de herança, tornando a hanseníase menos adequada para a análise de ligação baseada em modelo (ALTER et al., 2011).

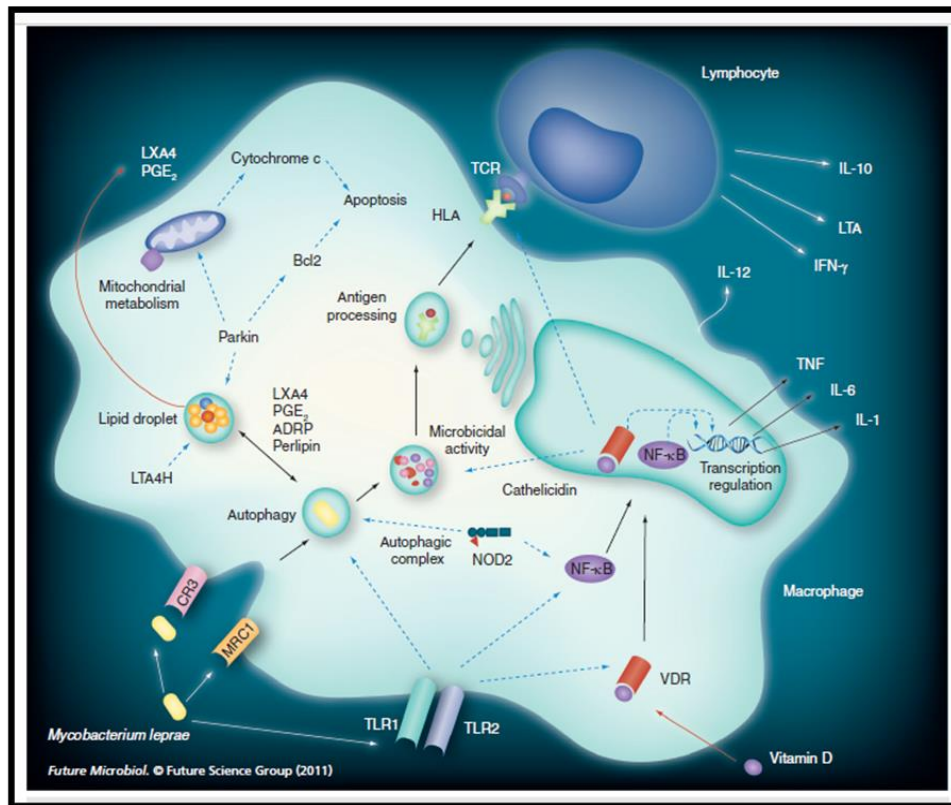
Existem vários genes e regiões do genoma humano que foram associados à suscetibilidade à hanseníase, bem como, de formas mais graves da doença. Alelos na região dos genes *PARK2* e *PACRG* do cromossomo 6 foram associados à suscetibilidade da doença em populações vietnamitas e brasileiras. Ambos genes são amplamente expressos em tecidos humanos, incluindo tecidos imunológicos, com níveis de expressão vagamente correlacionados. *PARK2* é uma ligase E3, e acredita-se que pode estar relacionada à regulação da imunidade inata (MIRA et al., 2004).

A forma ativa da vitamina D (hormônio), 1,25 dihidroxyvitamina D3 (1,25D3), não só regula o cálcio e o metabolismo ósseo, mas também tem um papel imunoregulatório mediado através da ligação ao receptor de vitamina D (VDR) em monócitos, macrófagos e linfócitos ativado. Estudos demonstraram que os homozigotos que expressavam diferentes alelos do

gene *VDR* estavam associados à hanseníase TT ou LL (ROY et al., 1999). Há evidências de metabolismo anormal no sistema endócrino da vitamina D em pacientes com hanseníase, que apresentam, geralmente, deformidades ósseas. Fatores genéticos, como o *VDR*, a região do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), cromossomo 20, receptores *toll-like* (TLRs), a proteína 1 associada à resistência natural do macrófago (NRAMP1), o domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo 2 (*NOD2*), o gene regulador de fosfato com homologias às endopeptidases no cromossomo X (*PHEX*) e o receptor do fator de crescimento da tirosina quinase ErbB-2, contribuem tanto para o status da vitamina D quanto para a hanseníase (LU'O'NG; HOÀNG NGUYỄN, 2012).

O gene *VDR* está localizado na região 12q13.11. O receptor é um polipeptídeo intracelular que se liga ao metabólito ativo da vitamina D, e quando ativado, atua como um fator de transcrição para vários genes envolvidos na imunomodulação e outros processos genômicos e fisiológicos importantes. Então, a vitamina D é um regulador direto e indireto do sistema imunológico (CARDOSO et al., 2011; PEPINELI et al., 2019).

O primeiro nível de interação e reconhecimento do *M. leprae* pelas células hospedeiras são os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), TLRs e NOD2, e os receptores associados à adesão e entrada do *M. leprae* nas células de Schwann e macrófagos (Receptor de manose - MRC1-, laminina  $\alpha 2$ , receptor do complemento) (Figura 5). Variações genéticas neles podem tornar os hospedeiros naturalmente resistentes, simplesmente modulando a ativação por meio de TLRs ou bloqueando/diminuindo a taxa de captação de bacilos pelas células. Assim, espera-se que indivíduos suscetíveis fagocitem o *M. leprae*, evitando os mecanismos contra as micobactérias e infectando a célula com sucesso (CARDOSO et al., 2011).



**Figura 5.** Vias proeminentes que envolvem genes associados à hanseníase. *M. leprae* pode ser reconhecido preferencialmente por PRRs, como os TLR ou NOD2, que ativam macrófagos. Além disso, MRC1 (entre outros, como CR3) medeia a fagocitose, regulando a captação de bacilos. Paralelamente, TLR1/2 podem induzir uma resposta inflamatória e antimicrobiana, ativando o NF- $\kappa$ B que, por sua vez, regula a transcrição de genes importantes no controle da infecção. TLR1/2 também aumentam a expressão de VDR, induzindo (junto com NF- $\kappa$ B) a expressão de genes associados à resposta imune-inflamatória (TNF, IL-1, IL-6, IL-12 e HLA) e a atividade microbicida de macrófagos. Variações do *LTA4H* resultam em níveis mais elevados do mediador anti-inflamatório lipoxina A4. Outros mediadores (*ADRP*, perilipina e *PGE2*) são hiperexpressos, o que é consistente com a inibição da autofagia e inflamação. Parkin (*PRK*) participa na regulação da formação de gotículas de lipídios, bem como em vias de autofagia e apoptóticas. Além disso, a hipomodulação em genes-chave nesse processo, como *HLA*, *TNF*, *LTA*, *IFNG* e *IL-10*, pode evoluir para um estado sem resposta que leva à infecção por *M. leprae* e posteriormente para a progressão da doença. As setas azuis pontilhadas correspondem às vias de ativação, enquanto as setas pretas identificam as interações ou translocações de proteínas. Fonte: CARDOSO et al., 2011.

No ano de 2009 foi publicado o primeiro estudo de associação genômica (GWAS) onde um total de 491.883 polimorfismos de nucleotídeo simples (SNPs) de 706 pacientes (PB e MB) e 1.225 controles foram avaliados, achando uma associação significativa entre SNPs nos genes *CCDC122*, *C13orf31*, *NOD2*, *TNFSF15*, *HLA-DR* e *RIPK2* e uma tendência para uma associação com um SNP em *LRRK2*. As associações entre os SNPs em *C13orf31*, *LRRK2*, *NOD2* e *RIPK2* e a hanseníase MB foram mais fortes do que as associações entre esses SNPs e a hanseníase PB (ZHANG et al., 2009).

O papel do *NOD2* na resposta imune à hanseníase foi confirmado funcionalmente por experimentos baseados em células. No monócito, o reconhecimento do *NOD2* poderia induzir a expressão da IL-32, que regula a diferenciação do monócito ao CD1b+DC. Mas o conhecimento sobre o efeito das variantes em função do *NOD2* ainda não está esclarecido na hanseníase (MI; LIU; ZHANG, 2020).

Os PRRs *NOD1* e *NOD2* também ativam o gene *RIPK2* (Serina/treonina-proteína quinase 2 de interação com receptor). *RIPK2*, localizado no braço longo do cromossomo 8 (8q21), é essencial na sinalização através dos TLRs. Além disso, a interação entre a *RIPK2* e *NOD2* melhora a atividade NF- $\kappa$ B tornando-o um importante ator na resposta imune celular. Variantes do gene da quinase rica em leucina de repetição 2 (*LRRK2*), localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q12), estão documentados como uma causa comum para a doença de Parkinson, doenças inflamatórias e infecções microbianas (MARCINEK et al., 2013).

O estudo da associação de Zhang y colaboradores (2009) mostrou que, dos quatro SNPs no locus *NOD2*, dois SNPs (rs9302752 e rs7194886) estão mais fortemente associados à hanseníase. Todas as variantes genéticas implicadas, com a possível exceção as do *LRRK2*, parecem conferir suscetibilidade tanto às formas MB quanto às PB da hanseníase, indicando mecanismos compartilhados subjacentes ao desenvolvimento dessas duas formas clínicas da doença. No entanto, outras variantes genéticas parecem estar mais fortemente associadas à forma MB da doença do que a forma PB, indicando uma associação entre variantes no locus *LRRK2* apenas com a forma MB.

*TNFSF15*, um membro da família TNF (fator de necrose tumoral), é expresso em macrófagos e células T; e liga um receptor da família TNF (expresso principalmente em células T) que media a mudança das células Th1 para as células Th2 (ZHANG et al., 2009; MI; LIU; ZHANG, 2020). Variantes de *TNFSF15* e de *NOD2* estão associadas à doença de Crohn e estão ligadas à produção alterada de interleucina (IL)-10 e alteração Th1-Th2. Portanto, é ainda mais notável que a hanseníase e a doença de Crohn tenham características imunológicas comuns, incluindo uma resposta de células Th1 com formação de granuloma. Além disso, a infecção micobacteriana foi descrita como um fator de risco para a doença de Crohn (ZHANG et al., 2009).

Os genes *HLA* desempenham papéis chave na apresentação de antígenos às células T e são indispensáveis para as respostas imunes adaptativas. Variantes de genes *HLA*, *HLA-DRB1* em particular, têm sido associadas à hanseníase. Foi observada também associação com hanseníase na região do MHC (SNP rs602875, ao lado do *HLADRB1*), embora não foi observada associação da doença com outros loci de "risco" relatados anteriormente: *PARK2-PACRG*, *LTA*, e um locus no cromossomo 10p13. Foi achada também a associação da doença com o locus *HLA-DR-DQ* (ZHANG et al., 2009).

### **1.9. Resposta imune inata na hanseníase**

*M. leprae* invade e sobrevive dentro de macrófagos, células dendríticas e células de Schwann. A entrada na célula hospedeira é o primeiro passo no ciclo de vida intracelular de *M. leprae*, que é alcançado através de vários mecanismos diferentes. Em particular, o glicolípido fenólico 1 (PGL-1) expresso na parede celular de *M. leprae* é reconhecido por complemento, e o receptor complementar (CR) 1, CR 3 e CR 4 auxiliam na fagocitose dos bacilos (JIN; AHN; AN, 2018). O PGL-1 foi identificado como um importante antígeno e fator de virulência, que também se mostrou uma molécula diagnóstica promissora por induzir a produção de anticorpos da classe de imunoglobulina (Ig) M. Curiosamente, a presença de lipídios e açúcares

na parede celular também induz um aumento na fagocitose, tanto por macrófagos, quanto por outros tipos de células. Além disso, a presença do PGL-1 interagindo com macrófagos residentes é capaz de levar à produção de óxido nítrico, causando danos em nervos periféricos característicos de pacientes com hanseníase. Foi demonstrada também a capacidade do *M. leprae* de induzir a produção de mediadores oxidativos e seus produtos, peroxinitrito e nitrotirosina (PRATA et al., 2019).

As células hospedeiras reconhecem muitos patógenos através do reconhecimento geral de padrões moleculares; contudo, o complemento e os TLRs expressos em macrófagos e células dendríticas são importantes para o reconhecimento de patógenos microbianos, incluindo os micobacterianos (NATH; SAINI; VALLURI, 2015).

Foi demonstrado que os macrófagos são células fundamentais para determinar o resultado da doença. Lesões cutâneas de pacientes com a forma PB apresentam predominância de macrófagos com fenótipo pró-inflamatório (M1), enquanto lesões cutâneas de pacientes MB apresentam predomínio de macrófagos anti-inflamatórios (M2). Além disso, a autofagia é responsável pelo controle da carga bacilar em macrófagos PB e que o bloqueio da autofagia está envolvido no aparecimento de episódios reacionais inflamatórios agudos em células MB (PRATA et al., 2019).

Embora a polarização diferencial dos macrófagos nas lesões da hanseníase seja bem caracterizada, os mecanismos intrínsecos da divergência dos macrófagos nas lesões da hanseníase são amplamente desconhecidos. A IL-10, uma citocina chave presente em lesões LL, mostrou induzir o processo de fagocitose em macrófagos derivados de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), enquanto a IL-15 que é abundante em lesões TT, desencadeou a via antimicrobiana dependente de vitamina D (MONTROYA et al., 2009).

Células endoteliais não estimuladas podem fazer com que monócitos se tornem macrófagos M2, enquanto as células endoteliais estimuladas por IFN- $\gamma$  ou certas drogas

induzem a diferenciação de monócitos em macrófagos M1 dependente de Jagged1 (JAG1), demonstrando como a divergência de macrófagos ocorre no local da infecção, fornecendo também novas pistas para intervir em infecções intracelulares (KIBBIE; TELES; WANG, 2016). Adicionalmente, um estudo recente com foco na expressão de microRNAs (miRNAs) na fisiopatologia da hanseníase descobriu que o *hsa-miR-34a-5p*, que controla a expressão de *JAG1*, é hiperexpresso em lesões da hanseníase LL (SALGADO et al., 2018). Assim, a regulação de *JAG1* por *hsa-miR-34a-5p* permite a diferenciação de macrófagos M2 na forma LL, o que é consistente com a descoberta de uma diferenciação de macrófagos M1 dependente de *JAG1*. Esses estudos demonstram que as citocinas, miRNAs e o microambiente no local da infecção podem desempenhar papéis na divergência de macrófagos. No entanto, a razão pela qual essas citocinas são expressas diferencialmente em diferentes tipos de hanseníase ainda é desconhecida (KIBBIE; TELES; WANG, 2016; SALGADO et al., 2018).

Em uma análise de expressão diferencial de miRNAs entre as lesões TT e LL encontrou-se que o *hsa-miR-21* está principalmente regulado em lesões LL. Análises posteriores indicaram que o *hsa-miR-21* poderia inibir a expressão de dois peptídeos antimicrobianos dependentes de vitamina D, regulando negativamente a via do TLR 2/1 e positivamente a regulação do IL-10, que demonstrou claramente a interação entre o patógeno e atividade antimicrobiana de macrófagos. Além disso, os receptores TLR4 e TLR5 são regulados positivamente na forma LL por outros miRNAs, indicando a inibição da via antimicrobiana dependente de vitamina D (MI; LIU; ZHANG, 2020).

A autofagia é um importante mecanismo inato associado ao controle do *M. leprae* em macrófagos da pele, desempenhando um papel importante na RR na hanseníase MB (SILVA et al., 2017). Um estudo que avaliou lesões cutâneas após o diagnóstico da forma LL, demonstrou que no grupo que desenvolveu RR, apresentaram, no futuro, uma hiporregulação da autofagia associada à hiperregulação de *TLR2* e *MLST8*. O comprometimento da autofagia no grupo RR foi associado ao aumento da expressão de NLRP3, caspase-1 (p10) e produção de IL-1 $\beta$ . Adicionalmente, a análise da produção de IL-1 $\beta$  no soro de pacientes MB demonstrou que os

pacientes que desenvolveram RR aumentaram significativamente as concentrações de IL-1 $\beta$  no diagnóstico, sugerindo que o padrão de respostas imunes inatas poderiam prever o resultado do episódio reacional (DE MATTOS et al., 2018).

Embora a polarização diferencial dos macrófagos nas lesões da hanseníase seja bem caracterizada, os mecanismos intrínsecos da divergência dos macrófagos nas lesões da hanseníase são amplamente desconhecidos. Assim, estratégias que visam induzir a autofagia em macrófagos infectados prometem não só melhorar a eficácia da poliquimioterapia, mas também evitar a ocorrência de episódios reacionários responsáveis pelas deficiências observadas em pacientes com hanseníase (PRATA et al., 2019).

As células dendríticas são células especializadas que podem processar e apresentar antígenos para as células T. Considerando os papéis essenciais das células dendríticas na IMC, pensa-se que têm papel importante na patogênese da hanseníase, e diferentes tipos de células dendríticas têm sido investigadas em vários estudos (ANDRADE et al., 2015; DE ALVARENGA LIRA et al., 2015; SIMÕES QUARESMA et al., 2009).

Os queratinócitos na epiderme também mostram várias respostas imunes em lesões de hanseníase ou contra à infecção com *M. leprae*. Os queratinócitos expressam receptores de ligação de manose (KCMR), receptores TLR e antígenos do complexo MHC de classe II e também foram identificados como fonte de citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos. Assim, este tipo de célula possui um sofisticado sistema de PRRs em que o reconhecimento simultâneo de um patógeno por diferentes classes de PRRs pode fornecer uma resposta imune específica ou, no caso de comensais, a falta de resposta aos microrganismos. Além disso, os queratinócitos podem distinguir entre microrganismos patogênicos e comensais (JIN; AHN; AN, 2018; MI; LIU; ZHANG, 2020).



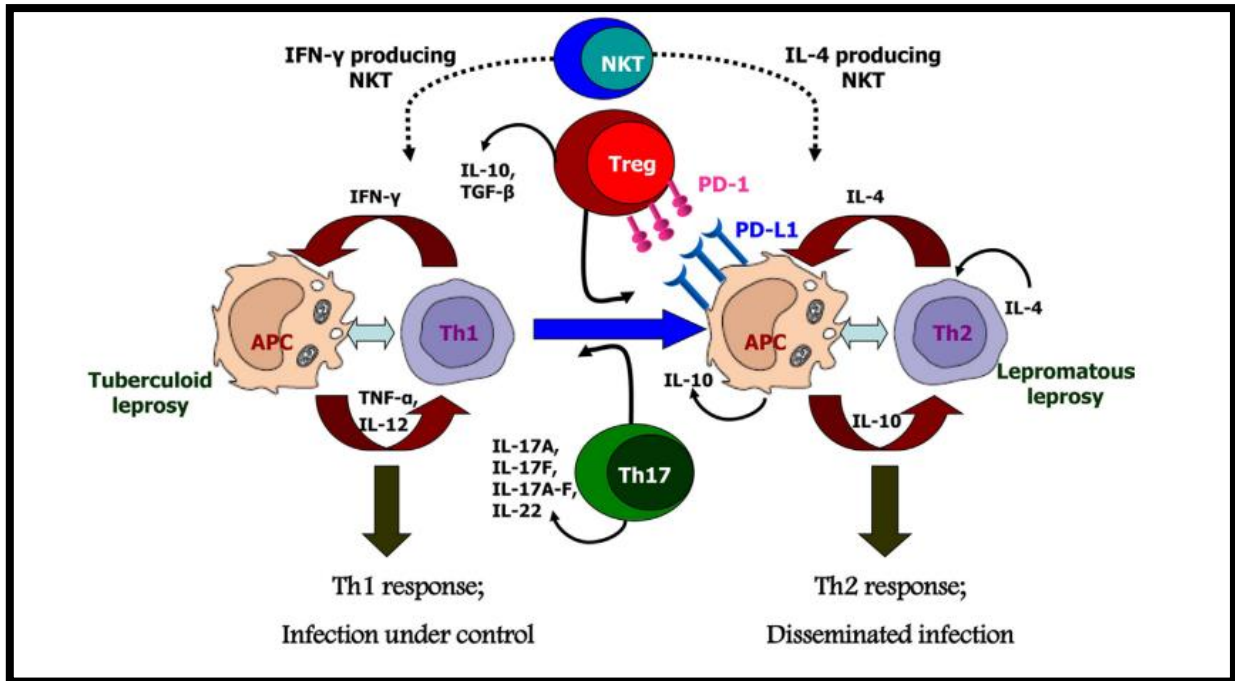
### 1.10. Resposta imune adaptativa na hanseníase

A hanseníase é um exemplo de doença complexa e multifatorial, na qual o bacilo modula a resposta imune do hospedeiro por meio dos mecanismos de evasão adquiridos pelo patógeno. Na caracterização da resposta imune, a doença apresenta classicamente duas formas clínicas consideradas antagônicas, o que orienta a compreensão do padrão de dupla resposta, observado entre os linfócitos Th1 e Th2 (DE SOUSA et al., 2017; MODLIN, 1994). Então, parece que as respostas das células T determinam o resultado no desenvolvimento da hanseníase. Em um modelo murino, as células Th1 que produzem IL-2 e IFN- $\gamma$  poderiam levar os macrófagos para o estado polar microbicida M1 e produzir uma forma restrita da doença. Em contraste, as células Th2 que produziram IL-4 e IL-5 inibiram a função microbicida dos macrófagos, resultando na forma progressiva da doença (MODLIN, 1994).

IL-2 e IFN- $\gamma$  são marcadamente dominantes em lesões TT, enquanto IL-4, IL-5 e IL-10 são características de lesões LL. Além disso, o subconjunto celular Th1, caracterizado pela secreção predominante de IL-2 e IFN- $\gamma$ , fornece preferencialmente IMC, enquanto as células Th2, que produzem IL-4, IL-5 e IL-10, aumentam a resposta imune humoral. Tanto a clássica relação recíproca entre a produção de anticorpos e a IMC quanto a resistência ou suscetibilidade ao *M. leprae* podem ser explicadas por subconjuntos de células T que diferem no padrão de produção de citocinas. O mecanismo de ativação de células T em resposta às micobactérias, é destacado pela via de apresentação de antígeno lipídeo mediado pelo CD1, pois representa um aspecto da defesa do hospedeiro independente da apresentação clássica de antígenos peptídeos por meio de moléculas do MHC (JIN; AHN; AN, 2018).

O paradigma Th1/Th2 pode explicar, em parte, as manifestações e histopatologia das duas formas polares de hanseníase. Na forma TT localizada, a resposta IMC é forte e os bacilos raramente são observados, enquanto na forma LL disseminada, a resposta humoral domina e a carga de bacilos é alta. Além disso, nas últimas décadas, vários outros subconjuntos de linfócitos foram descritos em lesões de hanseníase, que podem estar envolvidas na patogênese da mesma, especialmente na formação da resposta imune do hospedeiro à

infecção (MI; LIU; ZHANG, 2020). Durante muito tempo, a principal interpretação da resposta da defesa do hospedeiro baseou-se na caracterização desse paradigma Th1/Th2. No entanto, com os avanços do conhecimento no campo da imunologia, novas abordagens surgiram, isto mudou a interpretação das formas polares da doença, especialmente com a identificação de outros subtipos de linfócitos T, como Th9, Th17, Th22 e Tregs (DE SOUSA et al., 2017).



**Figura 6.** Possíveis causas para a polarização da hanseníase. As células T *natural killer*, que são as primeiras a responder, produzem citocinas Th1 como IFN- $\gamma$  ou citocinas Th2 como IL-4, dependendo da resposta basal de citocinas do hospedeiro. As células Tregs, que são predominantemente supressoras por natureza e produzem citocinas IL-10 e TGF- $\beta$ , juntamente com a expressão aumentada de morte programada-1 e seu ligante, o ligante de morte programada-1 nas células apresentadoras de antígeno, são encontradas em números significativos em pacientes LL. As células Th17, que produzem as citocinas IL-17 e IL-22, demonstram um fenótipo inflamatório e, portanto, são encontradas em números aumentados em pacientes com lepra tuberculóide. Fonte: SADHU; MITRA, 2018.

Uma compreensão abrangente do papel de várias células T reguladoras, como células Treg e células T *natural killer*, na decisão do estado polarizado da imunidade de células T é crucial. A interação desses subconjuntos de células T com células T efetoras como Th1, Th2 e células Th17 por meio de várias citocinas e moléculas reguladoras pode constituir eventos chave na regulação do estado de polarização imunológica, controlando assim a manifestação clínica (Figura 6) (SADHU; MITRA, 2018).

### **1.11. Análises de expressão diferencial na busca de novos biomarcadores para a hanseníase**

O sequenciamento de RNA (RNA-Seq) é uma técnica que usa o sequenciamento de nova geração (NGS) para revelar a presença e a quantidade de RNA em uma amostra biológica em um determinado momento (CHU; COREY, 2012). Esta técnica tornou-se a principal escolha para medir os níveis de expressão (MORTAZAVI; WILLIAMS; MCCUE, 2008). O RNA-Seq pode ser realizado sem conhecimento prévio da referência ou sequência de interesse e permite uma ampla variedade de aplicações, como: reconstrução “*de novo*” do transcriptoma (sem um genoma de referência), avaliação de variações de nucleotídeos e avaliação de padrões de metilação, entre outros (COKUS; FENG; ZHANG, 2008).

A análise transcriptômica da expressão diferencial de genes (DGE) representa uma abordagem eficaz para identificar novos biomarcadores para o diagnóstico da hanseníase (TIÓ-COMA et al., 2021). O RNA-Seq consiste em uma técnica de alto rendimento que inclui todo o transcriptoma em vez de uma seleção de genes, por esta razão, vem sendo cada vez mais promissora para o diagnóstico e tratamento de várias doenças, incluindo a hanseníase (TIÓ-COMA et al., 2019).

Poucos estudos empregaram transcriptômica para identificar uma assinatura de risco de biomarcador para o diagnóstico da hanseníase. Guerreiro e colaboradores (2013),

descreveram que a expressão gênica de *LDR* e *CCL4* em biópsias nervosas identificou até 80% dos pacientes com hanseníase neural pura. Tió Coma e colaboradores (2021), propuseram uma assinatura de 4 genes, designada RISK4LEP (*MT-ND2*, *REX1BD*, *TPGS1* e *UBC*) com um poder de discriminação de 86,4%, entre pacientes com hanseníase e contatos domiciliares.

A caracterização de padrões genéticos associados às formas PBs e MBs da hanseníase pode levar ao desenvolvimento de melhores ferramentas de diagnóstico e intervenções terapêuticas direcionadas às principais vias biológicas afetadas (LEAL-CALVO et al., 2021).

Jorge e colaboradores (2017), revelaram que uma combinação de quatro miRNAs (*hsa-miR-101*, *hsa-miR-196b*, *hsa-miR-27b* e *hsa-miR-29c*), em biópsias de pele, foi capaz de discriminar entre controles saudáveis e pacientes com hanseníase com uma sensibilidade de 80% e especificidade de 91%. Esse conjunto de miRNAs também foi capaz de discriminar entre pacientes LL e TT com uma sensibilidade de 83% e especificidade de 80%. Salgado e colaboradores (2018), apresentaram o primeiro miRNoma de hanseníase a partir de amostras de lesões de pele e sangue provenientes de pacientes com a doença, encontrando vários miRNAs com expressão diferencial significativa e envolvidos em vias e processos de reconhecimento e fagocitose do patógeno, apoptose, desmielinização e transição epitelial-mesenquimal (EMT), além de perda de sensibilidade e dor neuropática.

Mais recentemente, Pinto e colaboradores (2020) publicaram o primeiro piRNoma da hanseníase, onde avaliaram a expressão diferencial de *PIWI-Interacting RNAs* (piRNAs), descobrindo que as suas funções na hanseníase são semelhantes às descritas para os miRNAs, incluindo atuação na apoptose, reconhecimento e fagocitose de *M. leprae*, desmielinização de células de Schwann SC, transição epitelial-mesenquimal, perda de sensibilidade e dor neuropática. Portanto, é fundamental a realização de estudos que integrem informações biológicas, genéticas, imunológicas, diagnósticas e clínicas para compreender a complexa imunofisiopatologia da doença, estabelecer novas estratégias terapêuticas e identificar novos casos de hanseníase antes da manifestação dos sinais e sintomas.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar biomarcadores genéticos e epigenéticos envolvidos no processo imunofisiopatológico da hanseníase, utilizando a análise do conjunto completo de genes expressos e a validação de um painel de miRNAs, em amostras de pacientes com hanseníase e contatos domiciliares sem a doença.

### **2.2. Objetivos Específicos**

1. Descrever o comportamento epidemiológico da hanseníase no Brasil e em vários países da América Latina;
2. Validar um conjunto de nove miRNAs em amostras de sangue de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares sem a doença por RT-qPCR;
3. Caracterizar a expressão global de genes em amostras de sangue de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares sem a doença;
4. Identificar os genes diferencialmente expressos em amostras de sangue de pacientes com hanseníase e de contatos domiciliares sem a doença;
5. Realizar a identificação *in silico* de possíveis vias ou processos celulares em que os genes diferencialmente expressos e os miRNAs validados podem estar envolvidos;
6. Associar os genes diferencialmente expressos e os miRNAs validados com o desenvolvimento da doença;
7. Identificar potenciais genes e miRNAs como biomarcadores de risco para a hanseníase.

**3. CAPÍTULO I**

**COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LEPRO EN VARIOS PAÍSES DE AMÉRICA  
LATINA, 2011-2020**

**(Epidemiological behavior of leprosy in several Latin American countries, 2011-2020)**

**(Comportamento epidemiológico da hanseníase em vários países da América Latina,  
2011-2020)**

Artigo publicado na *Revista Panamericana de Salud Pública /*

*Pan American Journal of Public Health*

ISSN: 1680-5348

Fator de Impacto: 2,84

Qualis: A4

DOI: 10.26633/RPSP.2022.14

## Investigación original

# Comportamiento epidemiológico de la lepra en varios países de América Latina, 2011-2020

Miguel Ángel Cáceres-Durán<sup>1</sup>

**Forma de citar** Cáceres-Durán MA. Comportamiento epidemiológico de la lepra en varios países de América Latina, 2011-2020. Rev Panam Salud Publica. 2022;46:e14. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2022.14>

### RESUMEN

**Objetivo.** Describir el comportamiento epidemiológico de la lepra en varios países latinoamericanos durante 2011-2020, tomando como base los indicadores de la Organización Mundial de la Salud (OMS).

**Método.** Estudio transversal, descriptivo y cuantitativo con datos oficiales sobre incidencia y prevalencia en la población en general, niños, forma clínica y casos de discapacidad de grado 2 registrados por la OMS entre 2011 y 2020. Se seleccionaron los ocho países latinoamericanos con más casos y se realizaron análisis de estadística descriptiva simple y comparativa entre las variables.

**Resultados.** Entre 2011-2020 se reportaron 301 312 casos de lepra en los países seleccionados: Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, México, Paraguay, República Dominicana y Venezuela. Brasil fue el único con una prevalencia mayor a 1 por 10 000 habitantes y representó 93,77% de casos. En Brasil y República Dominicana se observó un aumento de la prevalencia durante 2011-2019, mientras que en los demás países esta tendió a disminuir. La enfermedad fue más frecuente en hombres, y los casos multibacilares superaron significativamente a los paucibacilares. En Brasil se encontraron las mayores incidencias de casos de lepra infantil y discapacidad de grado 2 durante el período evaluado.

**Conclusión.** A pesar de que en América Latina la lepra solo es considerada un problema de salud pública en Brasil, la mayoría de los países de la región continúa reportando casos cada año, lo que revela una falta de atención médica adecuada. El estudio confirmó la importancia de la vigilancia activa, el diagnóstico temprano y la planificación de acciones contra la enfermedad en todos los países evaluados, con el propósito de disminuir o detener su transmisión.

**Palabras clave** Lepra; epidemiología; prevalencia; enfermedades endémicas; *Mycobacterium leprae*; América Latina.

La lepra es una enfermedad granulomatosa crónica muy antigua y, aunque es curable, sigue siendo un problema de salud pública en varias partes del mundo. Es el resultado de la infección por *Mycobacterium leprae* o *Mycobacterium lepromatosis*, y afecta principalmente la piel y los nervios periféricos. Otros órganos, como los ojos, las membranas mucosas del tracto respiratorio superior, los huesos y los testículos, también pueden verse afectados, y esta afectación produce el espectro fenotípico clínico típico de la enfermedad (1-3).

A lo largo de la historia, los pacientes con lepra eran aislados y a menudo se prohibía su convivencia con la sociedad, ya que esta enfermedad era considerada altamente contagiosa. Existía el temor de que el solo hecho de tocar a una persona infectada pudiera propagar la enfermedad. Hoy en día, se sabe que la lepra no es tan fácil de transmitir, pero el mecanismo exacto de la enfermedad y su transmisión aún deben ser mejor entendidos. Se sabe que los bacilos se transmiten principalmente de persona a persona a través de secreciones nasales, y que

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Humana e Médica. Universidade Federal do Pará, Belém, Brasil. ✉ Miguel Ángel Cáceres-Durán, [macdur@gmail.com](mailto:macdur@gmail.com)

aquellas que conviven con un caso multibacilar (MB) no tratado tienen un mayor riesgo de infección. Además, actualmente se están considerando otros posibles modelos de transmisión, como la transmisión zoonótica (4,5).

La enfermedad se desarrolla en individuos susceptibles, y en países endémicos donde el entorno (bajo nivel socioeconómico, desnutrición, hacinamiento, población rural dispersa y la limitación en el acceso oportuno a los servicios de salud para la atención y el diagnóstico, entre otras características) juega un papel importante en la transmisión de la infección. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son el resultado de un proceso interactivo dinámico entre el bacilo y la inmunidad mediada por células de individuos genéticamente predispuestos (3,6). La lepra es una de las principales causas infecciosas de discapacidad. El tropismo de la micobacteria por el sistema nervioso periférico es el primer paso a la discapacidad y se manifiesta clínicamente cuando la consulta o el diagnóstico es tardío. Por lo tanto, el diagnóstico precoz reviste gran importancia ya que lleva a la cura del paciente, interrumpe la cadena de transmisión y evita la severa afección neural y las manifestaciones con la repercusión social y laboral que ello conlleva (7).

Después de la introducción de la poliquimioterapia (PQT) en 1981, la estrategia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se centró en reducir la tasa de prevalencia, disminuyendo a menos de 1 caso por cada 10 000 habitantes, y luego, reduciendo aún más la detección de nuevos casos, la discapacidad, el estigma y la discriminación. En muchos países la incidencia de la lepra está disminuyendo debido a varios factores, entre ellos, el desarrollo económico, la vacunación con BCG y la cobertura de la PQT, y es posible que se haya interrumpido la transmisión comunitaria (8). Sin embargo, a pesar de que la prevalencia cumplió con el objetivo de eliminación (< 1 por 10 000 habitantes), en países no desarrollados, la disminución de la incidencia no se logró como se esperaba y la transmisión de la enfermedad aún continúa (8), tanto así, que, en el año 2020, la prevalencia global registrada (número de casos en tratamiento) fue de 129 192, con una tasa de 16,6 por millón de habitantes, siendo notificados 127 396 nuevos casos en todo el mundo, con una tasa de detección de 16,4 por millón de habitantes. Aunque ambas cifras presentaron una reducción de 27,7% y 37,1% en la prevalencia registrada y en los nuevos casos, respectivamente, en comparación con el año 2019, a nivel global, esa disminución probablemente se deba a una menor detección durante la pandemia de COVID-19, ya que solo 127 países proporcionaron datos en 2020, en comparación con 160 en 2019 (9).

En el continente americano, en el año 2020, fueron reportados 19 195 nuevos casos con una prevalencia de 25,786, siendo Brasil el país con más casos en la región (>10 000). Aunque en el resto de la región la enfermedad ya no es más considerada un problema de salud pública, países como Argentina, Bolivia, Colombia, Cuba, Estados Unidos, México, Paraguay, Perú y Venezuela, reportaron más de 100 casos nuevos cada uno (9).

Los mayores desafíos en los países en desarrollo, como es el caso de nuestros países latinoamericanos, donde aún hay una presencia marcada de la enfermedad, son el diagnóstico tardío, evidenciado en la proporción relativamente alta de nuevos casos de discapacidad grado 2 (DG2), débiles programas de búsqueda activa de nuevos casos y seguimiento de contactos domésticos, falta de concientización, estigma asociado con la enfermedad, falta de profesionales especialistas, políticas públicas, entre otras (8).

Cabe destacar que los datos publicados por la OMS deben ser observados con bastante cautela, debido a la gran subnotificación existente en todos los países de la región. Estudios realizados en Brasil (10,11) informaron la presencia de muchas brechas en la notificación de nuevos casos de lepra en países de todas las regiones, donde países de altos ingresos y con sistemas de salud bien estructurados aún reportan casos, mientras que muchos países de bajos ingresos, donde generalmente hay condiciones favorables para la lepra, no reportan. Específicamente, en Brasil, se han observado más casos ocultos a través del diagnóstico de casos pasivos, incluso en áreas del país consideradas de baja endemicidad. Estos hallazgos ilustran la importancia de la vigilancia activa y el descubrimiento adicional de casos entre los contactos domésticos de casos recién diagnosticados por especialistas capacitados (10,11).

Datos del Sistema Brasileño de Información de Enfermedades de Declaración Obligatoria mostraron que alrededor del 50% de la población que vive en 19 de los 27 estados del país, está expuesta a tasas altas o hiperendémicas de infección y, por esta razón, sería factible encontrar más casos de lepra utilizando sistemas de información geográfica y análisis serológicos para la vigilancia en estas áreas específicas. En consecuencia, el número estimado de casos ocultos de lepra es probablemente hasta ocho veces mayor que la tasa reportada (10,11). Por tanto, resulta importante que todos estos países sostengan las acciones adecuadas contra la enfermedad.

La Estrategia Mundial contra la Lepra 2021-2030 es un instrumento avanzado para acelerar el progreso hacia la cero lepra, donde se tienen como objetivos, para 2030, llegar a un total de 120 países con 0 casos autóctonos; reducir el número de nuevos casos a 63 000; reducir la tasa de nuevos casos de discapacidad de grado 2 a 0,12 por millón de habitantes y reducir la tasa de detección de nuevos casos infantiles a 0,77 por millón de población infantil (8). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue describir el comportamiento epidemiológico de la lepra en varios países de América Latina durante el período comprendido en los últimos 10 años, tomando como base los indicadores estipulados por la OMS.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un estudio transversal, descriptivo y cuantitativo donde se tomaron los datos oficiales sobre incidencia y prevalencia de lepra en la población en general, en niños (<15 años), clasificación operacional de la enfermedad y casos con DG2, reportados en los registros oficiales y base de datos de la OMS durante el período comprendido entre los años 2011 y 2020 (<https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/leprosy-hansens-disease>) (12). Para ello, fueron seleccionados los ocho países de América Latina que más casos reportaron durante ese período y los análisis se realizaron a través de estadística descriptiva simple y comparativa entre los diferentes datos en los países seleccionados. Todos los datos colectados fueron organizados, filtrados y tabulados en hojas de cálculo en los programas Microsoft Excel 2019 y BioEstat 5.0. Se realizaron cálculos correspondientes a las diferencias porcentuales de la prevalencia en todo el período, se construyeron tablas de frecuencia y gráficos con las distintas variables y se aplicó la prueba de Chi cuadrado para evaluarlas, tomando como valores estadísticamente significativos aquellos en los que el *p*-valor obtenido fue  $\leq 0,05$ .



## RESULTADOS

Entre el periodo comprendido durante 2011 y 2020 fueron reportados 301 312 casos de lepra en los ocho países con más casos en América Latina, siendo ellos, en orden decreciente de casos: Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, Paraguay, México, República Dominicana y Venezuela, (cuadro 1 y figura 1a). Del total de casos, Brasil representa 93,77%, siendo el único país de la región con una prevalencia > 1 por 10 000 habitantes (media geométrica durante el periodo: 1,32). Los demás países representan 6,23% del total de casos, y todos con una prevalencia < 1 por 10 000 habitantes (cuadro 1 y figura 1a). Del mismo modo, Brasil presentó la mayor incidencia en toda la región en todos los años con una media geométrica durante el periodo: 1,36 por 10 000 habitantes, seguida por Cuba y República Dominicana con incidencias medias > 0,1 por 10 000 habitantes. El restante de países seleccionados presentó incidencias medias < 0,1 por 10 000 habitantes (figura 1b).

Al comparar la variación anual de la prevalencia durante el periodo 2011-2020, se observó que la tendencia, en todos los países estudiados, fue una disminución entre 22,79 y 57,10%. En 2020, los países prioritarios para la lepra, según la OMS, reportaron un número de casos significativamente menor que en 2019, lo que puede reflejar el impacto de la pandemia COVID-19 actualmente, ya que a nivel mundial se ha priorizado el diagnóstico y atención de esta enfermedad, por esta razón, se determinó también la variación de la prevalencia durante el periodo 2011-2019, encontrando así, que seis de los ocho países seleccionados mostraron una menor disminución de la prevalencia, mientras que dos países, Brasil y República Dominicana, aumentaron, comparados con el periodo 2011-2020 (cuadro 2).

Los casos multibacilares (MB) son los de mayor importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad. Con excepción de República Dominicana en el año 2013, fue encontrado, en todos los países seleccionados, que la frecuencia anual de casos MB es mayor que las de casos paucibacilares (PB) (figura 1c). También fue determinado que la frecuencia media de casos MB diagnosticados durante el periodo 2011-2020 supera entre 2 y 6 veces la frecuencia de casos PB ( $p < 0,05$ ).

Con respecto a la distribución de nuevos casos de lepra de acuerdo con el género durante el periodo evaluado, se encontró, en todos los años, una mayor frecuencia de lepra en hombres, siendo las únicas excepciones Cuba en 2016, con 52,15% de casos en mujeres, y República Dominicana en 2020, donde la

distribución fue de 50% para cada género. Sin embargo, solo cuatro países presentaron diferencias significativas, siendo ellos, Argentina, Brasil, Cuba y República Dominicana (cuadro 3 y figura 2a).

En todos los países seleccionados fueron diagnosticados casos de lepra en niños menores de 15 años, siendo Brasil el país con mayor incidencia en cada año del periodo 2011-2020, con una media de 40 casos por millón de población infantil, seguido por Paraguay, con una media de 5,08. Los demás países seleccionados presentaron incidencias medias entre 0,08 y 2,94 casos por millón de población infantil (figura 2b). De igual forma, las mayores incidencias para los nuevos casos de DG2 durante el periodo estudiado fueron encontradas en Brasil, con una incidencia media de 10,15 nuevos casos por millón de habitantes seguido por Paraguay, con una media de 5,86 nuevos casos por millón de habitantes. Los demás países seleccionados presentaron incidencias medias entre 0,08 y 1,16 casos por millón de habitantes (figura 2c).

## DISCUSIÓN

En el año 2020, 21 países del continente americano reportaron casos nuevos de lepra, siendo Brasil el único país del continente con una prevalencia > 1 por 10 000 habitantes. Sin embargo, países como Argentina, Colombia, Cuba, México, Paraguay, República Dominicana y Venezuela, con prevalencias de < 1 por 10 000 habitantes, reportaron más de 100 nuevos casos cada uno, lo que indica que, aunque la terapia curativa ha resultado en una disminución sustancial en el número de casos, todavía existe la necesidad de mejores estrategias para el control de la enfermedad y la prevención de la discapacidad en las personas afectadas (13).

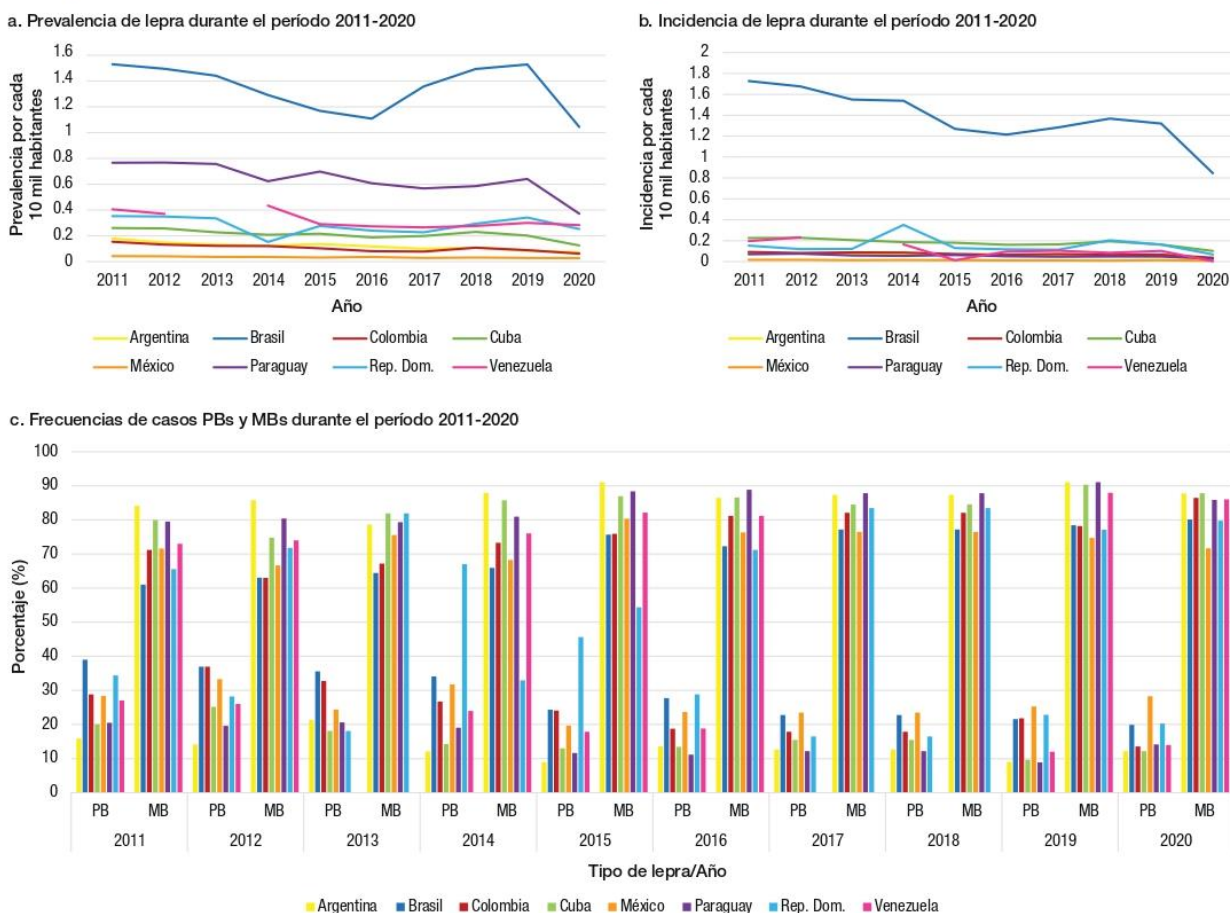
La eliminación de la lepra como problema de salud pública es una consecuencia del impacto de la poliquimioterapia (PQT). En el año 2000, la prevalencia mundial de la lepra alcanzó una tasa de < 1 por 10 000 habitantes. Sin embargo, se esperaba que el impacto de la PQT también pudiera contribuir al control de la transmisión. Éste bajo impacto de la PQT en la transmisión se refleja en la incidencia de la enfermedad, que ha disminuido, pero no en la proporción esperada, ya que el número de nuevos casos por año fue de más de 200 000 en todo el mundo en 2019. En 2020 se reportaron más de 127 000 nuevos casos, sin embargo, esa disminución pudo ser debida al impacto de la pandemia de COVID-19 que estamos viviendo actualmente (9,14).

**CUADRO 1. Casos nuevos de lepra reportados por la OMS en países seleccionados de América Latina durante 2011-2020**

País/Año	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Argentina	340	310	309	314	290	295	250	269	211	131	2 719
Brasil	33 955	33 303	31 044	31 064	26 395	25 218	26 875	28 660	27 863	17 979	282 356
Colombia	434	392	430	423	349	314	362	324	336	192	3 556
Cuba	254	258	232	210	207	186	190	220	186	115	2 058
México	215	216	172	208	173	152	148	136	182	106	1 708
Paraguay	468	515	407	378	421	341	321	345	348	198	3 742
Rep. Dom.	154	124	128	370	138	125	123	218	175	74	1 629
Venezuela	577	692	SD*	513	448	303	332	245	291	143	3 544
<b>Total</b>	<b>36 397</b>	<b>35 810</b>	<b>32 722</b>	<b>33 480</b>	<b>28 421</b>	<b>26 934</b>	<b>28 601</b>	<b>30 417</b>	<b>29 592</b>	<b>18 938</b>	<b>301 312</b>

Fuente: OMS. \* SD: sin datos

**FIGURA 1. Parámetros evaluados durante el período 2011-2020 en países seleccionados. Las líneas discontinuas y la ausencia de barras para Venezuela en 2013 se deben a la falta de datos en el respectivo año.**



Fuente: elaboración propia del autor a partir de los resultados presentados.

**CUADRO 2. Porcentaje de variación de la prevalencia de la lepra durante 2011-2020 en países seleccionados de América Latina, calculados a partir de datos reportados por la OMS**

País/año	Variación anual (%)									Variación período (%)	
	2011-2012	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019	2019-2020	2011-2019	2011-2020
Argentina	-16,60	-10,78	-5,02	14,68	-12,46	-14,23	8,18	-22,27	-11,08	-48,82	-54,50
Brasil	-1,28	-2,82	-9,64	-6,78	-5,36	-2,83	39,95	3,060	-28,14	7,20	-22,96
Colombia	-13,65	-5,81	0,51	-15,16	-20,88	-3,55	39,21	-16,64	-30,16	-38,58	-57,10
Cuba	-1,04	-11,54	-8,30	5,17	-12,70	6,10	14,16	-12,02	-38,33	-21,45	-51,56
México	2,29	-8,15	0,67	-11,67	15,21	-18,40	6,10	-10,75	-3,64	-25,63	-28,33
Paraguay	2,01	0,39	-16,31	7,51	-12,22	-4,98	5,24	10,70	-41,12	-10,46	-47,28
Rep. Dom.	1,14	-3,10	-53,78	80,50	-12,20	-4,37	28,22	17,48	-25,34	3,42	-22,79
Venezuela	-8,67	SD*	SD*	SD*	-4,47	-1,52	-6,18	7,22	-6,85	-29,42	-34,25

\* SD: sin datos

La pandemia de COVID-19 tuvo un impacto significativo en los servicios de salud en todos los países. Los programas contra la lepra se vieron claramente afectados, como lo demuestra la reducción sustancial del número de casos detectados y notificados por los países en 2020, y que no debe confundirse con

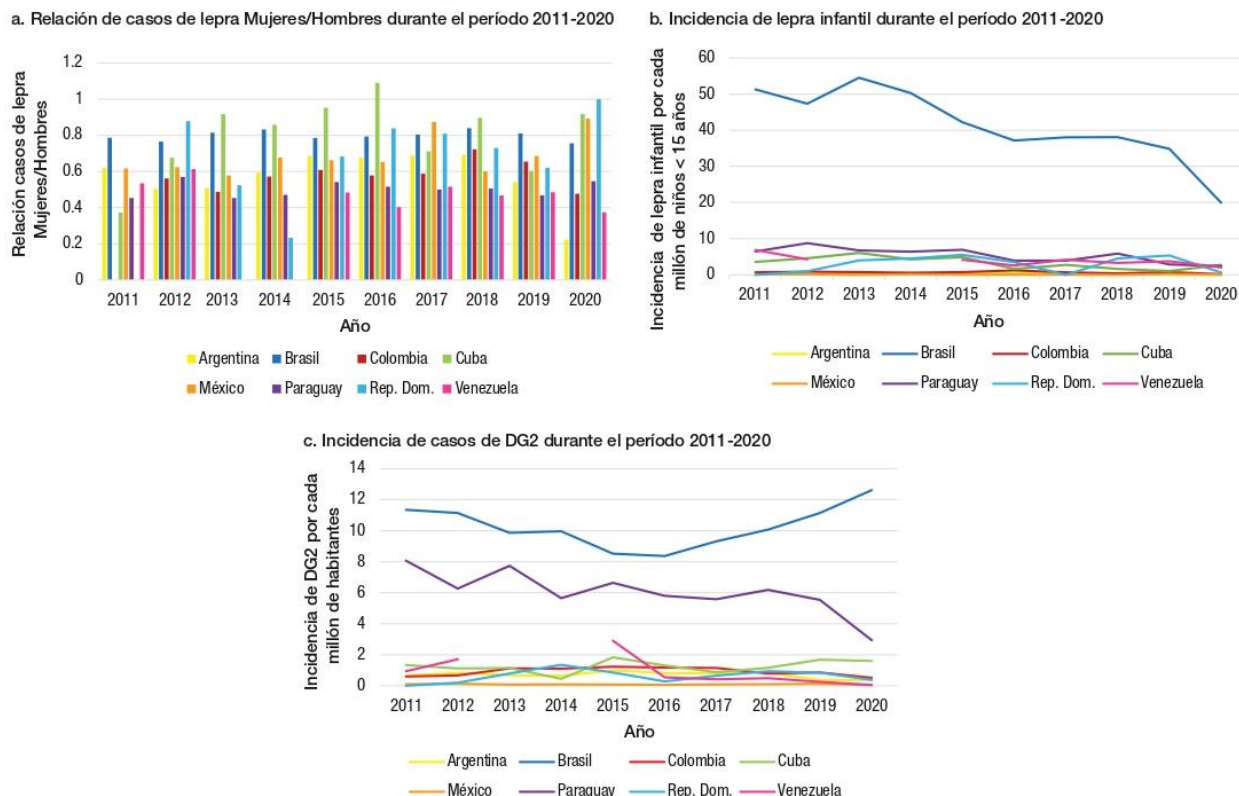
una real disminución de casos de lepra, sobre todo en los países prioritarios. Además, el estrés causado por la pandemia de COVID-19 y la dificultad para acceder a un tratamiento anti-reaccional podrían amplificar la DG2 y demás secuelas de la lepra (15).

**CUADRO 3. Distribución de casos de lepra, por sexo, durante 2011-2020 en países seleccionados de América Latina**

País/Año	2011		2012		2013		2014		2015		2016		2017		2018		2019		2020		P
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
<b>Argentina</b>	N 210	130	206	104	205	104	197	117	172	118	176	119	148	102	159	110	137	74	107	24	0,0005
%	61,76	38,24	66,45	33,55	66,34	33,66	62,74	37,26	59,31	40,69	59,66	40,34	59,20	40,80	59,11	40,89	64,93	35,07	81,68	18,32	
<b>Brasil</b>	N 19 002	14 953	18 860	14 443	17 102	13 942	16 955	14 109	14 781	11 614	14 062	11 156	14 893	11 982	15 582	13 078	15 392	12 471	10 238	7 741	<0,0001
%	55,96	44,04	56,63	43,37	55,09	44,91	54,58	45,42	56,00	44,00	55,76	44,24	55,42	44,58	54,37	45,63	55,24	44,76	56,94	43,06	
<b>Colombia</b>	N SD*	SD*	251	141	289	141	269	154	217	132	199	115	228	134	188	136	203	133	130	62	0,278
%	SD*	SD*	64,03	35,97	67,21	32,79	63,59	36,41	62,18	37,82	63,38	36,62	62,98	37,02	58,02	41,98	60,42	39,58	67,71	32,29	
<b>Cuba</b>	N 316	118	154	104	121	111	113	97	106	101	89	97	111	79	116	104	116	70	60	55	<0,0001
%	72,81	27,19	59,69	40,31	52,16	47,84	53,81	46,19	51,21	48,79	47,85	52,15	58,42	41,58	52,73	47,27	62,37	37,63	52,17	47,83	
<b>México</b>	N 133	82	133	83	109	63	124	84	104	69	92	60	79	69	85	51	108	74	56	50	0,666
%	61,86	38,14	61,57	38,43	63,37	36,63	59,62	40,38	60,12	39,88	60,53	39,47	53,38	46,62	62,50	37,50	59,34	40,66	52,83	47,17	
<b>Paraguay</b>	N 322	146	328	187	280	127	257	121	273	148	225	116	214	107	229	116	237	111	128	70	0,785
%	68,80	31,20	63,69	36,31	66,80	31,20	67,99	32,01	64,85	35,15	65,98	34,02	66,67	33,33	66,38	33,62	68,10	31,90	64,65	35,35	
<b>Rep. Dom.</b>	N SD*	SD*	66	58	84	44	300	70	82	56	68	57	68	55	126	92	108	67	37	37	<0,0001
%	SD*	SD*	53,23	46,77	65,63	34,38	81,08	18,92	59,42	40,58	54,40	45,60	55,28	44,72	57,80	42,20	61,71	38,29	50,00	50,00	
<b>Venezuela</b>	N 376	201	429	263	SD*	SD*	SD*	SD*	302	146	216	87	219	113	167	78	196	95	104	39	0,075
%	65,16	34,84	61,99	38,01	SD*	SD*	SD*	SD*	67,41	32,59	71,29	28,71	65,96	34,04	68,16	31,84	67,35	32,65	72,73	27,27	

Fuente: OMS. \* SD: sin datos

**FIGURA 2. Parámetros evaluados durante el período 2011-2020 en países seleccionados. La ausencia de barras y las líneas discontinuas para Venezuela en 2013 y 2014, según el caso, se deben a la falta de datos en el respectivo año.**



Fuente: elaboración propia del autor a partir de los resultados presentados.

Mientras que servicios esenciales y críticos continuaron en general durante la pandemia de COVID-19, en muchos países los programas de control se vieron afectados por la reasignación de personal, el cese de las actividades comunitarias y la búsqueda activa de casos, retrasos en la recepción de suministros de PQT, desabastecimientos ocasionales en los establecimientos de salud, y seguimiento limitado de los pacientes con lepra (9).

La situación de la lepra en el mundo debe considerarse cuidadosamente antes de que se puedan sacar conclusiones. La clasificación de un problema de salud pública basado en la prevalencia trae confusión y ha generado un mal reconocimiento de la enfermedad en nuestros países (14). La prevalencia de una enfermedad aumenta como consecuencia de una mayor duración de la enfermedad, la prolongación de la vida de los pacientes sin que éstos se curen, el aumento de casos nuevos, la inmigración de casos (o de susceptibles), la emigración de personas sanas y la mejoría en los diagnósticos. Por otro lado, la prevalencia de una enfermedad disminuye cuando es menor la duración de la enfermedad, existe una elevada tasa de letalidad, disminuyen los casos nuevos, hay inmigración de personas sanas, emigración de casos y aumento de la tasa de curación. Resumidamente, la prevalencia de una enfermedad depende de la incidencia, de la duración de la enfermedad y de otros factores no relacionados directamente con la causa de la enfermedad, y puede ser útil para valorar la necesidad de asistencia sanitaria, planificar los servicios de salud o estimar las necesidades asistenciales (16).

Los datos epidemiológicos de muchos países deben interpretarse con cautela, porque los objetivos de eliminación de la enfermedad se alcanzaron sobre la base de algunos criterios, tales como: cambios en la definición de caso, exclusión de los casos recurrentes de la tasa de prevalencia, exclusión de los casos de abandono del tratamiento de los registros activos, tratamiento de dosis única de pacientes PB, menor duración del tratamiento, etc. Esto ha causado una fuerte caída en el número de nuevos casos reportados (17).

La reducción de la prevalencia en Brasil ha venido ocurriendo en menores niveles que los presentados en los demás países endémicos. Este hecho podría estar relacionado a la adopción más tardía de la PQT, al hecho de que, al ser un país endémico, más personas tienen contacto con el bacilo a lo largo de su vida, así como también a procesos administrativos de programas nacionales (18). Aunado a esto, se debe tomar en cuenta la gran extensión territorial brasileña y las desigualdades socioeconómicas entre sus regiones, de hecho, las regiones más pobres del país son las más endémicas (19). Un mayor número de contactos domésticos entre los miembros de la familia es otra de las razones de una mayor transmisión y una mayor prevalencia de lepra en Brasil (20). No obstante, existen muchas lagunas en la notificación de nuevos casos para los países de todas las regiones. Países de altos ingresos con sistemas de salud bien estructurados, como la mayoría de los países europeos, Estados Unidos, Australia y Japón, han reportado casos de lepra en los últimos años, mientras

que muchos países de bajos ingresos, donde generalmente existen condiciones favorables para la enfermedad no reportan. En Brasil, el único país en la Región de las Américas que aún no ha alcanzado el objetivo de menos de un nuevo caso por cada 10 000 habitantes, las encuestas realizadas por varios leprólogos, que utilizan la vigilancia activa de escolares y sus contactos domésticos revelan más casos ocultos que los reportados oficialmente, mediante el diagnóstico pasivo de casos, incluso en zonas del país consideradas de baja endemicidad (10,11,21). Se debe destacar que como Brasil concentra el mayor porcentaje de casos de lepra en la región, los resultados tienen influencia en los demás países de América Latina en su conjunto.

Debe mencionarse también que entre los años 2000 y 2020 se estimó que dejaron de ser diagnosticados más de 4 millones de casos de lepra en todo el mundo (22), lo que implica que puede haber una gran acumulación de personas infectadas en la comunidad que permanecen sin diagnóstico, sin tratamiento, desarrollando incapacidades y propagando la enfermedad.

La importancia epidemiológica de los casos de pacientes MB en la transmisión de la enfermedad radica en que ellos son la mayor fuente de propagación del agente infeccioso. Está reconocido que los contactos domésticos con pacientes con lepra MB son los más propensos a contraer la enfermedad, aunque existan casos en donde tales contactos nunca irán a manifestarla, lo que indica el papel crucial de los factores genéticos y ambientales en la transmisión de la infección y patogénesis de la lepra clínica (23, 24).

Un estudio reciente (24) evaluó las frecuencias de casos PB y MB a lo largo del periodo entre 1985 y 2017, donde, hasta 2003 la forma paucibacilar (PB) predominaba sobre la multibacilar (MB). En todos los ocho países seleccionados las formas MB superaron significativamente a las PB durante el periodo estudiado. El cambio consistente y significativo en el tipo de casos hacia los casos MB que predominan en los informes de la OMS probablemente sea el resultado de la interacción de varios efectos diferentes. Estos incluyen una definición de caso cambiante y hasta tal vez una posible sobre clasificación de los pacientes con la forma MB. Puede haber un sesgo basado en la calidad de las habilidades de clasificación entre los trabajadores de campo que deciden si el nuevo caso es PB o MB (25). La correcta clasificación del paciente es un factor de riesgo clínico importante. Los pacientes con formas MB tienen un mayor riesgo de desarrollar daño nervioso y reacciones de la enfermedad, por lo que asignar a un paciente a la clasificación correcta tiene sus implicaciones.

Tradicionalmente, se ha reportado una preponderancia masculina sobre femenina en diversos estudios epidemiológicos, aunque en los últimos años la diferencia entre los sexos haya disminuido (26-28). En los países seleccionados de nuestra región, durante el periodo 2011-2020, los hombres fueron más afectados que las mujeres, sin embargo, solo cuatro de ellos presentaron una distribución diferenciada estadísticamente significativa. Los ligeros aumentos en las tasas de incidencia en mujeres pueden deberse a un incremento de mujeres infectadas o a una mayor accesibilidad al servicio de salud, además que las mujeres se muestran más preocupadas por la imagen de sí mismas que los hombres (26-28).

Varios factores atribuidos tradicionalmente a las mujeres como bajo estatus, movilidad más limitada, analfabetismo y el escaso conocimiento de la enfermedad serían responsables de la subnotificación de los casos de mujeres afectadas por la lepra (29). Las desigualdades de género en la salud tienen un efecto significativo

en la salud de las mujeres. Sin embargo, existen muchas desigualdades de género relacionadas con la salud y la enfermedad. Existen diferencias de género, tanto biológicas como socioculturales, que están relacionadas con la lepra, donde las desigualdades de género podrían ser más graves, ya que es una enfermedad altamente estigmatizada. Las mujeres que la padecen sufren doblemente la exclusión, por su condición de enfermas y de ser mujeres, haciendo que tengan menos probabilidades que los hombres de ser diagnosticadas a tiempo y aumentando el riesgo de desarrollar una discapacidad de por vida (30).

Otra de las razones por las cuales se diagnostica más lepra en hombres es que éstos tienen menos probabilidades de recibir un diagnóstico erróneo debido a diagnósticos relativamente tardíos y una mayor frecuencia de síntomas de enfermedad avanzada. Los hombres son diagnosticados con lepra MB con el doble de frecuencia que las mujeres en diferentes partes del mundo. Por otro lado, las mujeres y los niños tienen más probabilidades de presentar tipos de lepra PB localizada, con lesiones más discretas, lo que puede explicar las mayores posibilidades de diagnóstico erróneo para estos grupos poblacionales (31).

Aunque tanto los hombres como las mujeres se ven afectados en términos de su vida familiar y social, las mujeres sufren más aislamiento y rechazo de la familia y la sociedad. Los problemas familiares y sociales que enfrentan las mujeres que sufren de lepra se deben principalmente al estigma social asociado, por lo que se enfatiza la necesidad de desarrollar estrategias para reducir ese estigma. Para superar este problema, es necesario fortalecer el componente educativo comunitario de los programas de lucha contra la lepra, así como también analizar la situación de los pacientes con lepra desde la perspectiva de género, ya que tiene implicaciones significativas para el control de la enfermedad (32).

Aunque la lepra es más común en adultos, la lepra en los niños es más frecuente de lo que se cree, sobre todo en zonas endémicas en donde la infección se contrae frecuentemente durante este período y todos los años se notifican nuevos casos de lepra infantil (23). El brote de casos en niños y adolescentes muestra la circulación activa del bacilo en la comunidad, con su transmisión continua y el fracaso del sistema de salud para controlar la enfermedad (23,33). Todos los ocho países seleccionados reportaron casos de lepra infantil durante el periodo 2011-2020, siendo Brasil el país con mayor incidencia. En países en los que la lepra puede considerarse endémica, como Brasil, a pesar de la caída de las tasas de prevalencia e incidencia, la alta tasa de detección de casos en menores de 15 años ayuda a monitorear el endemismo (23). Los niños son más susceptibles que los adultos, dada su inmunidad incipiente y el posible contacto intrafamiliar. Epidemiológicamente, la lepra infantil es un índice de transmisión de la enfermedad en la población y permite identificar el caso índice (34). En los niños con lepra, la discapacidad es mayor conforme avanza la edad ya que los efectos sociales y psicológicos y el estigma de la enfermedad son angustiantes. Aunque las reacciones a la lepra son poco frecuentes en los niños, cuando acontecen producen la mayor parte del daño neuronal, provocando discapacidades que pueden llevar a una disminución de la calidad de vida (35). La frecuencia de aparición de la lepra en los niños es un indicador epidemiológico importante para determinar el nivel de transmisión de la enfermedad, y la detección en niños en edad escolar podría ser una estrategia valiosa para apoyar el control de la lepra y lograr el objetivo de transmisión cero (24).

Entre los casos de lepra, la DG2, definida como la presencia de daños o deformidades visibles, es usada por la OMS como un indicador fundamental para monitorear las medidas sanitarias aplicadas al control epidemiológico, juntamente con los otros indicadores. El número de nuevos casos con DG2 es imperativo para evaluar la capacidad de respuesta del sistema de salud y la carga de la lepra. La DG2 en nuevos casos indica un retraso en la detección, a menudo debido a la falta de conciencia en la comunidad de los primeros signos de lepra, retraso en la búsqueda de atención o capacidad limitada del sistema de salud para reconocer la lepra tempranamente. De los países seleccionados, Brasil reportó, en el último año, 1 504 casos de DG2 al momento del diagnóstico (7-9). Brasil y Paraguay fueron los países con mayor incidencia de DG2 durante el periodo evaluado, sin embargo, de acuerdo con los reportes oficiales de la OMS, Colombia y Argentina son los países que presentan la mayor proporción de DG2 respecto al total de nuevos casos. El retraso en el diagnóstico de los pacientes con lepra, sobre todo en casos MB, es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la discapacidad, los programas de control en muchos países priorizan la detección temprana y trabajan en la búsqueda de una herramienta que permita predecir el grado de discapacidad que se podría generar según los diferentes tiempos de retraso en el diagnóstico. Se debe destacar que también es de importancia prestar atención a los casos de discapacidad de grado 1, para tener una mejor idea de la prevalencia oculta y para que un mayor número de pacientes pueda recibir tratamiento oportuno y resolver su aún incipiente discapacidad (36).

Una de las limitaciones del presente estudio fue que todos los datos se obtuvieron de repositorios oficiales de la OMS y no de los entes nacionales de cada país, por lo que pueden contener información inconsistente en cuanto a cantidad y calidad y con presencia de datos que fueron potencialmente ignorados, incompletos y sin tomar en cuenta aspectos socioeconómicos y demográficos. Aun así, se decidió trabajar exclusivamente con esos repositorios en específico para así poder evaluar de una manera menos sesgada los parámetros elegidos.

A pesar de que en América Latina solo Brasil presenta una alta endemicidad de lepra, todos países de la región incluidos en este estudio, aunque en menor escala, aún presentan y transmiten la enfermedad y siguen mostrando casos de lepra infantil y de DG2. Sin lugar a duda, el elemento esencial que impactará sobre la transmisión de la lepra es el diagnóstico temprano. Por lo tanto, para detener la transmisión, deben mejorarse y ampliarse los programas de detección de casos en contactos domésticos y escolares, especialmente en niños menores de 15 años y en áreas endémicas. Todos estos rasgos revelan una falta de atención médica adecuada en la región afectada. Estos enfoques, asociados con la vacunación con BCG, reducen los casos nuevos en esos grupos vulnerables, ya que la vacunación se asocia con la potenciación de la respuesta inmune del individuo infectado, evitando la progresión al estado de enfermedad o su influencia en el desarrollo de la forma PB.

Por otra parte, enfoques complementarios para mejorar la vigilancia y, por consiguiente, el descubrimiento de casos infecciosos ocultos no diagnosticados que transmiten activamente la lepra, son cruciales para romper la cadena de transmisión. En Brasil, por ejemplo, se realiza la búsqueda de nuevos casos ocultos independientemente si al área es prioritaria o no, y con ello han conseguido diagnosticar casos de lepra prácticamente en todas las regiones del país.

Por ello, se recomienda la realización de campañas orientadas a la detección temprana y a la evaluación de los contactos domésticos, así como también una mejora en los servicios de atención médica que deben estar accesibles a toda la población que requiera diagnóstico y tratamiento, sin barreras geográficas, sociales, económicas o de género. Deben también diseñarse estrategias dirigidas para las personas afectadas enfocadas en la rehabilitación y establecimiento de redes destinadas al apoyo psicosocial para la disminución del sufrimiento emocional y económico, mejorando así la calidad de vida de esos pacientes.

La comprensión y el reconocimiento de la situación real de la lepra en todo el mundo es imprescindible en primer lugar. De hecho, la ausencia de casos notificados no es lo mismo que la ausencia de lepra. El número anual de casos reportados y las tasas de detección de nuevos casos reflejan en gran medida los esfuerzos actuales en la búsqueda de casos de la enfermedad, sin embargo, aún no son suficientes.

En conclusión, el presente estudio confirma la importancia de la vigilancia activa, el diagnóstico temprano y la planificación de acciones contra la enfermedad en todos nuestros países, y a menos que los ministerios de salud e instituciones correspondientes desarrollen y apoyen estrategias audaces en todos ellos, el número de nuevos casos diagnosticados podría seguir estancado o incluso, en aumento, a los números observados en la era previa a la eliminación. Sumado a esto, la situación socioeconómica de América Latina, que ya atravesaba una desventaja con respecto a países desarrollados, empeoró por causa de la pandemia de COVID-19, aumentando los índices de pobreza, la desigualdad, desocupación, y la deuda de los países, entorpeciendo la financiación y magnificando las debilidades estructurales de los sistemas de salud en la región, entorpeciendo, aún más, la tan anhelada erradicación de la enfermedad.

**Financiación.** Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Amparo e Desenvolvimento da Pesquisa (FADESP), Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESP) UFPA.

**Conflicto de intereses.** Ninguno declarado por el autor.

**Declaración.** Las opiniones expresadas en este manuscrito son responsabilidad del autor y no reflejan necesariamente los criterios ni la política de la *RPSP/PAJPH* y/o de la OPS

## REFERENCIAS

- White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:80-94. <https://doi.org/10.1128/CMR.00079-13>.
- Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJ de A, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, et al. Innate Immune Responses in Leprosy. *Front Immunol* 2018;9:518. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00518>.
- Mi Z, Liu H, Zhang F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Front Immunol* 2020;11:567. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00567>.

4. Sehgal A. *Leprosy*. Philadelphia: Chelsea House Publishers; 2006.
5. Schaub R, Avanzi C, Singh P, Paniz-Mondolfi A, Cardona-Castro N, Legua P, et al. Leprosy Transmission in Amazonian Countries: Current Status and Future Trends. *Curr Trop Med Rep* 2020;7:79–91. <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00206-1>.
6. Nunzi E, Massone C. *Leprosy: a practical guide*. Milan: Springer; 2012.
7. Fischer J, Jaled M, Olivares L, Méndez NP, Loos M. Lepra y discapacidad grado 2. Revisión de 10 años del Servicio de Dermatología del Hospital F. J. Muñiz. *Dermatol Argent* 2013;19:407–12.
8. Organización Mundial de la Salud. Hacia cero lepra (enfermedad de Hansen). Estrategia mundial contra la lepra Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional para el Sudeste Asiático; 2020. Disponible en <https://apps.who.int/iris/handle/10665/341502?locale-attribute=es&>. Acceso 22 Oct 2021.
9. World Health Organization (WHO). Leprosy global situation. *Weekly Epidemiol Record*. N° 36,2021, 96,421-444.
10. Salgado CG, Barreto JG, da Silva MB, Frade MAC, Spencer JS. What do we actually know about leprosy worldwide? *The Lancet Infectious Diseases* 2016;16:778. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30090-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30090-1).
11. Salgado CG, Barreto JG, da Silva MB, Goulart IMB, Barreto JA, de Medeiros Junior NF, et al. Are leprosy case numbers reliable? *The Lancet Infectious Diseases* 2018;18:135–7. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30012-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30012-4).
12. World Health Organization. The Global Health Observatory. Leprosy (Hansen's disease). [Internet]. Geneva:WHO;2021. Disponible en: <https://www.who.int> (who.int). Acceso 22 de octubre 2021
13. Moura MLN, Dupnik KM, Sampaio GAA, Nóbrega PFC, Jeronimo AK, do Nascimento-Filho JM, et al. Active Surveillance of Hansen's Disease (Leprosy): Importance for Case Finding among Extra-domestic Contacts. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2093. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002093>.
14. Cardona-Castro N. Leprosy in Colombia. *Curr Trop Med Rep* 2018;5:85–90. <https://doi.org/10.1007/s40475-018-0145-7>.
15. Schmitz V, Dos Santos JB. COVID-19, leprosy, and neutrophils. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 2021;15:1. 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009019>.
16. Moreno-Altamirano A, López-Moreno S, Corcho-Berdugo A. Principales medidas en epidemiología. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* 2007;45:337–48.
17. Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol* 2014;89:205–18. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>.
18. Magalhães M da CC, Iñiguez Rojas L. Evolución de la endemia de la lepra en Brasil. *Rev Bras Epidemiol* 2005;8:342–55. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2005000400003>.
19. Ribeiro MD, Silva JC, Oliveira S. Estudo epidemiológico da hanseníase no Brasil: reflexão sobre as metas de eliminação. *Rev Panam Salud Publica* 2018;1–7. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2018.42>.
20. Li Y-Y, Shakya S, Long H, Shen L-F, Kuang Y-Q. Factors Influencing Leprosy Incidence: A Comprehensive Analysis of Observations in Wenshan of China, Nepal, and Other Global Epidemic Areas. *Front Public Health* 2021;9:666307. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.666307>.
21. Lobato D da C, Neves DC de O, Xavier MB. Avaliação das ações da vigilância de contatos domiciliares de pacientes com hanseníase no Município de Igarapé-Açu, Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 2016;7:45–53. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232016000100006>.
22. Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, Richardus JH. The Missing Millions: A Threat to the Elimination of Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003658. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003658>.
23. Oliveira MBB de, Diniz LM. Leprosy among children under 15 years of age: literature review. *An Bras Dermatol* 2016;91:196–203. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20163661>.
24. Pedrosa VL, Dias LC, Galban E, Leturiondo A, Palheta J, Santos M, et al. Leprosy among schoolchildren in the Amazon region: A cross-sectional study of active search and possible source of infection by contact tracing. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:e0006261. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006261>.
25. Butlin CR, Lockwood DNJ. Changing proportions of paucibacillary leprosy cases in global leprosy case notification. *LEPROSY* 2020;91:255–61. <https://doi.org/10.47276/lr.91.3.255>.
26. Padhi T, Pradhan S. Family motivation card: An innovative tool for increasing case detection in a resource poor setting. *LEPROSY* 2020;91:255–61. <https://doi.org/10.47276/lr.91.3.255>.
27. Peters ES, Eshiet AL. Male-female (sex) differences in leprosy patients in south eastern Nigeria: females present late for diagnosis and treatment and have higher rates of deformity. *Lepr Rev* 2002;73:262–7.
28. Van Veen NHJ, Meima A, Richardus JH. The relationship between detection delay and impairment in leprosy control: a comparison of patient cohorts from Bangladesh and Ethiopia. *Lepr Rev* 2006;77:356–65.
29. Sarkar R, Pradhan S. Leprosy and women. *International Journal of Women's Dermatology* 2016;2:117–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2016.09.001>.
30. Enjuto M, Ramos JM. Lepra en mujeres: estigma y dolor. *Fonitiles, Rev leprol* 2018:271–89.
31. Neves KVRN, et al. Misdiagnosis of leprosy in Brazil in the period 2003-2017: spatial pattern and associated factors. *Acta Tropica* 2021;215:105791. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105791>.
32. Zodpey SP, Tiwari RR, Salodkar AD. Gender differentials in the social and family life of leprosy patients. *Leprosy Review* 2000;71. <https://doi.org/10.5935/0305-7518.20000053>.
33. Alves GMG, Melo GC de, Teixeira CSS, Carvalho LWT de, Tavares CM, Araújo KCGM de. Características epidemiológicas e espaço-temporal de casos novos de hanseníase em municípios do estado de Alagoas, Brasil. *RSD* 2021;10:e48510514962. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14962>.
34. Mahajan S, Sardana K, Bhushan P, Koranne RV, Mendiratta V. A study of leprosy in children, from a tertiary pediatric hospital in India. *Lepr Rev* 2006;77:160–2.
35. Romero-Montoya IM, Beltrán-Alzate JC, Ortiz-Marín DC, Díaz-Díaz A, Cardona-Castro N. Leprosy in Colombian Children and Adolescents. *Pediatric Infectious Disease Journal* 2014;33:321–2. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000057>.
36. Guerrero MI, Muvdi S, León CI. Retraso en el diagnóstico de lepra como factor pronóstico de discapacidad en una cohorte de pacientes en Colombia, 2000 - 2010. *Rev Panam Salud Publica* 2013;33:137–43. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892013000200009>.

Manuscrito recibido el 22 de octubre de 2021. Aceptado para su publicación, tras revisión, el 6 de enero de 2022.

---

## Epidemiological behavior of leprosy in several Latin American countries, 2011-2020

### ABSTRACT

**Objective.** To describe the epidemiological behavior of leprosy in several Latin American countries during 2011-2020, based on World Health Organization (WHO) indicators.

**Methods.** Cross-sectional, descriptive and quantitative study with official data on incidence and prevalence in the general population, children, clinical form and cases with grade 2 disability from WHO records between 2011 and 2020. The eight countries in Latin America that reported most cases were selected and analyses were carried out using simple descriptive and comparative statistics between different variables.

**Results.** During the study period, 301 312 cases of leprosy were reported in the selected countries: Argentina, Brazil, Colombia, Cuba, Dominican Republic, Mexico, Paraguay, and Venezuela. Brazil is the only country in the region with a prevalence greater than 1 per 10 000, representing 93.77% of all cases. Brazil and the Dominican Republic showed an increase in prevalence during 2011-2019, while in other countries the trend was decreasing. The disease is more frequent in men, and multibacillary cases significantly exceed paucibacillary ones. Brazil showed the highest incidences of cases of childhood leprosy and grade 2 disability during the evaluated period.

**Conclusion.** In Latin America, leprosy is only considered a public health problem in Brazil; however, most countries in the region continue to report cases annually, revealing a lack of adequate medical care. This study confirmed the importance of active surveillance, early diagnosis and planning of actions against the disease in all the countries evaluated with the aim of reducing its transmission.

### Keywords

Lepra; epidemiology; prevalence; endemic diseases; *Mycobacterium leprae*; Latin America.

---

---

## Comportamento epidemiológico da hanseníase em vários países da América Latina, 2011-2020

### RESUMO

**Objetivo.** Descrever o comportamento epidemiológico da hanseníase em vários países de América Latina durante 2011-2020, tomando como base os indicadores da Organização Mundial da Saúde (OMS).

**Método.** Estudo transversal, descritivo e quantitativo com dados oficiais de incidência e prevalência na população geral, em crianças, forma clínica e casos com incapacidade de grau 2 nos registros da OMS entre 2011 e 2020. Se selecionaram os oito países da América Latina que relataram a maioria dos casos e as análises foram avaliadas por meio de estatísticas descritivas e comparativas simples entre as variáveis.

**Resultados.** No período, foram notificados 301 312 casos de hanseníase nos países selecionados: Argentina, Brasil, Colômbia, Cuba, México, Paraguai, República Dominicana e Venezuela. O Brasil é o único país da região com prevalência maior que 1 por 10 000 habitantes, representando 93,77% do total de casos. O Brasil e a República Dominicana mostraram um aumento na variação da prevalência durante 2011-2019, enquanto nos demais a tendência foi decrescente. A doença é mais frequente em homens e os casos multibacilares superam significativamente os paucibacilares. O Brasil apresentou as maiores incidências de hanseníase infantil e incapacidade de grau 2 durante o período avaliado.

**Conclusão.** Na América Latina, a hanseníase só é considerada um problema de saúde pública no Brasil; no entanto, a maioria dos países da região continua notificando casos anualmente, revelando falta de assistência médica adequada. O presente estudo confirmou a importância da vigilância ativa, do diagnóstico precoce e do planejamento de ações contra a doença em todos os países avaliados, com o objetivo de reduzir e interromper a sua transmissão.

### Palavras-chave

Hanseníase; epidemiologia; prevalência; doenças endêmicas; *Mycobacterium leprae*; América Latina.

---



4. **CAPÍTULO II**

**IDENTIFICATION OF POTENTIAL BIOMARKERS OF MICRORNAS IN LEPROSY AND THEIR ROLE  
IN THE IMMUNE-PHYSIOPATHOLOGY OF THE DISEASE**

**(Identificação de potenciais biomarcadores de microRNA na hanseníase e seu papel na  
imuno-fisiopatologia da doença)**

Artigo em preparação para ser submetido na *Frontiers in Microbiology*

ISSN: 664-302X

Fator de Impacto: 6.064

Qualis: A1

# Identification of potential biomarkers of microRNAs in leprosy and their role in the immune-physiopathology of the disease

Miguel Ángel Cáceres-Durán<sup>1\*</sup>; Pablo Pinto<sup>2</sup>; Leandro Magalhães<sup>1</sup>; Tatiane Piedade de Souza<sup>1</sup>; Angelica Gobbo<sup>3</sup>; Cláudio Guedes Salgado<sup>3</sup>; Ândrea Ribeiro-dos-Santos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil

<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisas em Oncologia, UFPA, Belém, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Dermato-Imunologia, ICB, UFPA, Marituba, Brazil

\* **Correspondence:**

akelyufpa@gmail.com

**Keywords:** Leprosy, microRNA, apoptosis, autophagy, mitophagy, immune system

## Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* that affects millions of people worldwide. Despite persistent efforts to combat it leprosy remains a significant public health concern particularly in developing countries. The underlying pathophysiology of the disease is not yet fully understood hindering the development of effective treatment strategies. However, recent studies have shed light on the potential role of microRNAs (miRNAs), small non-coding RNA molecules that can regulate gene expression. This study aimed to validate a set of nine miRNAs to propose new biomarkers for early diagnosis of the disease. *Hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-1291*, *hsa-miR-144-5p*, and *hsa-miR-20a-5p* showed significant differential expression between non-leprosy group (non-LP) and leprosy group (LP), accurately discriminating between them (AUC>0.75). In addition, the miRNAs studied were also able to accurately distinguish between the various comparisons between groups and by sex. The dysregulation of the cell cycle and immune system has been linked to the development of

leprosy. In conclusion, the validation of miRNA expression reveals several miRNAs as potential biomarkers for early diagnosis and sheds new light on the disease pathogenesis.

**Keywords:** Leprosy, microRNA, apoptosis, immune system, autophagy, biomarker.

## **Introduction**

Leprosy is a neglected tropical disease of the skin and peripheral nerves caused by *Mycobacterium leprae*, presenting a strong link with the host genetic background (Fava et al., 2020). Currently, leprosy continues as a public health problem in several countries of the world being reported globally during 2021, 140.594 new cases, for a case detection rate of 17.83 per million population (WER, 2022).

The bacillus is an obligate intracellular parasite with tropism for peripheral nervous system and thus neural involvement is a feature of all forms of leprosy, has a slow replication, a long incubation period, and few genes controlling its metabolism. As a result, the disease progresses slowly over years or even decades, resulting in various clinical presentations and mimicking numerous other diseases; thus, treating this disease is extremely challenging. Specifically, *M. leprae* contains more than 3 million base pairs which leads to a dependence on the host's energy production and nutritional products, resulting in parasitic life adaptation (Akama et al., 2009; Cole et al., 2001; Oliveira et al., 2021; Soares et al., 2017).

Classification of leprosy is complex and difficult and includes clinical, histopathological, microbiological and immunological features. The Ridley-Jopling system classifies Leprosy as a spectral disease, at one extreme of the spectrum is the polar tuberculoid form (TT), characterized by a low bacterial load, primarily cell-mediated immunity, and minor production of specific antibodies; at the other extreme of the spectrum is the polar lepromatous form (LL), characterized by a high bacterial load, increased production of antibodies and lower or absent *M. leprae*-specific cell-mediated immunity. Also, there is a clinically unstable borderline spectrum between these two polar forms, borderline-tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB), and borderline-lepromatous (BL), with BB being the least stable (Ridley and Jopling, 1966).

Leprosy is a difficult disease to treat especially during the reactionary episodes. Current medications, such as corticosteroids and thalidomide, significantly disrupt homeostasis, resulting in difficult-to-control disorders such as obesity, diabetes, immunodeficiency, and teratogenesis, among others (Soares et al., 2017).

It is now well known that exposure to *M. leprae* alone is not enough to cause leprosy and only a small proportion of people exposed to the bacillus eventually develop the disease. Indeed, it is likely that a combination of numerous variables including environmental factors, pathogen load, genetic background, socioeconomic status, time of exposure to the bacillus and host immune response are related to the development of leprosy (Fava et al., 2020; Naaz et al., 2017). Currently, studies that evaluate the epigenetic role in the infection and subsequent development of the disease are beginning to emerge, and, remarkably, studies with miRNAs have advanced to several infectious diseases, including Leprosy (da Silva et al., 2022; Jorge et al., 2017; Khanizadeh et al., 2019; Salgado et al., 2018). MicroRNAs (miRNAs) are a major class of small ncRNAs found in animals, plants, and some viruses, which regulate posttranscriptional silencing of target genes at the mRNA level (Bartel, 2004; Lu and Rothenberg, 2018). These small RNAs play a significant role in modulation of an array of physiological and pathological processes ranging from embryonic development to neoplastic progression. They mostly function by binding to complementary target sequences in mRNA and interfering with the translational machinery, preventing or altering the production of the protein product. Additional studies also have shown that besides repressing translation, miRNA binding to its target mRNA also triggered the recruitment and association of mRNA decay factors, leading to mRNA destabilization, degradation, and resultant decrease in expression levels (Bhaskaran and Mohan, 2014). MiRNAs are involved in several important biological processes such as modulation of the adaptive and innate immune system, response against pathogens, cell proliferation, cell differentiation and apoptosis (Dask et al., 2016; Liu et al., 2017; Lukasik and Zielenkiewicz, 2019; Yang and Ge, 2018).

Delay in the diagnosis of leprosy can lead to the development of more advanced stages of the disease, thus increasing the chances of transmission of the infectious agent and compromising the quality of life of patients (Jorge et al., 2017). The identification of the disease remains

difficult due to the limited sensitivity of traditional approaches based on bacillary counts of skin smears and histology (Sharma and Pushpendra, 2022). Molecular techniques using PCR technology and serological tests were developed; but sensitivity and specificity were limited, because household contacts of leprosy patients, as individuals remaining without disease may present positive PCR and/or PGL1 (Carvalho et al., 2018; Jorge et al., 2017; van Hooij et al., 2016). In this sense, identification of new biomarkers is needed for the early diagnosis of leprosy, as well as to discriminate the different forms of the disease. Recently, our group presented the first leprosy miRNome from skin lesions and blood in leprosy patients (Salgado et al., 2018), finding several miRNAs with significant differential expression. For this reason, in this work we validated these differentially expressed miRNAs in blood samples from patients and household contacts in order to propose new leprosy biomarkers for early diagnosis of the disease.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Biological samples**

In total, 108 blood samples were collected from 49 non-consanguineous and healthy household contacts of leprosy patients, named as non-leprosy group (non-LP); and 59 leprosy patients (LP) as follows: 33 from tuberculoid-tuberculoid (TT) and borderline tuberculoid (BT) form, and 26 from lepromatous-lepromatous (LL) and borderline lepromatous (BL) form. All patient samples were obtained before starting MDT treatment at URE Dr. Marcello Candia, in Marituba, Pará, Brazil. All samples were stored in RNAlater (SIGMA R0901) and frozen at -80 °C immediately after collection. This study adhered to the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of Institute of Health Sciences at the Federal University of Pará (26765414.0.0000.0018). Informed consent was obtained from all individual participants.

### **2.2 RNA isolation and RT-qPCR**

Total RNA was isolated from peripheral blood using TRIzol reagent (ThermoFisher, Waltham, MA, USA, catalog #15596018), according to manufacturer's instructions.

The purity and concentration of RNA samples were measured using the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA samples that achieved adequate purity ratios ( $A_{260}/A_{280} = 1.9\text{--}2.1$ ) were used for subsequent analyses. RNA integrity was also checked on 1% agarose gels containing SYBR® DNA gel stain (Invitrogen). cDNA synthesis was performed with at least 50 ng of RNA input and random hexamers using GoTaq® 2 step RT-qPCR Systems (Promega, Madison, WI, USA, catalog #A6010).

Quantitative real-time PCR was conducted in an AriaMx Real-time PCR System – Agilent, using GoTaq® 2 step RT-qPCR Systems (Promega, Madison, WI, USA, catalog #A6010). The real-time PCR assays were performed in a final volume of 10µl. Reactions consisted of 2 ng of cDNA, 250 nM of each forward and reverse primers, and 5 µL of qPCR master mix in thermal cycling conditions provided by the manufacturer. Primers utilized are listed in Supplementary Table 1. Expression levels were normalized using RNU6B and RNU24 as endogenous control. All qPCR experiments were conducted in triplicates.

### **2.3 Statistical Analysis**

The expression data of miRNAs for each sample were normalized to RNU6B e RNU24, using the comparative Ct method ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Smittgen and Livak, 2008). Ct values > 35 were considered undetectable. Shapiro-Wilk test was used to verify if the normalized expression values followed a Gaussian distribution. T-test and Wilcoxon test were used to compare the miRNA expression differences in each condition and  $p$ -values  $\leq 0.05$  were considered to be statistically significant. All tests and graphs were performed in RStudio statistical software (ver. 4.2.2).

### **2.4 Receiver operating characteristic (ROC)**

In order to verify if miRNAs expression was able to distinguish between non-LP from LP, Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and Area Under the Curve (AUC) were calculated using the pROC package in RStudio statistical software (ver. 4.2.2), and miRNAs that showed an AUC > 0.75 were considered to be good potential biomarkers.

## 2.5 Search for target driver genes and functional analysis

The target driver genes of the studied miRNAs were searched in the miRTarBase public database (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>) (Chou et al., 2016), using just interactions experimentally validated by strong evidence (RT-qPCR, Luciferase reporter assay, Western blot and Microarray). Identification of genes that are regulated by at least two miRNAs in common, among the nine studied and with statistical significance, was made using MiRTargetLink tool (Hamberg et al., 2016). Enrichment analysis of differentially expressed miRNAs and shared genes were conducted in KEGG and Gene Ontology (Ashburner, et al., 2021; The Gene Ontology Consortium, 2020). Interaction networks and enriched pathways were constructed using `cnetplot()` function in R or Cytoscape v.3.9.1 (Shannon et al., 2003).

## 3 Results

### 3.1 Samples characteristics.

A total of 108 individual samples were recruited for this study. After clinical and histopathological assessments, bacilloscopy and qPCR, all the LP were classified according to Ridley and Jopling's criteria of disease and reactions, 33 BT-TT patients and 26 BL-LL patients. The 49 non-LP samples were obtained from healthy household contacts and tested negative for all tests for leprosy. There were no significant differences between LP and non-LP in sex ( $P > 0.05$ ,  $\chi^2$  test) but, there were in terms of age ( $P \leq 0.05$ , Wilcoxon test) (Table 1). BL-LL patients had positive bacilloscopy, while BT-TT patients had negative bacilloscopy which is in accordance with the expected characteristics of these leprosy subforms. Only three BT-TT samples were non-reactive to detection of antibodies against phenolic glycolipid I (PGL1) and four BL-LL samples were undetermined for qPCR (Table 1).

### 3.2 Expression profile of miRNAs in blood samples and evaluation of their potential as biomarker

Of all nine miRNAs studied, seven (*hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-1291*, *hsa-miR-144-5p*, *hsa-miR-15a-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p* and *hsa-miR-26b-5p*) were significantly

upregulated in LP ( $p \leq 0.05$ ) (Figure 1A). *Hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-1291*, *hsa-miR-144-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p* and *hsa-miR-26b-5p* were upregulated in both poles and *hsa-miR-144-5p* was upregulated in BL-LL form when compared with BT-TT pole. (Figure 1B). Similarly, these seven microRNAs were upregulated in male and female LP ( $p \leq 0.05$ ). In male patients, *hsa-miR-1291* was upregulated in both poles ( $p \leq 0.05$ ) (Figure S1A). Likewise, *hsa-miR-144-5p* and *hsa-miR-20a-5p* were upregulated in BL-LL pole ( $p \leq 0.05$ ). *Has-miR-15a-5p* was shown to be downregulated in leprosy patients, without statistical significance. In female patients, *hsa-106b-5p*, *hsa-miR-144-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p* and *has-miR-26b-5p* were all upregulated at both poles ( $p \leq 0.05$ ). Furthermore, all these miRNAs, except *hsa-miR-106b-5p*, were more upregulated in BL-LL pole when compared to BT-TT pole ( $p \leq 0.05$ ) (Figure S1B). The expression values ( $2^{-\Delta Ct}$ ) and Fold Change values are presented in Table S2 and S3 in the supplemental material.

In LP, miRNA expression comparisons were also made for two of the diagnostic methods used: Anti-PGL1 ( $>0.295$  and  $<0.295$ ) (Gobbo et al., 2022) and RLEP-qPCR ( $Ct >35$  and  $<35$ ) (Silva et al., 2018; Silva et al., 2021) finding that *hsa-miR-20a-5p* was significantly upregulated in patients with PGL1 values  $>0.295$  (Figure S3A). However, when the expression of the miRNAs was compared according to sex, it was found no significant expression in male patients, but in female patients, four miRNAs, *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p* and *hsa-miR-26b-5p*, were significantly upregulated in patients with PGL1  $> 0.295$  (Figure S3B). For RLEP-qPCR, only *hsa-miR-15a-5p* showed significant upregulated in patients with  $Ct >35$  compared to  $Ct <35$  (Figure S4). No miRNA was differentially expressed when comparisons were made according to sex.

*Has-miR-16-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, *has-miR-1291*, *hsa-miR-144-5p* and *hsa-miR-20a-5p*, were able to discriminate, with great accuracy, between non-LP and LP ( $AUC > 0.75$ ) (Figure 2A) and between non-LP and BL-LL pole (Figure 2B). *Hsa-miR-106b-5p*, *has-miR-1291*, *hsa-miR-144-5p* and *hsa-miR-20a-5p* were able to discriminate, with great accuracy, between non-LP and BT-TT pole ( $AUC > 0.75$ ) (Figure 2C). Comparisons between BT-TT and BL-LL poles, only showed *hsa-miR-144-5p* with  $AUC > 0.75$  (Figure 2D). Same comparisons were performed by sex and they are showed in Tables S4 and S5.



MiRNAs that showed a significant differential expression between all comparisons and with an AUC>0.75, were proposed as possible diagnostic biomarkers for leprosy, and they are highlighted with a green checkmark in Table 2 and Tables S4 and S5.

### **3.3 Target gene identification**

Genes that are regulated by at least two miRNAs with significant differential expression between non-LP and LP were investigated using MiRTargetLink tool, founding in total 43 regulated genes (Table 4). Enrichment analyzes showed processes that are related mainly to the development to cell cycle and several pathways that are related to leprosy such as apoptosis, autophagy/mitophagy, and immune system like Th1, Th2 and Th17 cell differentiation (Figure 3A and 3B). Interaction networks between miRNAs and genes also was constructed using Cytoscape v.3.9.1 (Figure 3C).

## **4. Discussion**

Strong evidence suggests that circulating miRNAs could play an essential role as biomarkers in several types of cancer (Chen et al., 2019; Filipów et al., 2019; Hasanzadeh et al., 2019; O'Bryan et al.; Wang et al., 2016), cardiovascular disease (Cheng et al., 2014; Corsten et al., 2010; Wang et al., 2017), infectious diseases (Kaur et al., 2018; Furci et al., 2013; Poore et al., 2018; Silva et al., 2021) neurology for the diagnosis and prognosis of Alzheimer's disease (Wiedrick et al., 2019) between others, being a promising tool for diagnosis and prognosis of various diseases. Despite present limitations, use miRNAs as biomarkers for several conditions remain an impressive research field. Leprosy is a slow onset disease and the symptoms are difficult to observe at the early stages of infection.

Generally, leprosy diagnosis is late and there are few research groups or health professionals capable of making an early diagnosis. Diagnosis delay can lead to the development of the most advanced stages of the disease, thus increasing the probabilities of transmission of the infectious agent and committing the quality of life of those affected by the disease. For this reason, the

study of miRNAs, and pathways that they are involved can generate new knowledge to understand the complex genetic and immune regulation of leprosy, thus directing new approaches to prevention, diagnosis and treatment, through the use of miRNAs as possible biomarkers of the disease. Our study found that *hsa-miR-144-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-1291* and *hsa-miR-106b-5p* are good candidates for leprosy early biomarkers. In addition, several evaluated miRNAs are capable of accurately distinguishing between various of the comparisons characterized in this study (Table 2, Table S4 and S5).

Besides, *hsa-miR-20a-5p* was upregulated in LP with Anti-PGL1 > 0.295, and *hsa-miR-106b-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p* and *hsa-miR-26b-5p* were significantly upregulated in female LP with PGL1 > 0.295. The PGL1 fraction is part of the cell envelope of *M. leprae* and induces the production of the humoral specific response against PGL1 detected in serum of patients (Foss et al., 1993). When the antibody is present at high levels the infection can be supposed to be active, particularly during reactional episodes, which constitute a very common complication in the evolution of leprosy (Goulart et al., 2002). Therefore, these miRNAs could also act as biomarkers for the active form and for reactive episodes of the disease. For RLEP-qPCR, *hsa-miR-15a-5p* showed significant upregulated in LP with Ct >35 compared to Ct <35. Lower Cts values generally belong to multibacillary cases, while higher Cts values to paucibacillary cases (Azevedo et al., 2017; Gobbo et al., 2022). *Has-miR-15a-5p* showed lower expression (although without statistical significance) in BL-LL patients, when compared to BT-TT patients, so its potential use as biomarker to discriminate between the poles of the disease may be considered.

Household contacts of leprosy patients constitute a population of risk to be monitored for the early detection of leprosy (Cardona-Castro et al., 2005). Several studies in Brazil have detected cases of leprosy in asymptomatic household contacts. One of them detected a high frequency of *M. Leprae* in 23.89% of asymptomatic home contacts evaluated by RLEP-qPCR (Gama et al., 2018). Another study reported an increase of 16 times in the new case detection rate after active search, training and examination for expert professionals in low endemicity areas (Bernardes et al., 2017). It was also found that prevalence in schoolchildren, in endemic areas of Amazonian populations, was 17 times greater than the officially reported rate (Pedrosa et al., 2018). Official

data from Brazil show that about 50% of the population living in 19 of the 27 states are exposed to either high or hyperendemic rates of infection. The estimated number of hidden cases of leprosy is likely to be up to eight times higher than the prevalence in the area at any given time (Salgado et al., 2018). Additionally, there have been limited studies evaluating the genetic and epigenetic profile of household contacts. Consequently, it is imperative to conduct further evaluation to identify new early diagnostic biomarkers as well as potential therapeutic targets.

### **Sex bias in leprosy**

In general, a male preponderance over female has been reported in various epidemiological studies on leprosy, although in recent years the difference between sex has decreased (Cáceres-Durán, 2022; Padhi and Pradhan, 2015; Peters and Eshiet, 2002; Van Veen et al., 2006). Several factors traditionally attributed to women, especially in countries like India, such as low status, more limited mobility, analphabetism, and poor knowledge of the disease, could be responsible for the underreporting of cases of women affected by leprosy (Sarkar and Pradhan, 2016). The genetic background between men and women may also be involved in the immune response against *M. leprae*. To date, no large-scale study has reported the contribution of genetic factors to sex bias in leprosy. Although social and behavioral factors could contribute to male bias in leprosy, the role of variants in sex chromosomes has not been studied (Fava et al., 2020). Sex chromosomes are generally not analyzed by GWAS due to various factors. However, X chromosome is known to carry several genes related to the immune system that could contribute to sexual bias in leprosy (Jaillon et al., 2019). A study in Brazil found that polymorphisms in the *TLRI* gene were associated with greater protection against leprosy in females (Alvarenga et al., 2018). Another study, also in Brazil, associated polymorphisms in *TNF $\alpha$*  gene as protector against LL pole in women. Increased production of TNF $\alpha$  results from decrease in IL-10, a proinflammatory cytokine that inhibits synthesis of anti-inflammatory cytokines and activation of T cells (Santos et al, 2002). Because of this sex bias it would be important to find sex-specific diagnostic biomarkers for leprosy.

Our study showed, for the first time, a differential expression of miRNAs by sex in leprosy patients. Although there was no statistical significance, *has-miR-126-5p*, *has-15a-5p* and *has-*

*let7f-5p* were downregulated in male LP. In addition, the expression of *hsa-miR-1291* was significantly more elevated in male LP patients than in females LP, suggesting it as a potential specific biomarker for males. It was predicted that this miRNA would regulate the AQP1 gene and that SNP increases the affinity of *has-miR-1291* resulting in a decrease in AQP1 gene expression (Fábrega et al., 2011). AQP1 can also be involved in hydration and skin dryness and loss of elasticity, which are well known signs of leprosy and may be involved in the loss of sensation or leprosy pain, but with unrecognized physiopathology (Verkman et al., 2005; Salgado et al., 2018).

In females, *hsa-miR-144-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, and *hsa-miR-16-5p* appear to have the best potential as biomarkers to discriminate between the comparisons (Table S5). This result coincides with those previously published by Salgado et al (2018), where the differentially expressed miRNAs were downregulated. It should be noted that all samples sequenced in the miRnoma were from male patients. The expression of miRNAs in leprosy patients was found to be differentially regulated between males and females which may contribute to the sexual bias observed in this disease. This sexual bias could also be influenced by the hormonal dependence of *M. leprae*, or by hormonal imbalances during the disease (Reè et al., 1981). In fact, individuals with the LL form of leprosy often present alterations in various endocrine and sexual hormones, which could be related to the disease's progression (Dabi et al., 2022). Therefore, the crosstalk between sex hormones and immune effectors emerges as one of the main candidate drivers of gender differences in infectious disease susceptibility, as previously reported (Guerra-Silveira, Abad-Franch, 2013).

### **Apoptosis, autophagy, mitophagy and cell cycle are dysregulated in LP**

Functional enrichment analysis revealed participation of pathways involved in apoptosis, autophagy and mitophagy. Although the role of apoptosis during *M. Leprae* infection is not yet clear, this is a defense mechanism against pathogens. There are studies that demonstrate pro-apoptotic effects (Ajith et al., 2005; Hernandez et al., 2003, Quaresma et al., 2010; Quaresma et al., 2014) and others that demonstrate anti-apoptotic effects (Hasan et al., 2006; Rodrigues et al., 2010). In addition, there also are studies that suggest a modulation of apoptosis mechanisms in

the spectrum of the disease with low levels of apoptosis in the LL pole and high levels in the TT pole (de Souza et al., 2010). Comparisons of lesions between polar forms revealed that apoptosis is more frequent in TT patients suggesting that activation of apoptosis could act containing the multiplication of mycobacteria (Walsh et al., 2004). High levels of apoptosis could favor the control of the bacillary load observed in TT patients and low apoptosis rate in LL patients could contribute to the persistence of mycobacteria (Ajith et al., 2005). MiRNAs that regulate anti-apoptotic genes such as *BCL2* and *AKT3* were found to be upregulated in LP, which could be associated with a pro-apoptotic state. In particular, when comparing the expression of miRNAs between the two poles, *hsa-miR-15a-5p* showed a 4-fold lower expression in BL-LL form, suggesting a lower downregulation of its target genes *BCL2* and *AKT3* in these patients. This might result in an anti-apoptotic profile in this pole which is associated with a decrease in immune response. Conversely, it was found that *hsa-miR-16-5p* expression, that also regulates *BCL2* and *AKT3*, was increased by 10-fold in the BL-LL pole, which may contribute to a pro-apoptotic profile in these patients. Also, AKT inhibits the expression of proapoptotic genes *YAP1* and *FOXO3*, while stimulating the expression of the antiapoptotic gene *MDM4* (Salgado et al., 2018). *YAP1* is also targeted by *hsa-miR-15a-5p* and *hsa-miR-16-5p*. This deregulation leads to a lack of control in the apoptosis related pathways in LP (Figure 4).

In addition to this, *BCL2L11* gene, which encodes a member of the BCL2 family that promotes apoptosis (O'connor, 1998), is regulated by *hsa-miR-20a-5p*. This miRNA was found to be expressed 12-fold higher in the BL-LL form leading to an anti-apoptotic state in this form, which is associated with a less effective immune response. Bim protein is a crucial factor in initiating apoptosis and shaping immune responses. (Sionov et al., 2015). Additionally, by inhibiting *SMAD4* and *SMAD7*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-106b-5p* and *hsa-miR-144-5p* could inhibit apoptosis by activating the TGF- $\beta$  signaling pathway (Yao et al., 2018; Zou, 2011). Notably, *hsa-miR-144-5p* was found to be expressed 38-fold higher in BL-LL form. Besides, *VEGFR2* is recognized for its involvement in *Mycobacterium. tuberculosis (Mtb)* dissemination by inducing angiogenesis, whereas *VEGFA*, its corresponding ligand (Salgado et al., 2018) is targeted by *hsa-miR-15a-5p*, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-106b-5p*, playing an important role in the regulation of apoptosis. Upon *M. leprae* infection, *IFGRI*, the receptor of *IGF1*, is

activated in macrophages and Schwann cells, which in turn inhibits apoptosis and promotes cell survival. This leads to the production and secretion of IGF, which further stimulates cell survival and pathogen proliferation (Batista-Silva et al., 2016). In general, all these findings indicate a dysregulation at various levels in the apoptosis process in leprosy patients (Figure 4).

Autophagy has been associated with immune responses against intracellular pathogens such as *Mtb* and it can be induced by IFN- $\gamma$  to inhibit intracellular survival of mycobacteria (Harris et al., 2009). *Hsa-miR-15a-5p* and *hsa-miR-16-5p* regulate *IFNG* gene affecting the process of autophagy. Conversely, Th2 cytokines IL-4 and IL-13 inhibit autophagy in macrophages (Harris et al., 2009). The role of autophagy in the immunopathogenesis of leprosy is not fully understood but *M. leprae* infection can alter host cell autophagy as an immune escape mechanism. Proinflammatory cytokines can induce autophagy in TT pole lesions, while BCL2 family members can alter autophagy induction in LL pole lesions (Silva et al., 2017). Studies have shown that T1R patients had hypo-regulation of autophagy associated with hyper-regulation of *TLR2* and *MLST8* (de Mattos Barbosa et al., 2018).

Mitophagy is important for the removal of redundant and damaged mitochondria to maintain cell survival and viability in response to injury, trauma, and infection. Ineffective removal of damaged mitochondria can cause chronic systemic inflammation and the development of inflammatory diseases (Gkikas et al., 2018). *HIF1A*, a transcription factor that responds to low oxygen availability and plays a regulatory role in response to a variety of molecular signals of infection and inflammation and induce autophagy (Gladek et al., 2017; Santos and Andrade, 2017), is targeted by *hsa-miR-20a-5p* and *hsa-miR-106b-5p* in LP. As previously mentioned, *hsa-miR-20a-5p* was found to be increased 12-fold in the BL-LL pole, thereby altering mitophagy in these patients. Mitochondrias are known to play a role in the immune response and have been implicated in various infectious diseases, including mycobacterial infections (Sousa and Cavalcante, 2022). Furthermore, mitophagy also plays a role in the differentiation of M1 or M2 macrophages, which could provide a link between the immune response and the metabolic phenotype observed in leprosy. Additionally, mitochondrias play a role in the nerve damage detected in leprosy patients (van Hooij and Annemieke, 2021).

Cell cycle regulation is a crucial process for maintaining proper cellular function. *AKT3* plays a vital role in this process, as well as in apoptosis (Chang et al., 2014; Chang et al., 2015; Wang et al., 2017). It was showed that that overexpression of *has-miR-16-5p* and knockdown of *AKT3* led to a significantly decreased number of cells in the S phase and a significantly increased number of cells in the G0/G1 phase, coinciding with the suppression of cell survival (Wang et al., 2020). Additionally, disruption of *AKT3* has been shown to significantly reduce neuron viability and axon length and can actively participate in neuronal death and pathologies associated with uncontrolled cell growth (Diez et al., 2012). Impairment of nerve function in leprosy often results in chronic deformities and disabilities. Cumulative nerve damage affects sensory, motor, and autonomic systems, and is typically characterized by nerve enlargement. LL patients with clinical nerve function impairment are at a high risk of further nerve function deterioration (Wilder-Smith and Wandosell, 2008).

Other genes related to cell cycle are targeted by several miRNAs studied. The tumor suppressor gene *PTEN* is targeting by *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-26b-5p* and *hsa-miR-106b-5p*. This gene is involved in critical cellular processes such as survival, proliferation, energy metabolism and cellular architecture (Song et al., 2012, Huang et al., 2012). *Hsa-miR-15a-5p* and *hsa-miR-16-5p*, have been found to target the *TP53* gene, which is not only crucial for the immune response but it also plays a role in antibacterial activity. As well, it was showed that inhibition of *IGF1R* reduces *TP53* and *MDM2* translation through a gene-specific mechanism (Xiong et al., 2007). *IGF1R* is targeting by *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-26b-5p* which also leads to downregulation of the *TP53* gene in LP affecting apoptosis (Figure 4). These miRNAs were increased by 10 and 15-fold, respectively, in the BL-LL pole. A study on *Mtb* found that *TP53*-deficient macrophages failed to control the mycobacteria, manifesting in a lower rate of apoptosis and greater intracellular survival of the pathogen (Lim et al., 2020). In addition, the *PI3K/AKT/PTEN* signaling pathway plays a role in regulation of apoptosis and autophagy (Paul-Samojedny et al., 2015).

Cyclins (*CCND1*, *CCND2* and *CCNE1*), cyclin-dependent kinases (*CDKN1A* and *CDK6*) and *RBI* are also being target of several miRNAs studied. All of them contribute to activation of downstream *E2F* transcription factors, which in turn can cause uncontrolled cell proliferation

and ectopic cell divisions (Johnson et al., 2016). *E2F* targets are involved in cell cycle regulation, glycolysis, fatty acid metabolism and mitochondrial functions (Bracken et al., 2004; Benevolenskaya and Frolov, 2015).

Overall, this evidence suggests that leprosy disrupts the cell cycle at various stages and may also modulate apoptosis, autophagy, and mitophagy, potentially contributing to pathogen survival.

### **Immune effector cells activation**

For a long time, the main interpretation of the host defense response was based on the characterization of the Th1/Th2 paradigm. However, new approaches have emerged that have changed the interpretation of this paradigm in the polar forms of the disease, especially with the identification of other subtypes of T lymphocytes such as Th9, Th17, Th22 and Tregs (de Sousa et al., 2017). Precisely, Th1-Th2 and Th17 differentiation pathways were shown to be enriched in our study with several genes being regulated by miRNAs evaluated. *IFNG* is targeted by *hsa-miR16-5p*, that presented a 10-fold higher expression in BL-LL patients than in BT-TT patients. A greater production of IFN- $\gamma$  has been demonstrated in BT-TT individuals during primary response to infection by *M. leprae* (de Almeida-Neto et al., 2015). Several studies have reported that IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  have an important role in immune protection. IFN- $\gamma$  activates antimicrobial mechanisms, inducing inducible NO synthase production, leading to production of nitric oxide, an important microbicide that destroys the bacillus by releasing free radicals (Moubasher et al., 1998). IFN- $\gamma$  also induces macrophages to produce TNF- $\alpha$ , leading to activation of these same cells. It has been shown that TNF- $\alpha$  is present in serum of BT-TT patients and absent in serum of BL-LL patients, indicating that bacillus destruction and granuloma formation must be related to presence of this cytokine (Murray et al., 1985; Madan et al., 2011).

LL form is associated with a greater number of lesions with presence of foamy macrophages and globes. There is a predominance of a Th2 lymphocyte response in this polar form which



induces the production of cytokines such as IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  that inactivate the microbicidal response of macrophages facilitating the bacillus survival. This type of response produced by Th2 cells negatively regulates the Th1 response by inhibiting the microbicidal response of macrophages at this pole (de Sousa et al., 2017).

Participation of Th17 cells and their main product IL-17 in immunology of leprosy was confirmed. Some studies reported the presence of Th17 in ENL reactions expressing low IL-17 in the skin (Martiniuk et al., 2012). Others studies have reported that the IL-17F isomer is associated with reversal reactions of leprosy (Chaitanya et al., 2012). It was also reported that Th17 cells with the IL-17A signature and its IL-17C, D, F, E, and RORC isoforms are more associated with BT-TT form both in skin lesions and in PBMC cultures induced by *M. leprae*, suggesting its differential role in patients (Saini et al., 2013). Also, a positive correlation between IFN- $\gamma$  and IL-17 was established, as well as the differentiation of the frequency of these cells between TT and LL individuals (de Almeida-Neto et al., 2015).

Upregulated miRNAs *hsa-miR-20a-5p* and *hsa-miR-106b-5p* control *SMAD7* gene and *hsa-miR-15a-5p* and *hsa-16-5p* control *CHUK* gene. Low levels of *SMAD7* may result in an increase in *TGFBRI* gene, with more TGF- $\beta$  capture contributing to the immunosuppressive profile in LP. *CHUK* inhibits the NF- $\kappa$ B1 and COX2 inflammatory pathway (Salgado et al., 2018) (Figure 4).

Of the nine miRNAs evaluated, *hsa-let7f-5p* was the only one that was shown to be downregulated (although with not statistical significance) in LP. Studies in *Mtb*-infected macrophages also revealed this RNA being downregulated. *Has-let-7f-5p* targets A20, a feedback inhibitor of the NF- $\kappa$ B pathway. It was shown that *Mtb*-infected mice have a lower expression of *hsa-let7f* and a higher expression of A20 during infection progression. Macrophages with decreased expression of A20 showed reduced survival of *Mtb* and concomitantly produced lower levels of TNF, IL-1B, and nitrites (Kumar et al., 2016). These observations suggest that a comparable mechanism may also be involved in the pathogenesis of leprosy.

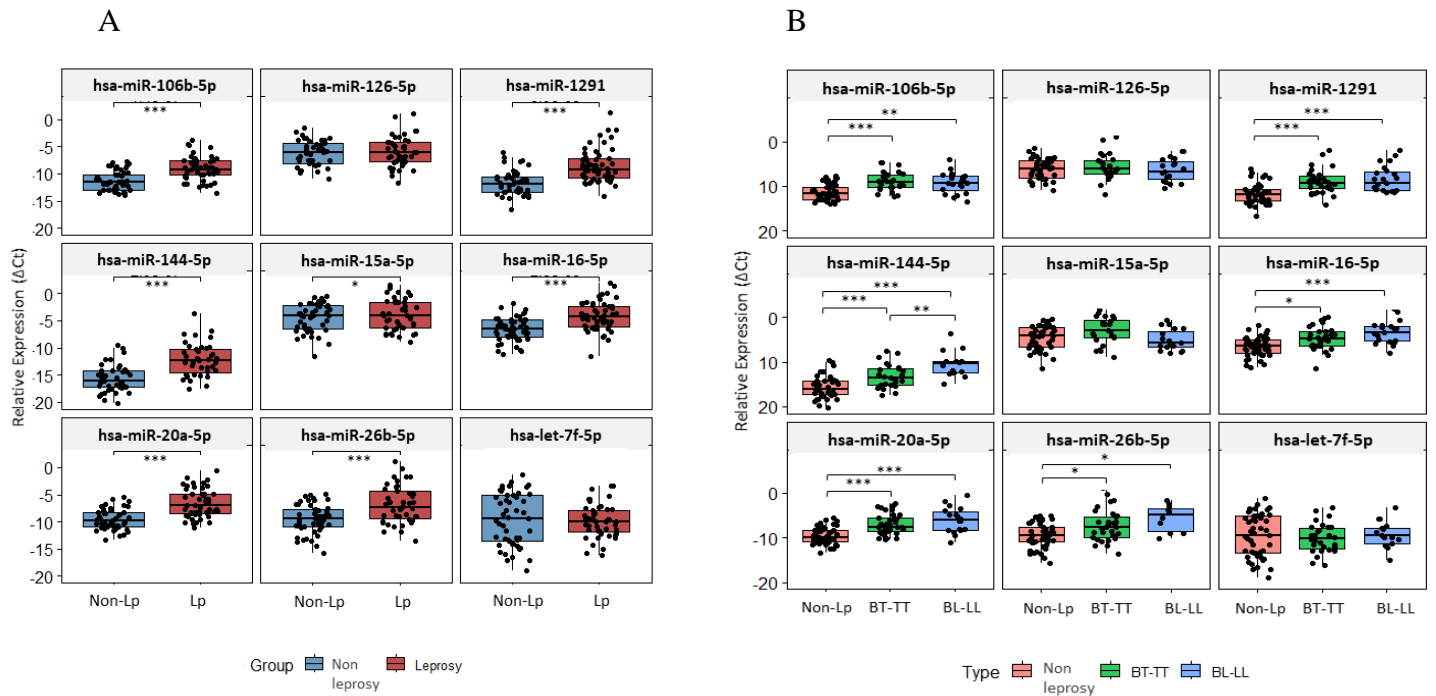
## 5. Final considerations

A good diagnostic test will recognize *M. leprae* infected people at risk of developing diseases or leading to their spread. Hence, identification of new blood-based biomarker in leprosy is a need to also switch from leprosy management to prevention of infection. The advantages of blood biomarkers lie in their high accessibility and practicality as blood is an easily obtainable and non-invasive sample compared to a skin or nerve biopsy. This makes blood biomarkers a valuable tool for leprosy diagnosis especially in the early stages for patients who are asymptomatic.

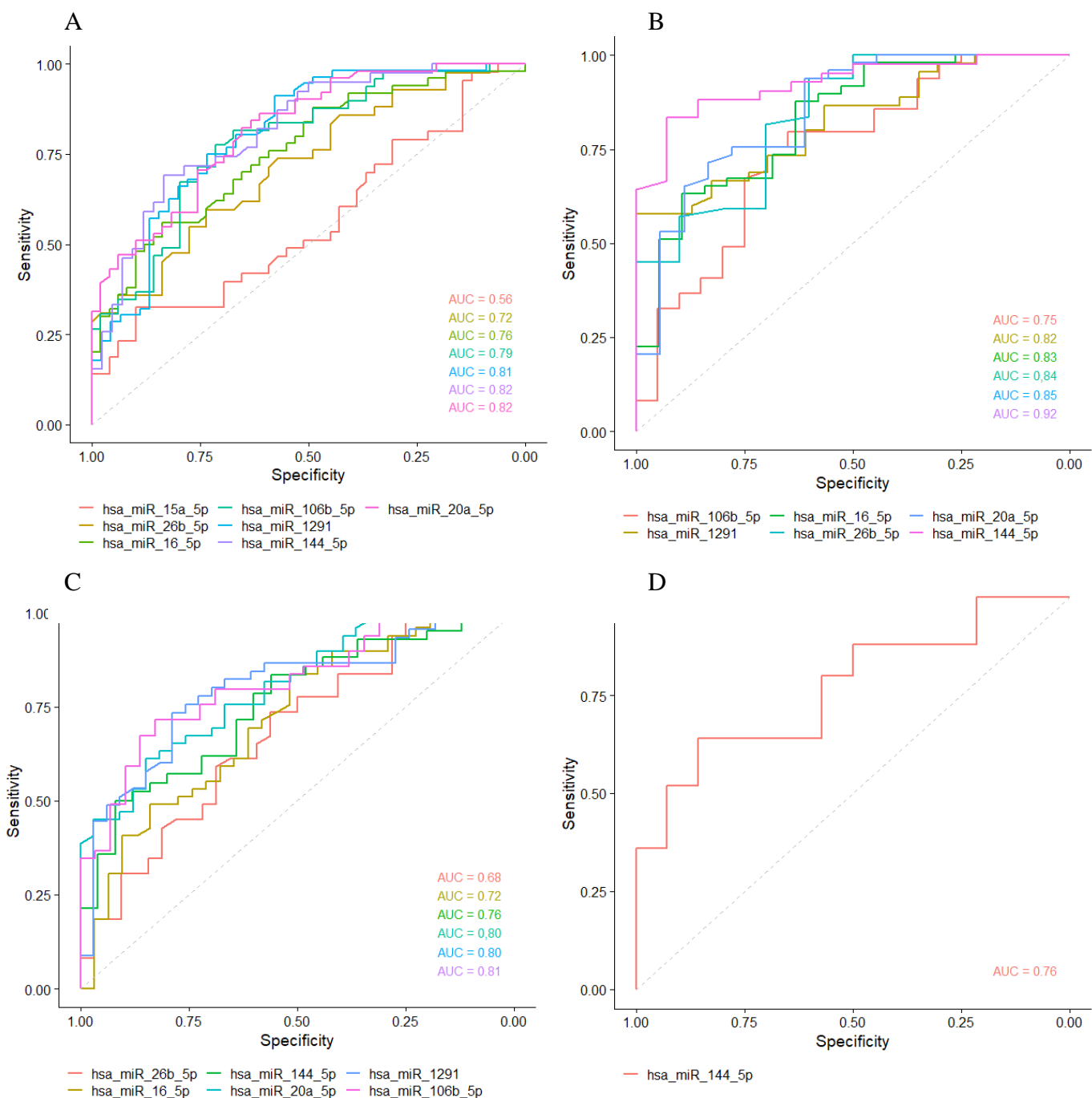
In conclusion, it is known that altered expression of miRNAs occurs in various types of diseases, cancer being one of the most studied. Research has provided a better understanding of pathophysiological mechanisms of different diseases at the molecular level, some of which have shown peculiar patterns in miRNA expression that allow their molecular classification. In addition, differential expression of these molecules in diseases have been object of study for search new biomarkers with prognostic, diagnostic and therapeutic potential. However, studies with miRNAs in infectious diseases are emerging, they are still not enough, mainly in leprosy. We found that *hsa-miR-144-5p*, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-1291* and *hsa-miR-106b-5p* are potential candidates for leprosy early biomarkers. These miRNAs seem to play an important role in the pathogenesis of the disease and could be used as new biomarkers for early diagnosis in order to decrease or stop its transmission and prevent the development of the most advanced stages of the disease.

Limitations: the present work presents a preliminary study of the modulation of miRNAs as a component of the host response. One of the limitations of our study was not considering the comorbidities of the participants, since many of them were unaware of the presence of other possible diseases that they might be suffering. Other forms of leprosy were not included in our study due to the low number of samples obtained. In addition, a larger number of samples is necessary to establish a better relationship between the miRNAs evaluated and the development of the disease.

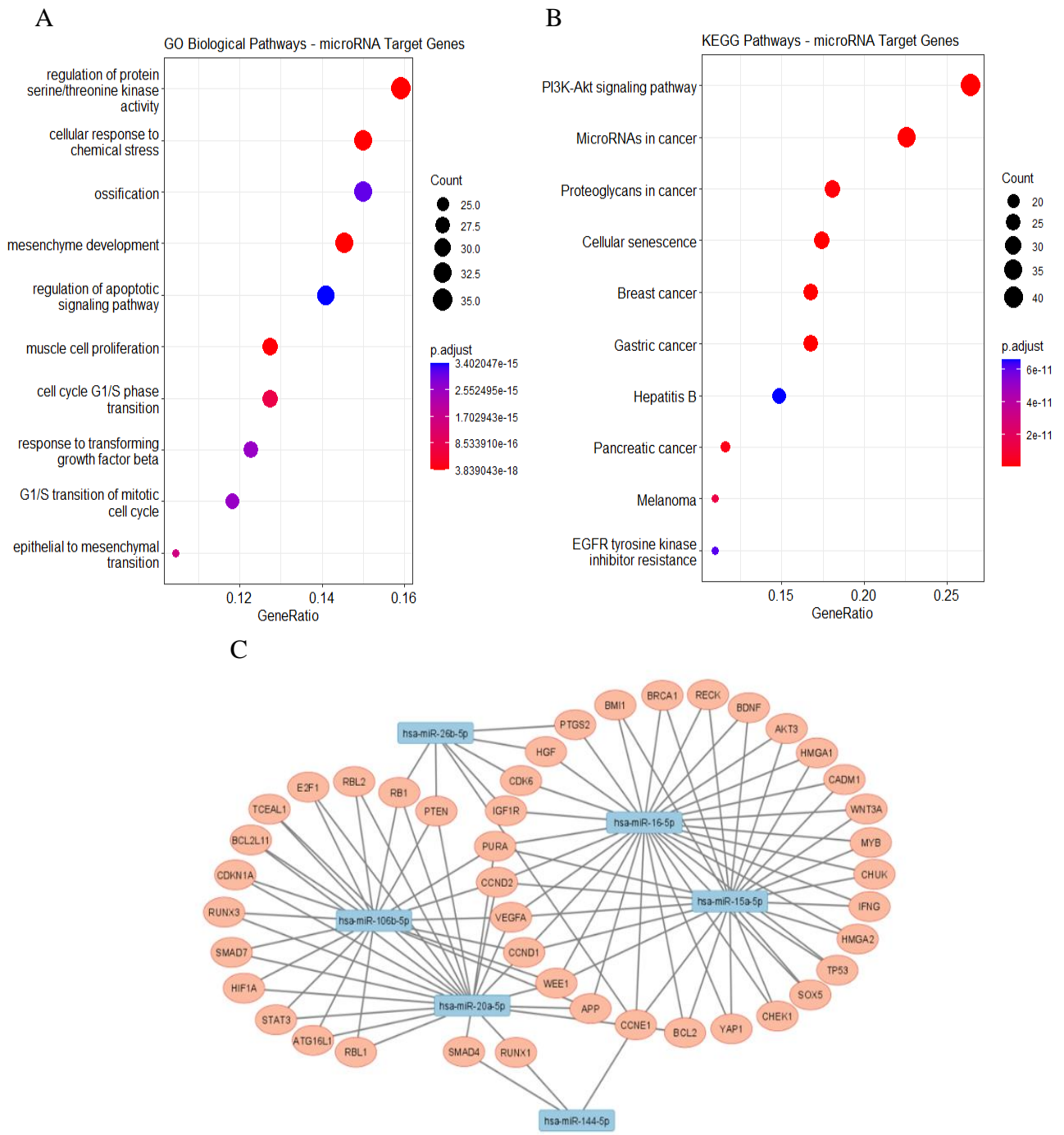
## Figures



**Figure 1.** Expression level of studied miRNAs. A) Expression level of miRNAs between non-LP and LP. B) Expression level of miRNAs between non-LP and BT-TT and BL-LL poles. \*p-value < 0.05; \*\*p-value < 0.001; \*\*\*p-value < 0.0001; p-value adjusted by FDR correction.

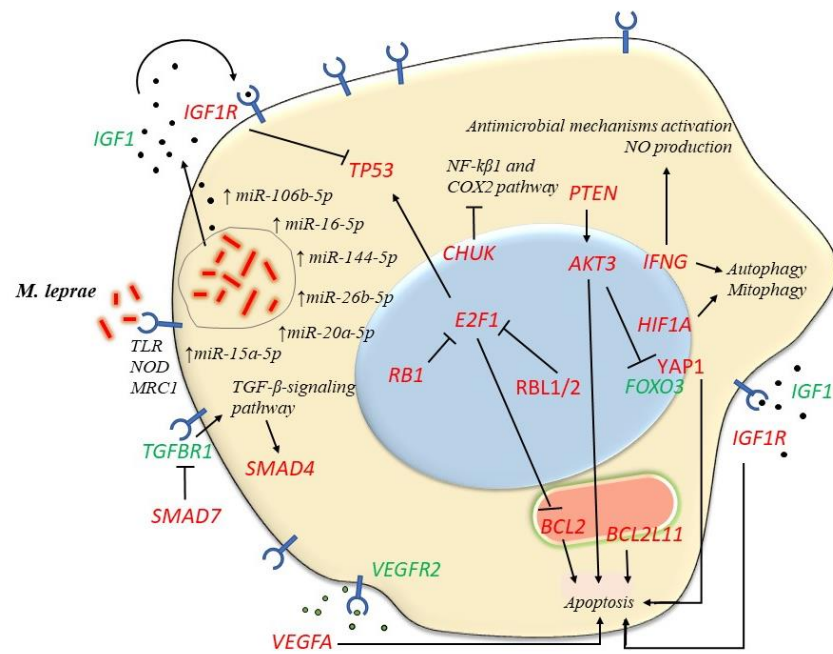


**Figure 2.** ROC curves of studied miRNAs with statistically significant expression between the groups. Area Under the Curve (AUC) with at least 0.75 was considered as good ability in discriminating between comparisons. A) ROC curve between non-LP and LP. B) ROC curve between non-LP and BL-LL pole. C) ROC curve between non-LP and BT-TT pole. D) ROC curve between BT-TT and BL-LL poles.

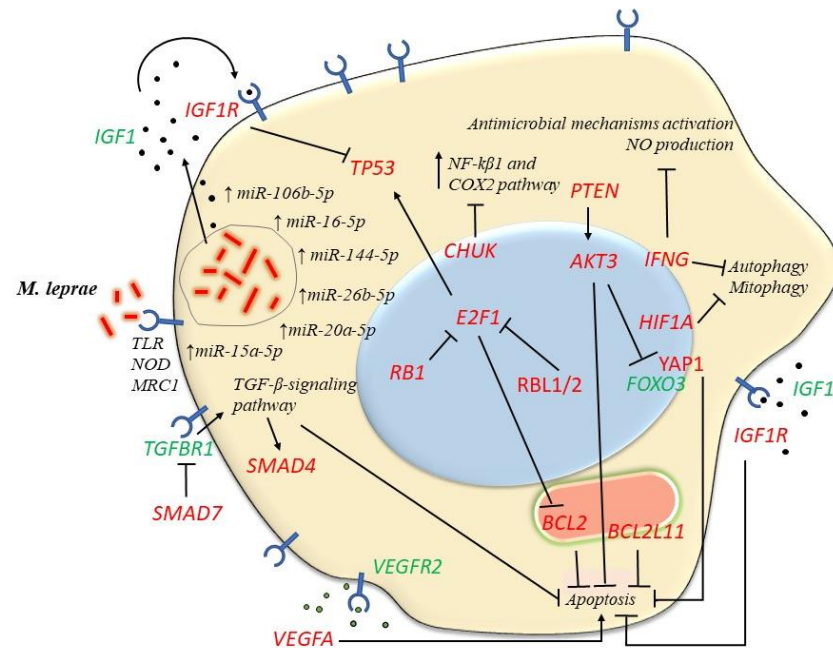


**Figure 3.** Functional analysis of the studied miRNA. A) Gene Ontology (GO) Enrichment Analysis for miRNAs that had statistically significant results. B) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) for miRNAs that had statistically significant results. C) Interaction networks between studied miRNAs that had statistically significant results and their genes also.

A



B



**Figure 4.** Expression of microRNAs strictly regulates various cellular pathways such as apoptosis, autophagy and mitophagy. In the first place the engulfment of *M. leprae* by phagocytosis could be triggered by *IGF1R* which is targeted by several miRNAs. This process can result in the suppression of macrophages' ability to eliminate the mycobacteria, ultimately impairing their microbicidal function. A)

Pro-apoptotic profile in BT-TT form. MiRNAs that target anti-apoptotic genes *BCL2*, *AKT3* and *PTEN* were more upregulated in BT-TT form consequently leading to a pro-apoptotic profile. Furthermore, miRNAs that target pro-apoptotic genes *BCL2L11*, *YAP1* and *SMAD4/SMAD7* and autophagy/mitophagy-related genes like *IFNG* and *HIF1A* were less upregulated in this form, leading to an apoptotic profile and a more autophagic/mitophagic profile in the BT-TT pole. B) Anti-apoptotic profile on BL-LL form. Conversely, the differences in miRNAs expression between disease forms lead to an antiapoptotic profile and the inhibition of autophagy/mitophagy in BL-LL form. Genes in red are targeted by the upregulated miRNAs in our study and genes in green are not direct targets of the studied miRNAs.

## Tables

**Table 1.** Clinical characteristics of samples

Variable	Non-Lp (n = 49)	LP (n = 59)	p-value	
<b>Sex</b>				
<b>Male</b>	25	24	0.42 <sup>a</sup>	
<b>Female</b>	24	34		
<b>Age</b>	37.40 ± 16.11	45.89 ± 16.44	0.01 <sup>b</sup>	
<b>Bacilloscopy</b>		BT-TT	BL-LL	
<b>Negative</b>	49	33	0	< 0.0001 <sup>c</sup>
<b>Positive</b>	0	0	26	
<b>Anti-PGL1</b>		BT-TT	BL-LL	
<b>Non-reactive</b>	49	3	0	0.25 <sup>c</sup>
<b>Positive</b>	0	30	26	
<b>RLEP -qPCR</b>		BT-TT	BL-LL	
<b>Undetermined</b>	49	4	1	0.37 <sup>c</sup>
<b>Positive</b>	0	29	25	

<sup>a</sup>  $\chi^2$  test; <sup>b</sup> Wilcoxon test; <sup>c</sup> Fisher exact test.

**Table 2.** Potential miRNA biomarkers for leprosy

miRNA	Non-Lp vs Lp	p-value	AUC	Non-Lp vs BT-TT	p-value	AUC	Non-Lp vs BL-LL	p-value	AUC	BT-TT vs BL-LL	p-value	AUC
<i>hsa-miR-144-5p</i>	✓	2.9e-07	0.82	✓	8.1e-04	0.76	✓	8.1e-04	0.81	✓	7.9e-03	0.76
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	✓	2.7e-09	0.82	✓	5.7e-06	0.80	✓	5.7e-06	0.81	✗	ns	-
<i>hsa-miR-1291</i>	✓	1.2e-07	0.81	✓	2.5e-05	0.80	✓	2.5e-05	0.82	✗	ns	-
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	✓	1.1e-06	0.79	✓	1.3e-05	0.82	✓	1.3e-05	0.79	✗	ns	-
<i>hsa-miR-16-5p</i>	✓	2.8e-06	0.76	✗	2.4e-03	0.72	✓	2.4e-03	0.76	✗	ns	-
<i>hsa-miR-26b-5p</i>	✗	1.1e-04	0.72	✗	7e-02	0.68	✗	7e-02	0.72	✗	ns	-
<i>hsa-miR-15a-5p</i>	✗	0.03	0.56	✗	ns	0.68	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-miR-126-5p</i>	✗	ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-let7f-5p</i>	✗	ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-



**Table 3.** List of genes that were potentially targeted by two or more differentially expressed miRNAs

Gene	MiRNA	N° miRNAs
<i>CCND1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	4
<i>CCND2</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	4
<i>CCNE1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-144-5p</i>	4
<i>PURA</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	4
<i>CCND1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	4
<i>VEGFA</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	4
<i>WEE1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	4
<i>APP</i>	<i>hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	3
<i>BCL2</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-20a-5p</i>	3
<i>PTEN</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	3
<i>RB1</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	3
<i>AKT3</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>ATG16L1</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>BCL2L1</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>BDNF</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>BMI1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>BRCA1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>CADM1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>CDK6</i>	<i>hsa-miR-16-5p, hsa-miR-26b-5p</i>	2
<i>CDKN1A</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>CHEK1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>CHUK</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>E2F1</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>HGF</i>	<i>hsa-miR-16-5p, hsa-miR-26b-5p</i>	2
<i>HIF1A</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>HMGA2</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>IFNG</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>IGF1R</i>	<i>hsa-miR-16-5p, hsa-miR-26b-5p</i>	2
<i>MYB</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>PTGS2</i>	<i>hsa-miR-16-5p, hsa-miR-26b-5p</i>	2
<i>RBL1</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>RBL2</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>RECK</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>RUNX1</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-144-5p</i>	2
<i>RUNX3</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>SMAD4</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-144-5p</i>	2
<i>SMAD7</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>SOX5</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>STAT3</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>TCEAL1</i>	<i>hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106b-5p</i>	2
<i>TP53</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>WNT3A</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2
<i>YAP1</i>	<i>hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-16-5p</i>	2

## **Conflict of Interest**

*The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.*

## **Author Contributions**

MÁCD, PP and ÂRdS designed research; CGS, AG and PP enrolled patients, performed, and registered clinical diagnosis; MÁCD performed research; MÁCD, LM and TPdS analyzed the data; MÁCD wrote the article; MÁCD, LM, PP, TPdS, AG, CGS and ÂRdS agree with manuscript results and conclusions.

## **Funding**

This research was supported by funds from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível - CAPES – Biocomputacional (2013/CAPES). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - CNPq/MCTI/FNDCT (407922/2021-0). MÁCD was awarded with a PhD fellowship from the CNPq (142091/2019-7).

## **References**

- Ajith, C., Gupta, S., Radotra, B.D., Arora, S.K., Kumar, B., Dogra, S. et al. (2005). Study of apoptosis in skin lesions of leprosy in relation to treatment and lepra reactions. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, 73(4), 269-276.
- Akama, T., Suzuki, K., Tanigawa, K., et al. (2009). Whole-Genome Tiling Array Analysis of *Mycobacterium leprae* RNA Reveals High Expression of Pseudogenes and Noncoding Regions. *J. Bacteriol.*, 191, 10,3321–3327.
- Alvarenga, E.N., Fernandes, G.D.R., & Lana, F.C.F. (2018). The TLR1 gene is associated with higher protection from leprosy in women. *PLOS ONE*, 13(10), e0205234.
- Ashburner, M., Ball, C., Blake, J., et al. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, 25, 25-29.
- Azevedo, M.C.S., Ramuno, N.M., Fachin, L.R.V., Tassa, M., Rosa, P.S., Belone, A.F.F., et al. (2017). qPCR Detection of *Mycobacterium leprae* in Biopsies and Slit Skin Smear of Different Leprosy Clinical Forms. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 21, 71-78.

- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Batista-Silva, L.R., Rodrigues, L.S., Vivarini, A. de C., Costa, F. da M.R., Mattos, K.A. de, Costa, M.R.S.N. et al. (2016). Mycobacterium leprae-induced Insulin-like Growth Factor I attenuates antimicrobial mechanisms, promoting bacterial survival in macrophages. *Sci Rep*, 6, 27632.
- Benevolenskaya, E.V. and Frolov, M.V. (2015). Emerging links between E2F control and mitochondrial function. *Cancer Res.* 75:619–623.
- Bernardes, F., Paula, N.A., Leite, M.N., Abi-Rached, T.L.C., Vernal, S., Silva, M.B. et al. (2017). Evidence of hidden leprosy in a supposedly low endemic area of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 112, 822–828.
- Bhaskaran, M. and Mohan, M. (2014). MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet. Pathol.*, 51 (4)759–774.
- Bracken, A.P., Ciro, M., Cocito, A., and Helin, K. (2004). E2F target genes: unraveling the biology. *Trends Biochem. Sci.* 29,409–417.
- Cáceres-Durán, M.Á. (2022). Comportamiento epidemiológico de la lepra en varios países de América Latina, 2011-2020. *Rev. Panam. Salud Pública*, 46, 1.
- Cardona-Castro, N.M., Restrepo-Jaramillo, S., Gil de la Ossa, M. and Brennan, P.J. (2005). Infection by Mycobacterium leprae of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post-elimination leprosy region of Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100, 703–707.
- Carvalho, R.S., Foschiani, I.M., Costa, M., Marta, S.N., & da Cunha Lopes V.M. (2018). Early detection of M. leprae by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(10), 1863-1867.
- Chaitanya, S., Lavania, M., Turankar, R.P., Karri, S.R. and Sengupta, U. (2012). Increased serum circulatory levels of interleukin 17F in type 1 reactions of leprosy. *J. Clin. Immunol.*, 32(6)1415–1420.
- Chang, L., Graham, P., Ni, J., Hao, J., Bucci, J., Cozzi, P. and Li, Y. (2015). Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 96,507-517.
- Chang, L., Graham, P.H., Hao, J., Ni, J., Bucci, J., Cozzi, P. et al. (2014). PI3K/Akt/mTOR pathway inhibitors enhance radiosensitivity in radioresistant prostate cancer cells through inducing apoptosis, reducing autophagy, suppressing NHEJ and HR repair pathways. *Cell Death Dis*, 5:e14372014.
- Chen, S.N., Chang, R., Lin, L.T., Chern, C.U., Tsai, H.W., Wen, Z.H., Li, Y.H., Li, C.J., Tsui, K.H. (2019). MicroRNA in Ovarian Cancer: Biology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 16:1510.
- Cheng, C., Wang, Q., You, W., Chen, M., Xia, J. (2014). MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: A meta-analysis. *PLoS ONE*. 2014;9:e88566.

- Chou, C.H., Chang, N.W., Shrestha, S., et al. (2016). miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.*, 44, 239–247.
- Cole, S., Eiglmeier, K., Parkhill, J. et al. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409, 1007–1011.
- Corsten, M.F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra L. et al. (2010). Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ. Cardiovasc. Genet.*, 3, 499–506.
- da Silva, B.J., Barbosa, M.G., Andrade, P.R., Ferreira, H., Nery, J.A., Côte-Real, S. et al. (2017). Autophagy is an innate mechanism associated with leprosy polarization. *PLOS Pathog*, 13, 1, e1006103.
- da Silva, M.N.S., da Veiga, D.F., Sena, C., Pinto, P., Gobbo, A.R., da Silva, M.B., Salgado, C.G., dos Santos, N.P.C. and dos Santos, S.E.B. (2022). Association between SNPs in microRNAs and microRNAs-Machinery Genes with Susceptibility of Leprosy in the Amazon Population. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 10628.
- Dang, A.T., Teles, R.M.B., Liu, P.T., Choi, A., Legaspi, A., Sarno, E. N. et al. (2019). Autophagy links antimicrobial activity with antigen presentation in Langerhans cells. *JCI Insight*, 4(8).
- Das, K., Garnica, O. and Dhandayuthapani. Modulation of Host MiRNAs by Intracellular Bacterial Pathogens. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, (2016), 6, 79.
- Dabi, Y.T., Degechisa, S.T., Bobosha, K., & Wassie, L. (2022). Changes in plasma levels of endocrine hormones in lepromatous leprosy patients. *International Journal of Infectious Diseases: Regional Edition*, 6, 58-61.
- de Almeida-Neto, F.B., Assis Costa, V.M., Oliveira-Filho, A.F., de Souza Franco, E., Tavares Julião de Lima, E.V. et al. (2015). TH17 cells, interleukin-17 and interferon- $\gamma$  in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 29(7)1354–1361.
- De Mattos Barbosa, M.G., De Andrade Silva, B.J., Assis, T.Q., Da Silva Prata, R.B., Ferreira, H., Andrade, P. R. et al. (2018). Autophagy impairment is associated with increased inflammasome activation and reversal reaction development in multibacillary leprosy. *Front. Immunol.*, 9, 1223.
- de Sousa, J.R., Sotto, M.N. and Simões Quaresma, J.A. (2017) Leprosy as a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. *Front. Immunol.*, 8(8)1635.
- de Souza, V.N.B., Nogueira, M.E., Belone, F. and Soares, C.T. (2010). Analysis of apoptosis and Bcl-2 expression in polar forms of leprosy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 60(3)270-274.
- Diez, H., Garrido, J. J., and Wandosell, F. (2012). Specific roles of akt iso forms in apoptosis and axon growth regulation in neurons. *PLOS ONE*, 7(4) e32715.

- Fábrega, E., Berja, A., García-Unzueta, M.T., Guerra-Ruiz, A., Cobo, M., López, M., et al. (2011). Influence of aquaporin-1 gene polymorphism on water retention in liver cirrhosis. *Scand. J. Gastroenterol.* 46, 1267–1274.
- Fava, V.M., Dallmann-Sauer, M. and Schurr, E. (2020). Genetics of leprosy: today and beyond. *Hum. Genet.* 139, 835–846.
- Fava, V.M., Dallmann-Sauer, M. and Schurr, E. (2020). Genetics of leprosy: Today and beyond. *Hum. Genet.*, 139(6) 835–846.
- Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C. and de Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 4(5)330-349.
- Filipów, S. and Łukasz, Ł. (2019). Blood Circulating miRNAs as Cancer Biomarkers for Diagnosis and Surgical Treatment Response. *Front. Genet.*, 10,169.
- Foss, N.T., Callera, F. and Alberto, F.L. (1993). Anti-PGLI levels in leprosy patients and their contacts. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 26(1) 43-51.
- Furci, L., Schena, E., Miotto, P. and Cirillo, D.M. (2013). Alteration of human macrophages microRNA expression profile upon infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mycobacteriol.*,2,128–134.
- Gama, R.S, Gomides, T.A.R., Gama, C.F.M., Moreira, S.J.M., de Neves, F.S., de Oliveira et al. (2018). High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. *BMC Infect. Dis.*,18(1)153.
- Gkikas, I., Palikaras, K. and Tavernarakis, N. (2018). The role of mitophagy in innate immunity. *Front. Immunol.*, 9.
- Gladek, I., Ferdin, J., Horvat, S., Calin, G.A., and Kunej, T. (2017). HIF1A gene polymorphisms and human diseases: Graphical review of 97 association studies. *Genes Chromosom. Cancer*, 56 (6) 439–452.
- Gobbo, A.R., Bouth, R. C., Moraes, T.M.P., Pinto, P., da Costa, P.F., Barreto, J.G., Frade, M.A.C., et al. (2022). Ndo-bsa, lid-1, and ndo-lid antibody responses for infection and rlep by quantitative pcr as a confirmatory test for early leprosy diagnosis. *Front. trop. dis.*, 3.
- Goulart, I.M.B., G.O. Penna and G. Cunha (2002). Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 35, 365-375.
- Guerra-Silveira, F., & Abad-Franch, F. (2013). Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. *PLOS ONE*, 8, e62390.
- Hamberg, M., Backes, C., Fehlmann, T., et al. (2016). MiRTargetLink-miRNAs, Genes and Interaction Networks. *Int. J. Mol. Sci.*,17,564.

- Harris, J., Master, S.S., De Haro, S.A., Delgado, M., Roberts, E.A., Hope, J.C. et al. (2009). Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 128(1-3)37-43.
- Hasan, Z., Ashraf, M., Tayyebi, A. and Hussain, R.M. (2006). *M. leprae* inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression. *BMC Microbiol.*, 18,6,78.
- Hasanzadeh, M., Movahedi, M., Rejali, M., Maleki, F., Moetamani-Ahmadi, M., Seifi, S., Hosseini, Z., Khazaei, M., Amerizadeh, F., Ferns, G.A., et al. (2019). The potential prognostic and therapeutic application of tissue and circulating microRNAs in cervical cancer. *J. Cell. Physiol.*, 234,1289–1294.
- Hernandez, M.O., Neves, I., Sales, J.S., Carvalho, D.S., Sarno, E.N., and Sampaio, E.P. (2003). Induction of apoptosis in monocytes by *Mycobacterium leprae* in vitro: a possible role for tumour necrosis factor-alpha. *Immunol.*, 109,1,156-164.
- Hetts, S.W. (1998) To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*, 279, 300–307.
- Jaillon, S., Berthenet, K. and Garlanda, C. (2019). Sexual dimorphism in innate immunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 56,3,308–321.
- Johnson, J., Thijssen, B., McDermott, U., Garnett, M., Wessels, L.F. and Bernards, R. (2016). Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene*, 35(37)4829-4835.
- Jorge, K.T.O.S., Souza, R.P., Assis, M.T.A., Araújo, M.G., Locati, M., Jesus, A.M.R., Dias Baptista, I.M.F., Lima, C.X., Teixeira, A.L., Teixeira, M.M., et al. (2017). Characterization of MicroRNA Expression Profiles and Identification of Potential Biomarkers in Leprosy. *J. Clin. Microbiol.*, 55, 1516–1525.
- Kaur, H., Sehgal, R., Kumar, A., Sehgal, A., Bansal, D. and Sultan, A.A. (2018). Screening and identification of potential novel biomarker for diagnosis of complicated *Plasmodium vivax* malaria. *J. Transl. Med.*,16,272.
- Khanizadeh, S., Hasanvand, B., Nikoo, H.R., Anbari, K., Adhikary, H., Shirkhani, S. and Lashgarian, H.E. (2019). Association between MiRNA-146a Rs2910164 (G/C) Polymorphism with the Susceptibility to Chronic HBV Infection and Spontaneous Viral Clearance in an Iranian Population. *J. Med. Virol.*,91,1063–1068.
- Kumar, M., Sahu, S.K., Kumar, R., Subuddhi, A., Maji, R.K., Jana, K. et al. (2016). MicroRNA let-7 modulates the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection via control of A20, an inhibitor of the NF-κB pathway. *Cell. Host. Microbe.*, 17,345–356.
- Lim, Y.-J., Lee, J., Choi, J.-A., Cho, S.-N., Son, S.-H., Kwon, S.-J. et al. (2020). M1 macrophage dependent-p53 regulates the intracellular survival of mycobacteria. *Apoptosis: Int. J. Program. Cell Death*, 25(1–2) 42–55.
- Liu, X., Han, Z. and Yang, C. (2017). Associations of MicroRNA Single Nucleotide Polymorphisms and Disease Risk and Pathophysiology. *Clin. Genet.*,92,235–242.

- Lu, T.X. and Rothenberg, M.E. (2018). MicroRNA. *J. Allergy. Clin. Immunol.*,141,4,1202-1207.
- Lukasiak, A. and Zielenkiewicz, P. (2019). An Overview of MiRNA and MiRNA Target Analysis Tools. *Methods Mol. Biol.*, 1932, 65–87.
- Madan, N.K., Agarwal, K. and Chander, R. (2011). Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr. Rev.*, 82, 371–382.
- Martiniuk, F., Giovinazzo, J., Tan, A.U., Shahidullah, R., Haslett, P., Kaplan, G. and Levis, W.R. (2012). Lessons of leprosy: The emergence of TH17 cytokines during type II reactions (En1) is teaching us about T-cell plasticity. *JDD*, 11(5) 626–630.
- Mazzara, S., Rossi, R.L., Grifantini, R., Donizetti, S., Abrignani, L. and Bombaci, M. (2017) CombiROC: an interactive web tool for selecting accurate marker combinations of omics data. *Sci. Rep.*, 7,45477.10.1038/srep45477.
- Moubasher, A.D., Kamel, N.A., Zedan, H. and Raheem, D.D. (1998). Cytokines in leprosy, I. *Int. J. Dermatol.*, 37,733–740.
- Murray, H.W., Spitalny, G.L. and Nathan, C.F. (1985). Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *J. Immunol.*, 1619–1622.
- Naaz, F., Mohanty, P.S., Bansal, A.K., Kumar, D. and Gupta, U.D (2017). Challenges beyond Elimination in Leprosy. *Int. J. Mycobacteriol.*,6, 222–228.
- O’Bryan, S., Dong, S., Mathis, J.M., Alahari, S.K. (2014). The roles of oncogenic miRNAs and their therapeutic importance in breast cancer. *Eur. J. Cancer.*,72,1–11.
- O’Connor, L. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.*, 17(2) 384–395.
- Oliveira M.F., Medeiros, R.C.A., Mietto, B.S., Calvo, T.L., Mendonça, A.P.M., Rosa T.L.S.A. et al. (2021). Reduction of host cell mitochondrial activity as *Mycobacterium leprae*’s strategy to evade host innate immunity. *Immunol. Rev.* 301,193–208.
- Paul-Samojedny, M., Pudełko, A., Kowalczyk, M., Fila-Daniłow, A., Suchanek-Raif, R., Borkowska, P., Kowalski, J. (2015). Knockdown of AKT3 and PI3KCA by RNA interference changes the expression of the genes that are related to apoptosis and autophagy in T98G glioblastoma multiforme cells. *Pharmacological Reports* 67, 1115–1123.
- Padhi, T. and Pradhan, S. (2015). Family motivation card: An innovative tool for increasing case detection in a resource poor setting. *Leprosy*, 86, 170–175.
- Pedrosa, V.L., Dias, L.C., Galban, E., Leturiondo, A., Palheta, J., Santos, M O. et al. (2018). Leprosy among schoolchildren in the Amazon region: A cross-sectional study of active search and possible source of infection by contact tracing. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, 12,2, e0006261.

- Peters, E.S. and Eshiet, A.L. (2002). Male-female (sex) differences in leprosy patients in south eastern Nigeria: females present late for diagnosis and treatment and have higher rates of deformity. *Lepr. Rev.*, 73, 262–267.
- Poore, G.D., Ko, E.R., Valente, A., Henao, R., Sumner, K., Hong, C. et al. (2018). A miRNA Host Response Signature Accurately Discriminates Acute Respiratory Infection Etiologies. *Front. Microbiol.*, 9, 2957.
- Quaresma JAS, Lima LW de O, Fuzii HT, Libonati RMF, Pagliari C, Duarte MIS (2010). Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. *Microb Pathog.* 49, 135–40.
- Quaresma, J.A.S., Esteves, P.C., de Sousa Aarão, T.L., de Sousa, J.R., da Silva Pinto, D., and Fuzii, H.T. (2014). Apoptotic activity and Treg cells in tissue lesions of patients with leprosy. *Microb. Pathog.*, 76, 84–88.
- Reé, G.H., Martin, F., Myles, K., Peluso, I (1981). Hormonal changes in human leprosy. *Lepr. Rev.* 52:121-126.
- Ridley, D.S. and Jopling, W.H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.*, 34, 255–273.
- Rodrigues, L.S., da Silva Maeda E., Moreira, M.E., Tempone, A.J., Lobato, L.S., Ribeiro-Resende, V.T. et al. (2010). Mycobacterium leprae induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum withdrawal. *Cell. Microbiol.* 2010 Jan;12(1):42-54.
- Saini, C., Ramesh, V. and Nath, I. (2013). Cd4+ th17 cells discriminate clinical types and constitute a third subset of non th1, non th2 t cells in human leprosy. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 7, 7, e2338.
- Salgado, C.G., Barreto, J.G., da Silva, M.B., Goulart, I.M.B., Barreto, J.A., de Medeiros Junior, N. F. et al. (2018). Are leprosy case numbers reliable? *Lancet Infect. Dis.*, 18, 2, 135–137.
- Salgado, C.G., Pinto, P., Bouth, R.C., et al. (2018). miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. *Front. Immunol.*, 9, 463.
- Santos, A.R., Suffys, P.N., Vanderborcht, P.R., Moraes, M.O., Vieira, L.M.M., Cabello, P. H. et al. (2002). Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J. Infect. Dis.*, 186, 11, 1687–1691.
- Santos, S.A.D. and Andrade, D.R.D. (2017). HIF-1 $\alpha$  and infectious diseases: A new frontier for the development of new therapies. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 59(0).
- Sarkar, R. and Pradhan, S. (2016). Leprosy and women. *Int. J. Womens Dermatol.*, 2, 117–121.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.*, 3(6)1101–1108.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13(11)2498-2504.



- Sharma, M. and Pushpendra, S. (2022). Advances in the Diagnosis of Leprosy. *Front. Trop. Dis.*,3.
- Silva, C.A., Ribeiro-dos-Santos, A., Gonçalves, W.G., Pinto, P., Pantoja, R.P., Vinasco-Sandoval, T. et al. (2021). Can MiRNA Indicate Risk of Illness after Continuous Exposure to *M. Tuberculosis*? *Int. J. Mol. Sci.*, 22,7.
- Silva, M.B., Li, W., Bouth, R.C., Gobbo, A.R., Messias, A.C.C., Moraes, T.M.P., Jorge, E.V. et al. (2021). Latent leprosy infection identified by dual RLEP and anti-PGL-I positivity: Implications for new control strategies. *PLOS ONE*, 16, 5, e0251631.
- Silva BJ de A, Barbosa MG de M, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA da C, Côrte-Real S, et al. (2017). Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLOS Pathogens*, 13:e1006103.
- Silva, M.B., Portela, J.M., Li, W., Jackson, M., Gonzalez-Juarrero, M., Hidalgo, A.S., Belisle, J.T. et al. (2018). Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, 12 (6) e0006532.
- Sionov, R.V., Vlahopoulos, S.A. and Granot, Z. (2015). Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget*, 6(27)23058-134.
- Soares, C.T., Trombone, A.P.F., Fachin, L.R.V., et al. (2017). Differential Expression of MicroRNAs in Leprosy Skin Lesions. *Front. Immunol.*, 8,1035.
- Song, M.S., Salmena, L. and Pandolfi, P.P. (2012). The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 13(5)283-296.
- Souza, F.G. and Cavalcante, G.C. (2022). Mitochondria in Mycobacterium Infection: From the Immune System to Mitochondrial Haplogroups. *Int. J. Mol. Sci.*, 23,17.
- The Gene Ontology resource: enriching a GOLD mine. *Nucleic Acids Res.* Jan 2021; 49(D1):D325-D334.
- van Hooij, A and Annemieke, G. (2021). In Search of Biomarkers for Leprosy by Unraveling the Host Immune Response to *Mycobacterium Leprae*. *Immunol. Rev.*, 301(1) 175-192.
- van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, Richardus R, van den Eeden SJ, Wilson L, de Dood CJ, et al. (2016). Quantitative lateral flow strip assays as user-friendly tools to detect biomarker profiles for leprosy. *Sci Reports*, 6:34260.
- Van Veen, N.H.J., Meima, A. and Richardus, J.H. (2006). The relationship between detection delay and impairment in leprosy control: a comparison of patient cohorts from Bangladesh and Ethiopia. *Lepr. Rev.*, 77, 356–365.
- Verkman, A.S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J. Cell Sci.* 118(Pt 15), 3225–3232.

- Walsh, D.S., Lane, J.E., Abalos, R.M. and Myint, K.S. (2004). TUNEL and limited immunophenotypic analyses of apoptosis in paucibacillary and multibacillary leprosy lesions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*,41,3,265-269.
- Wang, F., Wang, W., Lu, L., Xie, Y., Yan, J., Chen, Y., Di, C., et al. (2020). MicroRNA-16-5p regulates cell survival, cell cycle and apoptosis by targeting AKT3 in prostate cancer cells. *Oncol. Rep.*, 44,3, 1282–1292.
- Wang, J., Chen, J., and Sen, S. (2016). MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J. Cell. Physiol.*, 231, 1,25–30.
- Wang, L., Huang, D., Jiang, Z., Luo, Y., Norris, C., Zhang, M. et al. (2017). Akt3 is responsible for the survival and proliferation of embryonic stem cells. *Biol. Open*, 15,6,6,850-861.
- Wang, Q., Ma, J., Jiang, Z., Wu, F., Ping, J. and Ming, L. (2017). Identification of microRNAs as diagnostic biomarkers for acute myocardial infarction in Asian populations: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*,96:e7173.
- Weekly Epidemiological Record (WER). (2022), 97, 36, 429–452.
- Wiedrick, J.T., Phillips, J.I., Lusardi, T.A., McFarland, T.J., Lind, B., Sandau et al. (2019). Validation of MicroRNA Biomarkers for Alzheimer’s Disease in Human Cerebrospinal Fluid. *J. Alzheimers Dis.*, 67,875–891.
- Wilder-Smith, E.P. and Van Brakel, W.H. (2008). Nerve damage in leprosy and its management. *Nat. Clin. Pract. Neurol.*, 4,12,656-663.
- Xiong, L., Kou, F., Yang, Y., Wu, J. (2007). A novel role for IGF-1R in p53-mediated apoptosis through translational modulation of the p53-Mdm2 feedback loop. *J Cell Biol* 178, 995–1007.
- Yang, T. and Ge, B. (2018). MiRNAs in Immune Responses to Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Cancer Lett.* 431, 22–30.
- Yao, W., Pan, Z., Du, X., Zhang, J., & Li, Q. (2018). miR-181b-induced SMAD7 downregulation controls granulosa cell apoptosis through TGF- $\beta$  signaling by interacting with the TGFBR1 promoter. *Journal of Cellular Physiology*, 233, 6807-6821.
- Zou, Q-M. (2011). Increased miR-146a in gastric cancer directly targets SMAD4 and is involved in modulating cell proliferation and apoptosis. *Oncology Reports*, 27, 559-566.

## Supplementary Material

### Identification of potential biomarkers of microRNAs in leprosy and their role in the immune-physiopathology of the disease

Miguel Ángel Cáceres-Durán<sup>1\*</sup>; Leandro Magalhães<sup>1</sup>; Pablo Pinto<sup>1</sup>; Tatiane Piedade de Souza<sup>1</sup>; Angelica Gobbo<sup>2</sup>; Cláudio Salgado<sup>2</sup>; Ândrea Ribeiro-dos-Santos<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Dermato-Imunologia, ICB, UFPA, Marituba, Brazil

<sup>3</sup>Núcleo de Pesquisas em Oncologia, UFPA, Belém, Brazil

\* Correspondence: [macdur@gmail.com](mailto:macdur@gmail.com)

Supplementary table 1. Primers used in the study

Primer	Sequence
<i>has-miR-106b-5p-F</i>	5'-TAAAGTGCTGACAGTGCAGAT-3'
<i>has-miR-126-5p-F</i>	5'-CATTATTACTTTTGGTACGCG-3'
<i>has-miR-1291-F</i>	5'-TGGCCCTGACTGAAGACCAGCAGT-3'
<i>has-miR-144-5p-F</i>	5'-GGATATCATCATATACTGTAAG-3'
<i>has-miR-15a-5p-F</i>	5'-TAGCAGCACATAATGGTTTGTG-3'
<i>has-miR-16-5p-F</i>	5'-TAGCAGCACGTAAATATTGGCG-3'
<i>has-miR-20a-5p-F</i>	5'-TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG-3'
<i>has-miR-26b-5p-F</i>	5'-TTCAAGTAATTCAGGATAGGT-3'
<i>has-let7f-5p-F</i>	5'-TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT-3'
<i>Reverse qPCR</i>	5'-CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT-3'
<i>RNU6B-F</i>	5'-CGCAAGGATGACACGCAAATT CGTGAAGCGTTCATATTTTT-3'
<i>RNU24-F</i>	5'-ATTTGCTATCTGAGAGATGGTGATGACATTTTAAACCAC CAAGATCGCTGATGCA-3'
<i>Universal stem-loop</i>	5'-GAAAGAAGGCGAGGAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATG TGCGTCTCGCCTTCTTTCNNNNNNN-3'

**Supplementary table 2.  $\Delta$ Ct of miRNAs**

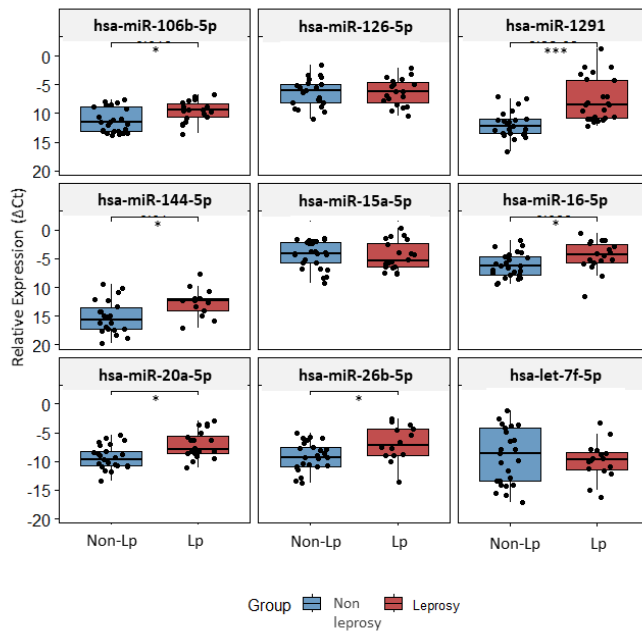
Sample	Case_ Non-LP	Type	Endogen ous	<i>miR_15a_5p</i>	<i>miR_126_5p</i>	<i>miR_1291</i>	<i>miR_let7f_5p</i>	<i>miR_144_5p</i>	<i>miR_106b_5p</i>	<i>miR_16_5p</i>	<i>miR_20a_5p</i>	<i>miR_26b_5p</i>
C1	Non-LP	Non-LP	14,10	6,45	4,61	10,61	13,10	14,69	11,53	4,75	9,17	8,81
C2	Non-LP	Non-LP	13,08	5,74	8,22	12,75	15,53	17,24	13,07	7,93	13,41	9,55
C3	Non-LP	Non-LP	13,82	6,61	9,58		13,03	18,41	13,92	6,03	8,37	6,71
C4	Non-LP	Non-LP	14,08	6,74	9,13		10,28	18,29	13,43	4,02	7,11	8,06
C5	Non-LP	Non-LP	12,94	2,17	3,38		9,80		11,95	4,89	8,34	5,06
C6	Non-LP	Non-LP	15,55	8,46	8,92	11,37	17,19		13,44	9,52	10,72	13,73
C7	Non-LP	Non-LP	15,00	4,00		13,45	12,83	19,69	13,61	5,92	9,84	10,42
C8	Non-LP	Non-LP	14,74	5,11		13,95	17,12	20,15	13,68	9,97	11,61	13,57
C9	Non-LP	Non-LP	14,54	0,67	6,81	12,83	18,93		11,84	10,58	11,56	14,50
C10	Non-LP	Non-LP	12,16	1,87			13,06		10,33	7,66	9,52	5,23
C11	Non-LP	Non-LP	14,43	4,15	10,93	10,94	15,89	18,91	13,11	7,13	10,96	11,11
C12	Non-LP	Non-LP	14,88	8,05	8,48	10,28	14,80	15,35	11,11	6,48	10,64	10,23
C13	Non-LP	Non-LP	13,29	1,54	7,49	10,81	6,27		11,89	6,11	10,02	5,73
C14	Non-LP	Non-LP	14,13	3,23	9,61	10,38	11,56	15,58	11,46	4,77	9,46	8,47
C15	Non-LP	Non-LP	13,77	3,70	5,45	11,54	14,05	17,37	11,58	6,34	10,63	10,94
C16	Non-LP	Non-LP	14,89	3,57	6,19	11,18	14,94	18,50	11,83	7,42	11,31	11,16
C18	Non-LP	Non-LP	14,02	6,13		13,14	13,25	17,14	13,09	6,18	10,39	9,57
C19	Non-LP	Non-LP	15,84	6,12	7,58	12,15	14,43	16,44	12,22	7,75	11,11	10,31
C20	Non-LP	Non-LP	15,77	7,14	7,54	11,84	9,41	14,48	11,24	3,46	7,99	4,98
C21	Non-LP	Non-LP	14,30	9,36	9,41	13,72	13,51	16,25	13,08	6,99	8,68	9,27
C22	Non-LP	Non-LP	14,03	2,30	7,21	13,41	14,33	17,11	12,87	8,39	10,86	10,68
C23	Non-LP	Non-LP	14,20	2,36	9,81	14,62	14,05	17,23	13,85	8,56	11,80	11,47
C24	Non-LP	Non-LP	12,77	2,16		14,42	10,70		12,63	11,17	12,49	8,60
C25	Non-LP	Non-LP	14,22	2,92		14,13	16,62	17,77	13,08	10,71	12,59	12,52
C26	Non-LP	Non-LP	15,75	8,13	5,96	11,73	13,43	15,17	11,04	7,34	10,34	8,56
C27	Non-LP	Non-LP	16,48	1,83	5,51	11,19	11,61	14,88	10,60	5,19	9,35	7,60

<b>C28</b>	Non-LP	Non-LP	14,72	11,51	3,85	11,55	9,12	16,01	12,34	8,56	11,23	10,16
<b>C29</b>	Non-LP	Non-LP	14,42	2,08	5,10	12,70	8,60	14,32	11,99	9,29	10,87	6,25
<b>C30</b>	Non-LP	Non-LP	14,43	3,05	8,37	12,44	5,55	17,08	11,87	7,02	10,32	10,14
<b>C31</b>	Non-LP	Non-LP	16,54	1,96	6,09	10,08	6,55	16,28	11,47	7,44	10,68	10,53
<b>C32</b>	Non-LP	Non-LP	17,43	9,34	5,56	10,86	3,25	13,18	10,14	4,64	8,36	6,91
<b>C33</b>	Non-LP	Non-LP	15,14	0,43	3,54	13,31	5,06	16,23	13,05	6,54	10,43	13,14
<b>C34</b>	Non-LP	Non-LP	15,12	1,73	6,45	13,00	4,24	14,92	13,50	6,71	10,16	10,92
<b>C35</b>	Non-LP	Non-LP	14,26	1,52	5,03	14,25	7,84	17,62	12,81	7,94	11,62	13,42
<b>C36</b>	Non-LP	Non-LP	17,90	6,81	4,06	8,27	4,86	14,27	7,68	5,65	8,82	9,41
<b>C37</b>	Non-LP	Non-LP	17,49	3,47	2,26	7,84	4,65	14,22	8,99	5,81	6,97	10,85
<b>C38</b>	Non-LP	Non-LP	17,50	0,96	2,95	7,74	3,40	16,89	9,89	5,20	7,76	9,04
<b>C39</b>	Non-LP	Non-LP	18,45	7,83	3,90	6,05	5,93	15,11	8,64	7,84	7,67	11,91
<b>C40</b>	Non-LP	Non-LP	16,30	6,59		9,74	8,26	18,41	11,53	10,47	10,30	15,69
<b>C41</b>	Non-LP	Non-LP	19,83	4,23	1,56	7,07	4,23	13,32	8,14	4,35	6,68	8,95
<b>C42</b>	Non-LP	Non-LP	16,35	5,16	3,79	9,55	3,91	12,19	9,24	3,69	7,19	6,82
<b>C43</b>	Non-LP	Non-LP	16,58	4,40	3,36	7,49	3,62	10,83	8,55	2,87	6,29	6,03
<b>C44</b>	Non-LP	Non-LP	16,88	1,73	4,74	12,28	7,90	17,00	11,13	8,42	9,66	12,91
<b>C45</b>	Non-LP	Non-LP	17,39	6,65	4,44	12,19	5,10	14,03	10,15	5,24	7,86	9,49
<b>C46</b>	Non-LP	Non-LP	18,17	4,16	7,54	16,60	1,25	12,23	7,96	1,81	5,91	5,84
<b>C47</b>	Non-LP	Non-LP	21,93	3,71		11,16	3,48	10,12	8,47	2,63	5,51	6,05
<b>C48</b>	Non-LP	Non-LP	18,20	4,05		13,11	5,54	13,73	9,86	4,91	7,58	9,06
<b>C49</b>	Non-LP	Non-LP	16,49	7,04	7,54	13,83	6,35		8,95	6,30	9,07	7,68
<b>C50</b>	Non-LP	Non-LP	16,75	5,77	8,22	13,49	2,64	9,52	8,60	4,72	8,49	7,99
<b>C17</b>	LP	BT-TT	15,78		8,49	12,27	10,98	15,83	9,78	3,99	8,60	7,70
<b>P1</b>	LP	BT-TT	13,27	3,99		2,90	8,61				8,43	4,63
<b>P10</b>	LP	BT-TT	20,86		11,76	8,32	7,67	13,69	8,36	1,66	5,91	4,98
<b>P11</b>	LP	BT-TT	15,78	4,56		9,40	12,98	16,08	12,29	6,32	10,21	10,14
<b>P13</b>	LP	BT-TT	18,18	4,98	6,76	9,29	7,21	11,46	7,15	0,09	3,34	3,86
<b>P15</b>	LP	BT-TT	14,70	2,90	5,94	7,33	12,47	14,97	11,34	7,11	10,18	9,94

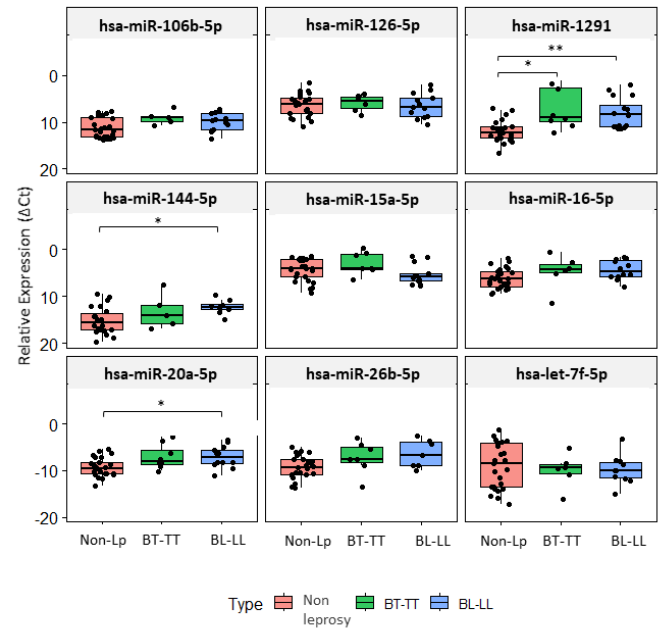
<b>P16</b>	LP	BT-TT	17,45	-0,91	6,87	11,37	12,65	15,32	10,26	6,49	9,54	11,81
<b>P18</b>	LP	BT-TT	17,04	-0,30	5,01	10,65	9,44	14,15	8,81	5,19	7,69	7,57
<b>P21</b>	LP	BT-TT	16,88	-0,26	3,19	8,78	14,32	15,40	9,63	6,43	7,25	10,69
<b>P22</b>	LP	BT-TT	15,09		7,16	6,27	13,01	15,24	9,62	7,02	8,11	7,89
<b>P24</b>	LP	BT-TT	15,22	1,18	4,08	8,50	16,20	17,04	10,76	11,54	10,14	13,56
<b>P25</b>	LP	BT-TT	16,80	3,18		10,43	9,58	10,74	10,01	3,88	5,85	6,39
<b>P26</b>	LP	BT-TT	16,30		6,10	9,17	8,41	11,25	8,98	3,88	5,53	7,49
<b>P27</b>	LP	BT-TT	17,63	6,43	4,44	9,58	9,50	11,97	8,94	4,47	6,38	8,87
<b>P28</b>	LP	BT-TT	17,15	7,56	5,38	10,03	11,97	12,78	9,83	7,74	8,23	10,83
<b>P29</b>	LP	BT-TT	15,24		4,29	5,25	3,31			4,70	4,97	1,70
<b>P30</b>	LP	BT-TT	15,70	1,57		14,14	11,44	14,43	6,87	6,22	7,68	8,82
<b>P3</b>	LP	BT-TT	13,10	4,36		1,86					9,10	
<b>P4</b>	LP	BT-TT	13,73	8,97	7,76	7,63	7,57		7,92	6,51	10,34	9,81
<b>P40</b>	LP	BT-TT	18,65	0,26	2,69	8,50	10,69	13,23	8,71	4,91	6,99	8,56
<b>P41</b>	LP	BT-TT	19,86	-0,22	-0,47	8,35	10,04	8,89	4,72	1,14	2,86	1,78
<b>P43</b>	LP	BT-TT	18,55			8,61			5,22	3,11	3,69	-1,20
<b>P44</b>	LP	BT-TT	20,62	1,66	-1,04	7,36	7,62	7,98	4,62	-0,08	2,35	0,22
<b>P46</b>	LP	BT-TT	19,38	4,10	7,48	9,32	5,18	7,61	6,78	0,57	3,60	3,06
<b>P48</b>	LP	BT-TT	17,89	3,70	6,80	11,73	10,49	10,36	7,28	3,22	4,82	6,65
<b>P6</b>	LP	BT-TT	15,34		4,66	10,22	6,13		7,55	4,69	8,04	6,38
<b>P7</b>	LP	BT-TT	17,74	-1,58		10,31	3,95	11,66	8,57	1,91	5,85	6,45
<b>P8</b>	LP	BT-TT	16,45		9,71	11,33	9,46		10,21	3,76	8,76	9,52
<b>P19</b>	LP	BT-TT	13,57		8,19	11,93	12,91	17,53	11,81	6,09	8,51	7,12
<b>P35</b>	LP	BT-TT	16,08	1,59	6,78	11,72	12,29	13,61	9,69	5,94	7,64	8,95
<b>P38</b>	LP	BT-TT	16,73	7,55	2,65	5,43	11,44	15,09	10,27	5,22	7,03	10,51
<b>P39</b>	LP	BT-TT	16,37	7,38		9,83	15,79	12,75	12,00	8,49	9,03	11,85
<b>P5</b>	LP	BT-TT	15,52	0,88	6,12	-1,21				2,85	2,93	5,35
<b>P2</b>	LP	BL-LL	13,10	5,26		1,94						
<b>P9</b>	LP	BL-LL	18,61		10,45	7,03	9,94	14,88	9,33	6,43	8,68	10,07

<b>P12</b>	LP	BL-LL	16,81	7,50	7,88	10,75	11,71	13,40	10,60	5,27	8,36	9,02
<b>P31</b>	LP	BL-LL	16,69	1,64	6,15	11,43	11,28	11,98	11,62	5,39	8,19	9,04
<b>P32</b>	LP	BL-LL	16,30	2,57	4,93	11,19	8,76	12,22	7,61	2,44	5,06	3,66
<b>P36</b>	LP	BL-LL	18,95	5,61	2,12	8,33	8,12	9,75	7,83	1,79	3,47	4,28
<b>P37</b>	LP	BL-LL	20,63	5,75	3,21	7,17	10,04	12,31	8,23	3,47	6,27	6,71
<b>P47</b>	LP	BL-LL	18,52	4,79	7,67		9,41	9,95	7,56	2,45	2,76	5,61
<b>P49</b>	LP	BL-LL	16,78	1,47	3,78	4,24	3,33		7,18	2,04	3,92	2,52
<b>P50</b>	LP	BL-LL	22,18	2,37	4,11	6,66	5,76	6,85	3,90	-1,30	0,59	1,70
<b>P53</b>	LP	BL-LL	15,86				9,48	7,33		4,92		3,30
<b>P54</b>	LP	BL-LL	15,46				10,25					
<b>P55</b>	LP	BL-LL	22,61	0,73	2,09		5,74	3,68	6,06	-1,95	1,85	
<b>P56</b>	LP	BL-LL	19,91	3,63	5,11	9,35	10,47	7,38	8,88	0,67	4,87	
<b>P57</b>	LP	BL-LL	19,05			5,85	9,50	9,87	8,92	2,25	4,92	
<b>P58</b>	LP	BL-LL	17,31	6,33	7,84	11,45	11,67	10,03	12,45	3,70	8,05	
<b>P59</b>	LP	BL-LL	16,52	8,02	9,54	11,08			9,84			
<b>P60</b>	LP	BL-LL	18,14			10,68	12,13	10,78	11,94	4,05	8,32	
<b>P61</b>	LP	BL-LL	17,18	6,41	9,11	11,02			9,35			
<b>P62</b>	LP	BL-LL	15,72	6,69	5,38	11,50	15,04	12,72	13,57	7,98	11,03	
<b>P63</b>	LP	BL-LL	18,10	5,96	7,11	3,17	7,94		10,09	1,74	6,32	
<b>P64</b>	LP	BL-LL	15,88	7,46	9,51	4,14						
<b>P65</b>	LP	BL-LL	18,35	5,74	6,86	8,49			9,62	5,75	5,75	
<b>P66</b>	LP	BL-LL	16,43	7,68	8,90	8,13			12,03	5,88	9,57	
<b>N1</b>	LP	BL-LL	17,00			10,93						

A

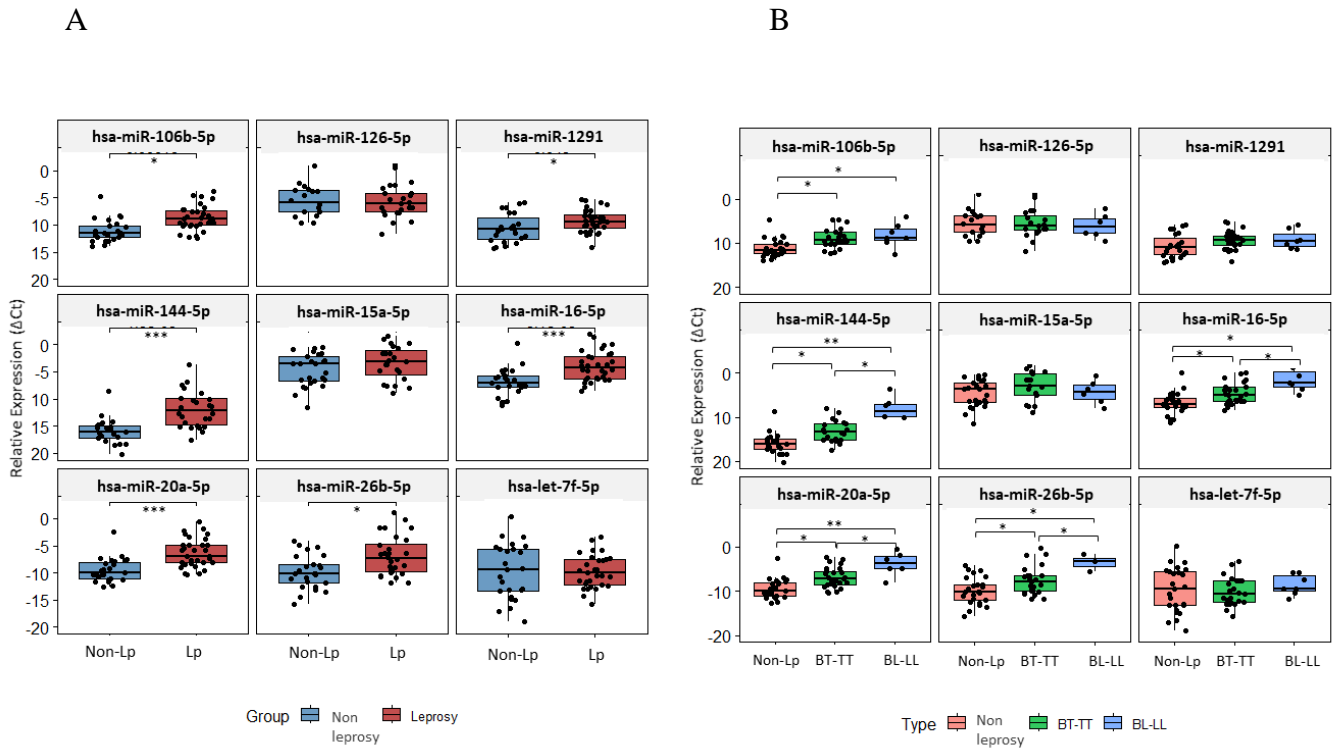


B

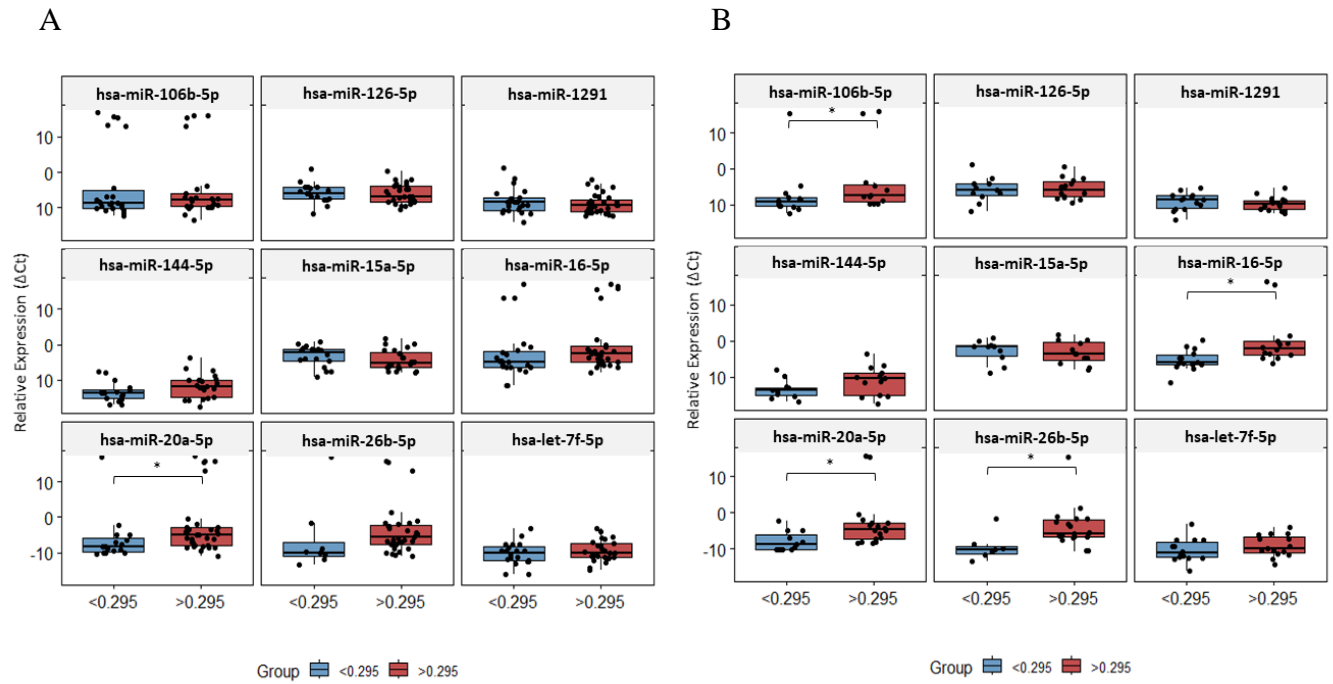


**Supplementary Figure 1.** Expression level of studied miRNAs in male samples. A) Expression level of miRNAs between non-LP and LP. B) Expression level of miRNAs between non-LP and BT-TT and BL-LL poles. \*p-value < 0.05; \*\*p-value < 0.001; \*\*\*p-value < 0.0001; p-value adjusted by FDR correction.

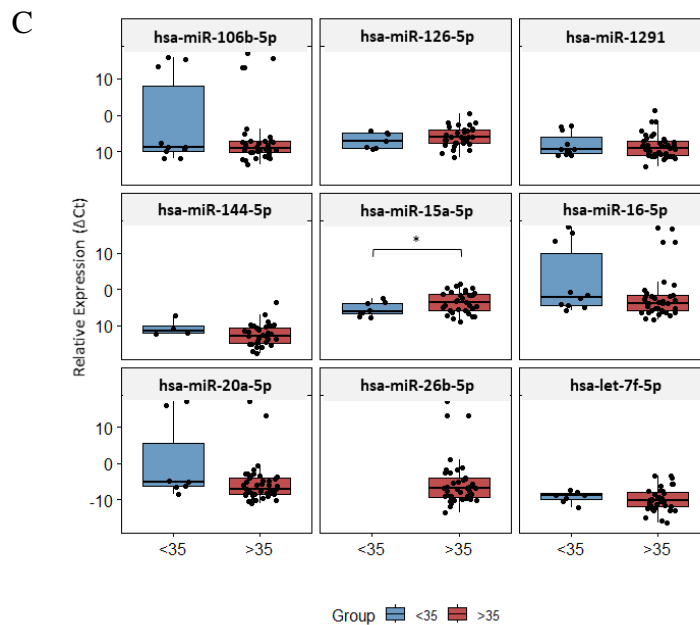




**Supplementary Figure 2.** Expression level of studied miRNAs in female samples. A) Expression level of miRNAs between non-LP and LP. B) Expression level of miRNAs between non-LP and BT-TT and BL-LL poles. \*p-value < 0.05; \*\*p-value < 0.001; \*\*\*p-value < 0.0001; p-value adjusted by FDR correction.



**Supplementary Figure 3.** Expression level of studied miRNAs in positive PGL1 patients' samples. A) Expression levels of miRNAs between non-LP and LP. B) Expression level of miRNAs between non-LP and BT-TT and BL-LL poles in female samples. \*p-value < 0.05; p-value adjusted by FDR correction.

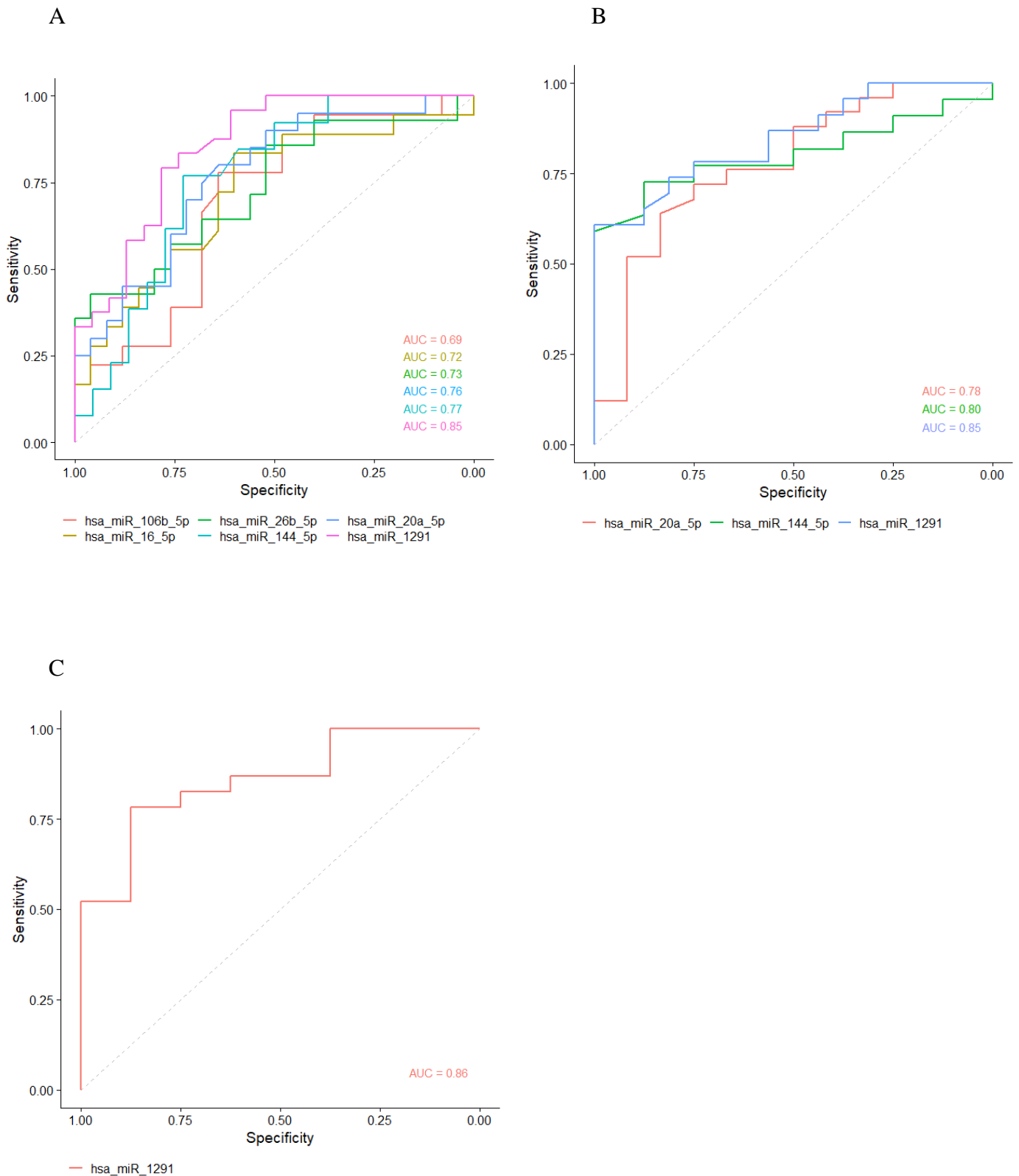


**Supplementary Figure 4.** Expression level of studied miRNAs in positive RLEP-qPCR patients' samples. \*p-value < 0.05; p-value adjusted by FDR correction.

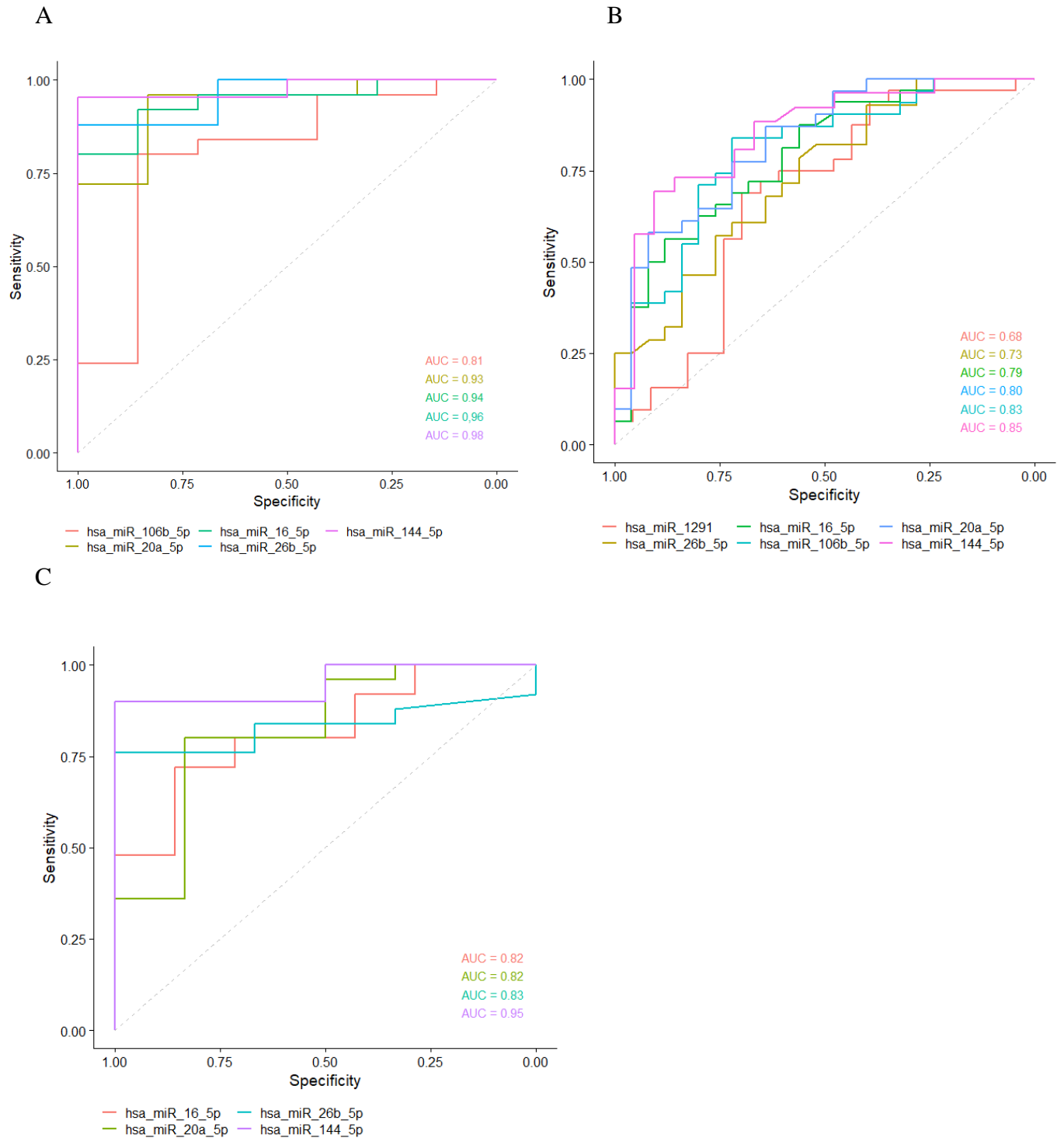
**Supplementary Table 3.** Profile of differential expression for comparisons conduct

miRNAs	LP vs non-LP		BT-TT vs non-LP		BL-LL vs non-LP		BT-TT vs BL-LL	
	Fold Change <sup>*1</sup>	padj <sup>*2</sup>	Fold Change	padj	Fold Change	padj	Fold Change	padj
<i>hsa-let-7f-5p</i>	-1.15		-1.41		1.24		1.75	
<i>hsa-miR-126-5p</i>	1.22	0.61	1.54	1	-1.11	1	-1.7	1
<i>hsa-miR-144-5p</i>	11.27	2.9 x10-07	5.69	8.1 x10-04	38.22	2.3 x10-05	6.71	7.9x10-03
<i>hsa-miR-15a-5p</i>	1.57	0.033	2.87	0.08	-1.36	0.48	-3.9	0.06
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	7.60	2.7 x10-09	6.01	5.7x10-06	11.68	1.1x10-04	1.94	0.23
<i>hsa-miR-26b-5p</i>	6.31	1.1 x10-04	4.81	7x10-03	15.14	6.8x10-03	3.15	0.17
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	4.87	1.1x10-06	5.50	1.3x10-05	4.07	2.9x10-03	-1.35	0.58
<i>hsa-miR-1291</i>	8.5	1.2x10-07	7.90	2.5x10-05	9.33	3.3x10-05	1.18	0.8
<i>hsa-miR-16-5p</i>	5.42	2.8x10-06	3.79	2.4x10-03	9.74	1.1x10-04	2.58	0.08

\*1 Log<sub>2</sub> fold change; \*2 p adjusted by FDR



**Supplementary Figure 5.** ROC curves of studied miRNAs with statistically significant expression between the groups in male samples. Area Under the Curve (AUC) with at least 0.75 was considered as good ability in discriminating between comparisons. A) ROC curve between non-LP and LP. B) ROC curve between non-LP and BL-LL pole. C) ROC curve between non-LP and BT-TT pole.



**Supplementary Figure 6.** ROC curves of studied miRNAs with statistically significant expression between the groups in female samples. Area Under the Curve (AUC) with at least 0.75 was considered as good ability in discriminating between comparisons. A) ROC curve between non-LP and LP. B) ROC curve between non-LP and BL-LL pole. C) ROC curve between non-LP and BT-TT pole.

**Supplementary Table 4.** Potential miRNA biomarkers for male LP patients

miRNA	Non-Lp vs Lp	p-value	AUC	Non-Lp vs BT-TT	p-value	AUC	Non-Lp vs BL-LL	p-value	AUC	BT-TT vs BL-LL	p-value	AUC
<i>hsa-miR-1291</i>	✓	3.6e-05	0.85	✓	3.7e-03	0.86	✓	7.7e-04	0.85	✗	ns	-
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	✓	1.9e-03	0.77	✗	Ns	-	✓	0.03	0.78	✗	ns	-
<i>hsa-miR-144-5p</i>	✓	0.01	0.76	✗	Ns	-	✓	4e-03	0.80	✗	ns	-
<i>hsa-miR-26b-5p</i>	✗	0,03	0.73	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-miR-16-5p</i>	✗	0.03	0.72	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	✗	0.032	0.69	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-miR-126-5p</i>	✗	ns	-	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-miR-15a-5p</i>	✗	ns	-	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-let7f-5p</i>	✗	ns	-	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-

**Supplementary Table 5.** Potential miRNA biomarkers for female LP patients

miRNA	Non-Lp vs Lp	p-value	AUC	Non-Lp vs BT-TT	p-value	AUC	Non-Lp vs BL-LL	p-value	AUC	BT-TT vs BL-LL	p-value	AUC
<i>hsa-miR-144-5p</i>	✓	1.8e-05	0.85	✓	1.4e-03	0.81	✓	4.3e-04	0.98	✓	2.1e-03	0.95
<i>hsa-miR-20a-5p</i>	✓	3.3e-05	0.83	✓	8.6e-04	0.80	✓	8.6e-04	0.93	✓	0.02	0.82
<i>hsa-miR-16-5p</i>	✓	8.1e-05	0.79	✓	3.6e-03	0.75	✓	1.7e-03	0.94	✓	0.02	0.82
<i>hsa-miR-106b-5p</i>	✓	1.5e-04	0.80	✓	1.2e-03	0.80	✓	0.03	0.81	✗	ns	-
<i>hsa-miR-26b-5p</i>	✗	1.9e-03	0.73	✗	0.02	0.70	✗	0.03	0.96	✓	0.05	0.70
<i>hsa-miR-1291</i>	✗	0.048	0.68	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-miR-15a-5p</i>	✗	ns	-	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-miR-126-5p</i>	✗	ns	-	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-
<i>hsa-let7f-5p</i>	✗	ns	-	✗	Ns	-	✗	ns	-	✗	ns	-

**5. CAPÍTULO III**

**ANALYSIS OF LEPROSY REVEALS NEW GENES INVOLVED IN THE IMMUNOPATHOLOGY OF THE DISEASE**

**(Análise da hanseníase revela novos genes envolvidos na imunopatologia da doença)**

Artigo em preparação para ser submetido na *Scientific Reports*

ISSN: 2045-2322

Fator de Impacto: 4.997

Qualis: A2



## ANALYSIS OF LEPROSY REVEALS NEW GENES INVOLVED IN THE IMMUNOPATHOLOGY OF THE DISEASE

Miguel Ángel Cáceres-Durán<sup>1\*</sup>; Giordano Bruno Soares Souza<sup>1</sup>; Leandro Magalhães<sup>1</sup>; Pablo Pinto<sup>2</sup>; Angelica Gobbo<sup>3</sup>; Cláudio Guedes Salgado<sup>3</sup>; Ândrea Ribeiro-dos-Santos<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil

<sup>2</sup> Núcleo de Pesquisas em Oncologia, UFPA, Belém, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Dermato-Imunologia, ICB, UFPA, Marituba, Brazil

\* Correspondence: akelyufpa@gmail.com

### Abstract

Leprosy is a chronic infectious disease caused by *Mycobacterium leprae*. It mainly affects the skin and peripheral nerves and continues to be a public health concern. In this work, the transcriptome of 37 blood samples from leprosy patients (LP) and household contacts without the disease (non-LP) was characterized. Differential expression analysis showed several differentially expressed genes (DEG) between LP and non-LP, especially related to apoptosis, autophagy, iron metabolism, cell cycle, and immune system. Enrichment analysis results indicated possible important roles of autophagy, mitophagy, ferroptosis, and pathways associated with the immune system. Anti-apoptotic genes *BCL2L1*, *HSPB1*, *E2F2*, *AKT1S1*, *SIAH2*, and *GSK-3* were found to be upregulated in leprosy patients. Additionally, leprosy patients showed upregulated genes involved in autophagy, such as *ATG9A*, *TBC1D25*, and *WIPI2* and genes involved in ferroptosis and iron metabolism, such as *PINK1*, *SLC25A37*, *SLC48A1*, *NRF2*, *TFR2* and *GLRX1*. *KANK2* and *PIMI1*, involved in the control of VDR activation and function were also found upregulated in LP group. Finally, *SHISA7*, *MARCHF8*, *FOXO3*, *TSPAN5*, *WINK1*, and *RPIA* were able to discriminate with high accuracy between the LP and non-LP groups, showing

an AUC  $\geq$  0.85. The identification of these new potential blood biomarkers may be useful for the prevention and early diagnosis of leprosy.

**Keywords:** Leprosy, transcriptome, biomarker, apoptosis, cell cycle.

## Introduction

Leprosy is a chronic granulomatous bacterial infection that primarily affects skin and peripheral nerves. The disease is caused by intracellular bacteria *Mycobacterium leprae* which produce a broad spectrum of the illness (Eichelmann et al., 2013). Several factors such as the infectious agent (dose and frequency of exposure), genetics (Alter et al., 2011; Cardoso et al., 2011; Zhang et al., 2009), nutrition (Dwivedi et al., 2019; Feenstra et al., 2011), living conditions (Kerr-Pontes et al., 2004) and individual characteristics such age and sex (Cáceres-Durán, 2022; Padhi and Pradhan, 2015; Peters and Eshiet, 2002; Van Veen et al., 2006; Vieira et al., 2018) influence the development of the disease. Host factors that regulate susceptibility to leprosy and its diverse clinical forms are still largely unknown (Eichelmann et al., 2013; Misch, 2010).

Currently, the disease remains a public health problem in several countries of the world. In 2021, 140.594 new cases were reported globally (WER 2022). All forms of leprosy are characterized by neurological involvement because the bacillus is an obligate intracellular parasite that has a preference for the peripheral nervous system. *M. leprae* has a slow replication, a long incubation period, and few genes controlling its metabolism (Akama, 2009; Oliveira, 2021; Soares, 2017).

The most widely used classification system in Leprosy is the Ridley-Jopling classification which classifies as a spectral disease. The polar tuberculoid form (TT), characterized by a low bacterial load, mostly cell-mediated immunity and minor production of specific antibodies and the polar lepromatous form (LL), characterized by a high bacterial loads and response to infection with elevated production of antibodies as well as lower or absent *M. leprae*-specific cell-mediated immunity. The clinically unstable borderline spectrum, which includes the borderline-tuberculoid (BT), borderline-borderline (BB) and borderline-lepromatous (BL) types, lies between these two polar forms, with BB being the least stable form (Ridley and Joplin, 1966). However, while developing multidrug therapy

for leprosy, it became critical for the World Health Organization (WHO) to establish a simplified operational classification to differentiate between different forms of the disease and therefore facilitate adequate treatment. Thus, patients are classified as paucibacillary (PB) if they present up to five skin lesions and multibacillary (MB) if they present six or more lesions. This operational classification is helpful for fieldwork because it doesn't require expertise in assessing skin lesion morphology or applying the slit-skin smear examination. However, different studies have shown that it has some flaws (Gupta et al., 2012; Rodrigues Junior et al., 2016; Parkash, 2008).

Household contacts of leprosy patients are at the highest risk of developing the disease. To prevent the disease from spreading, chemoprophylaxis is recommended for these individuals according to the WHO 2018 guidelines (WHO, 2018). Clinical signs or symptoms, such as loss of sensation on hypochromic or infiltrated skin lesions that can be accompanied by muscle weakness, nerve damage, pain or loss of function can be used for diagnosis of leprosy, that usually occurs at an advanced stage of the disease (Gobbo et al., 2022; Moura et al., 2008). Therefore, biomarkers that can identify who will develop leprosy after being exposed to the bacteria would be useful in targeting preventative measures. Several studies have attempted to find biomarkers for early detection of leprosy based on the host immune response (Chen et al., 2019; Queiroz et al., 2019; van Hooij et al., 2016; van Hooij et al., 2017; van Hooij et al., 2018; van Hooij et al., 2019), the pathogen (Bariberi et al., 2019; Gama et al., 2018) or a combination of both (Cardona-Castro et al., 2008; Martins et al., 2010; Santos et al., 2018). To aid in the diagnosis of leprosy, methods such as identifying the repetitive element RLEP through qPCR (Carvalho et al., 2018; Gobbo et al., 2022) and detecting anti-*M. leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) IgM in the blood are utilized (Moura et al., 2008). However, current diagnostic methods are not sensitive enough to identify paucibacillary leprosy which has low concentrations of bacteria (van Hooij et al., 2019; Tió-Coma et al., 2020). PCR and anti-PGL-I IgM are also inadequate predictors of disease in household contacts of leprosy patients, because they may still test positive for both methods (Tió-Coma et al., 2020; van Hooij et al., 2016; van Hooij et al., 2020). Combining other host proteins may be useful in diagnosing leprosy and detecting *M. leprae* infection, but further research is needed (Goulart et al., 2008). Transcriptomic analysis of differential gene expression (DGE) represents an effective approach for identifying new biomarkers for leprosy diagnosis (Tió-Coma et al., 2021). RNA-Seq, an unbiased and high-throughput

technique that includes the whole transcriptome instead of a gene selection, has been successfully used to prospectively identify correlates of risk for leprosy reaction as well as for tuberculosis (Tió-Coma et al., 2019). Few studies have employed transcriptomics to identify a biomarker risk signature for leprosy diagnosis. Gene expression of *LDR* and *CCL4* in nerve biopsies identified up to 80% of patients with pure neural leprosy (Guerreiro et al., 2013). It was proposed a 4-gene signature, designated RISK4LEP (*MT-ND2*, *REX1BD*, *TPGS1* and *UBC*) with a discrimination power of 86.4% between leprosy patients and household contacts (Tió-Coma et al., 2021). Likewise, it was proposed a signature formed by four *miRNAs* (*miR-101*, *miR-196b*, *miR-27b*, and *miR-29c*) using skin biopsies that could discriminate patients with leprosy with a sensitivity of 80% and a specificity of 91% (Jorge et al., 2017). Characterization of genetic patterns associated with forms of leprosy may lead to the development of better diagnostic tools and therapeutic interventions targeted to the main biological pathways affected (Leal-Calvo et al., 2021). For this reason, this study aimed to characterize the global expression profile of genes in leprosy patients and healthy household contacts in order to identify potential biomarkers for early diagnosis of the disease and relate them to the immunopathology of the disease.

## **Methods**

### **Biological material and clinical data collection**

In total, 37 blood samples were collected from 18 leprosy patients (LP) (7 from lepromatous-lepromatous pole -LL- and 11 from tuberculoid-tuberculoid -TT- pole) before starting MDT treatment at the Dr. Marcello Candia Reference Unit in Sanitary Dermatology of the State of Pará, in Marituba, Brazil, and 19 non-consanguineous and healthy household contacts of leprosy patients (non-leprosy group -non-LP-). After collection, all samples were stored in RNAlater (SIGMA R0901) and immediately frozen at -80°C. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the Institute of Health Sciences at the Federal University of Pará (26765414.0.0000.0018). All individual participants provided informed consent.

### **RNA extraction and library preparation.**

Total RNA was isolated from peripheral blood using TRIzol reagent (ThermoFisher, Waltham, MA, USA, catalog #15596018), according to manufacturer's instructions.

The purity and concentration of RNA samples were measured using the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA samples that achieved adequate purity ratios ( $A_{260}/A_{280} = 1.9\text{--}2.1$ ) were used for subsequent analyses (Bustin, 2009). RNA integrity was also checked on 1% agarose gels containing SYBR® DNA gel stain (Invitrogen). After RNA extraction, 37 libraries were synthesized and sequenced using a NextSeq 500 System (Illumina, USA).

### **NGS read quality control, alignment and quantitation**

After sequencing, expression quantification was scored with htseq-count v0.6.0 based on STAR v2.6.1, alignments and the results were normalized and analyzed using Bioconductor-DESeq2 v1.32.0 package with R statistical software. Adjusted p value  $\leq 0.05$  were considered statistically significant. An automated pipeline was created using Targets package (v.0.12.0). For each set of data, contrasts between non-LP and LP were analyzed, with the Benjamini-Hochberg methods with  $\alpha = 0.05$  and Independent Hypothesis Weighting (IHW v1.20.0) being used to correction of significance values due to multiple hypotheses. PCAs and heatmaps were created in R statistical software.

### **Functional enrichment analysis**

Enrichment analysis of DEG were conducted in Gene Ontology (GO) (Ashburner et al; The Gene Ontology Consortium, 2020), KEGG and Reactome pathways using ClusterProfiler (Yu et al., 2012). Interaction networks and enriched pathways were constructed using cnetplot () function in R.

### **Receiver operating characteristic (ROC)**

In order to verify if gene expression was able to distinguish LP from non-LP, Receiver Operating Characteristic (ROC) curves and Area Under the Curve (AUC) were calculated using the pROC package in RStudio statistical software (ver. 4.2.2), For graphical

analysis of gene expression, data were normalized to RPKM, and genes that showed an AUC  $\geq 0.85$  were considered to be good potential biomarkers.

## Results

### Samples characteristics.

After clinical and histopathological assessments, bacilloscopy, and qPCR, all leprosy patients were classified according to Ridley and Jopling's criteria for disease, resulting in 11 TT patients and seven LL patients. The 19 non-LP samples were obtained from household contacts with no clinical signs and tested negative for bacilloscopy, Anti-PGL-I and RLEP-qPCR (Table 1). All LL samples had positive bacilloscopy, while all TT samples had negative bacilloscopy, which is in accordance with the expected characteristics of these leprosy subforms. Twelve (63.16%) TT samples were non-reactive for Anti-PGL-I and one (9.09%) was undetermined by RLEP-qPCR. One (14.23%) LL sample was non-reactive for Anti-PGL-I and all seven (100%) LL samples were positive by RLEP-qPCR (Table 1).

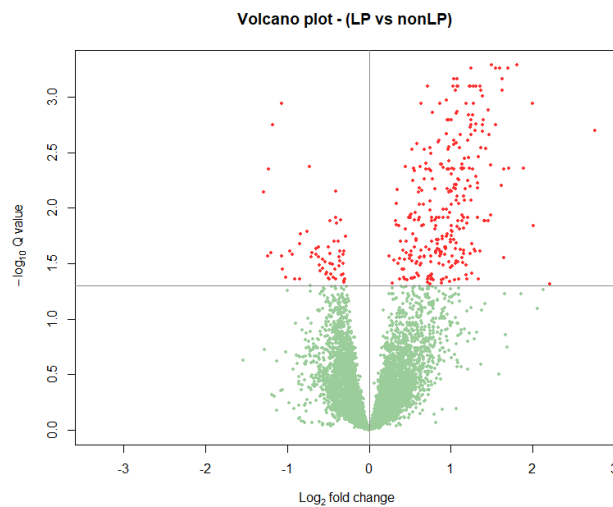
**Table 1.** Clinical characteristics of LP samples

Variable	LP (n = 18)	
	TT (n = 11)	LL (n = 7)
Age	38.73±16.83	47.86±14.26
<b>Bacilloscopy</b>		
Negative	11 (100%)	0 (0%)
Positive	0 (0%)	7 (100%)
<b>Anti-PGL-I</b>		
Non-reactive	8 (72.72%)	1 (14.23%)
Positive	3 (27.28%)	6 (85.71%)
<b>RLEP -qPCR</b>		
Undetermined	1 (9.09%)	0 (0%)
Positive	10 (90.91%)	7 (100%)

### Differential Expression Analysis

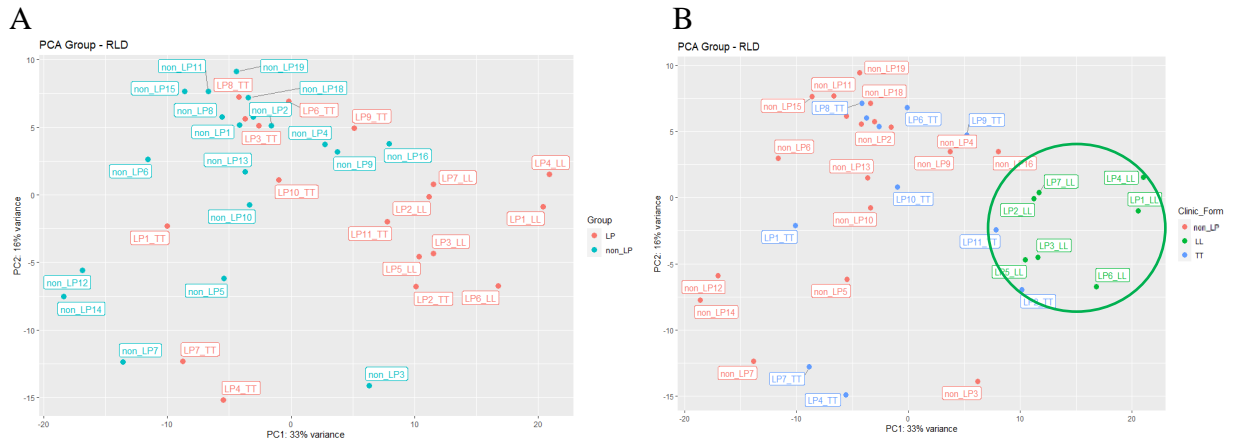
After quality control, alignment, and transcript quantitation, all transcript fragments were identified. From these sequences, between 1 and 2 million reads per sample (in most

samples) were recognized as mRNA genes, identifying a total of 358 DEG in LP when compared to non-LP, with 298 genes upregulated and 60 genes downregulated (Figure 1A). 1414 DEG were also found between LL vs non-LP, being 825 upregulated and 589 downregulated. 436 genes DEG were also found between LL vs TT forms, with 315 upregulated and 121 downregulated. Comparisons between TT and non-LP showed no differentially expressed genes.



**Figure 1.** Volcano plot with DEG between LP vs nonLP

PCA results suggest that the differences in gene expression patterns between LP and non-LP are not significant enough to be clearly distinguished using this tool (Figure 2A). However, when looking at the different clinical forms of leprosy, the LL group appears to have distinct gene expression patterns that separate it from both the non-LP group and the TT group (Figure 2B).



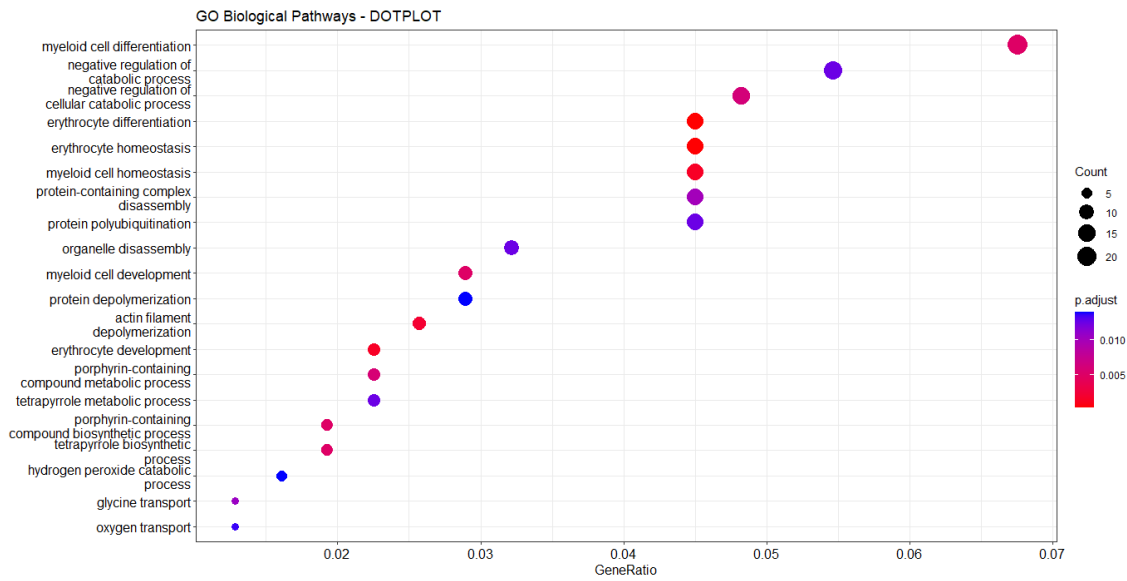
**Figure 2.** Principal Component Analysis (PCA) between comparison. A) PCA LP vs non-LP. B) PCA non-LP vs Clinic Forms (TT and LL)

### Enrichment analysis

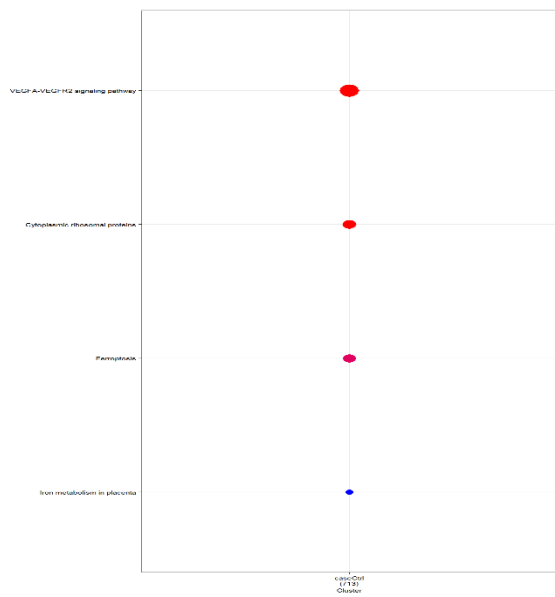
Enrichment analysis of DEG in GO showed processes that are related to leprosy, mainly apoptosis, autophagy, iron metabolism, cell cycle and immune system such as: development, differentiation and homeostasis of myeloid cell and vitamin D receptor signaling pathway (Figure 3A). Enrichment analysis conducted in KEGG and Reactome reveals autophagy, mitophagy, ferroptosis and some pathways related to immune system (Figura 3B-C), all of which can play important roles in leprosy.



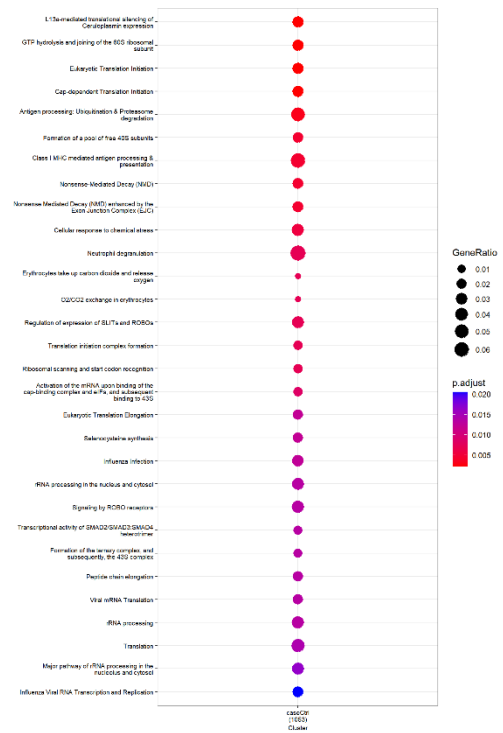
A



B



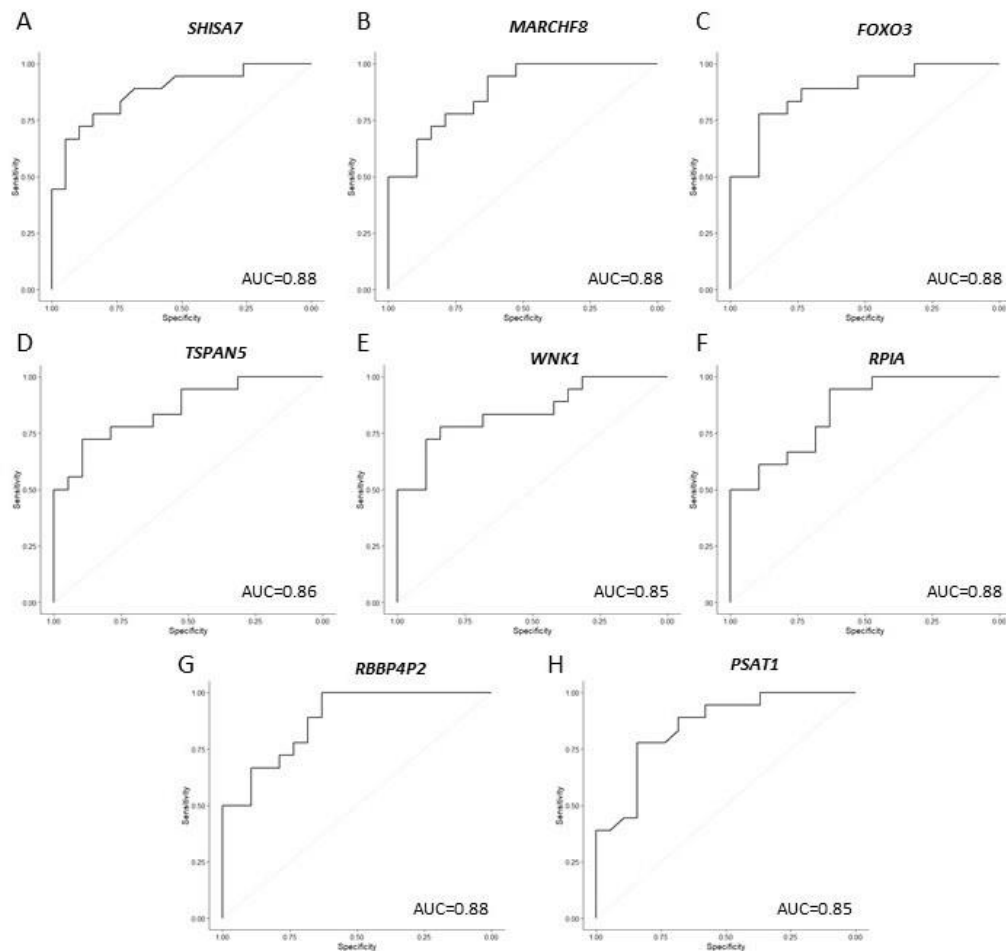
C



**Figure 3.** Functional enrichment analysis of the DEG. A) Gene ontology (GO). B) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). C) Reactome enrichment

## Evaluation of potential biomarkers for leprosy

To construct the ROC curves, the most differentially expressed genes were selected using the  $LFC > 1$  and  $p < 0.05$  filters, with 10 upregulated and 9 downregulated genes being selected. Among the upregulated genes, six (*SHISA7*, *MARCHF8*, *FOXO3*, *TSPAN5*, *WINK1* and *RPIA*) were able to discriminate with high accuracy between LP and non-LP ( $AUC \geq 0.85$ , Figure 4A-F). Likewise, among the downregulated genes, two (*RBBP4P2* and *PSAT1*) were also able to discriminate with high accuracy between LP and non-LP ( $AUC \geq 0.85$ , Figure 4G-H).



**Figure 4.** ROC curves of DEG with  $LFC > 1$  and  $p = 0$ . Between LP and non-LP. Area Under the Curve (AUC) with at least 0.85 was considered as good ability in discriminating between comparisons. A) *SHISA7*. B) *MARCHF8*. C) *FOXO3*. D) *TSPAN5*. E) *RPIA*. F) *RBBP4P2*. G) *PSAT1*.

## **Discussion**

Understanding the transcriptome is essential for interpreting the functional elements of the genome and revealing the molecular constituents of cells and tissues and also for understanding the development and disease. Transcriptomic studies provide insights into the genes that are turned on or off in response to different environmental or pathological conditions (Wang et al., 2009).

Here, we characterized a blood leprosy transcriptome in an Amazon population. Leprosy is a significant public health concern in the Amazon region, with Brazil having the second place at the highest number of cases globally. The Amazon region is considered an endemic area for the disease with a high incidence of leprosy cases reported (Barreto et al., 2014; Brasil, 2023; Da Silva et al., 2018; Gobbo et al., 2022; Silva et al., 2018). Several factors contribute to the high incidence of leprosy in the Amazon population, including poverty, poor living conditions, and limited access to healthcare services. Leprosy diagnosis is typically delayed and early diagnosis is challenging due to limited healthcare providers and professionals capable of identifying the disease. Such delay in diagnosis can result in the progression of the disease to its advanced stages, increasing the likelihood of transmission and compromising the quality of life of those affected (Alencar et al., 2012; Wilder-Smith and Van Brakel, 2008). In general, transcriptomic studies have provided valuable insights into the molecular mechanisms underlying leprosy, which can lead to the development of new diagnostic tools, therapies, and drugs (Leal-Calvo, 2021; Tió-Coma et al., 2019; Tió-Coma et al., 2021).

### **Apoptosis and autophagy are dysregulated in leprosy**

Pathogenic microorganisms aim to avoid detection and destruction the longest possible after invading a host. To achieve this, they modulate apoptosis in eukaryotic host cells either by activation or inhibition. By doing so, pathogens can evade the host immune system, allowing for sustained colonization and infection. Nevertheless, it is important to note that apoptosis also plays a key role in the host defense against pathogens. The process of apoptosis can regulate the immune response and limit the severity of infection (Favaloro

et al.,2012). In our study, we founded the upregulation of several genes with anti-apoptotic effects. *BCL2* is involved in regulating apoptosis. Previous studies have shown that repression of this gene is associated with the induction of apoptosis (Mcgarvey, 2004). *HSPB1* can inhibit apoptosis signaling caused by cellular stressors (Samali et al., 2001). Overexpression of *HSPB1* was found to protect against apoptosis triggered by endoplasmic reticulum stress by enhancing the degradation of BIM, a pro-apoptotic protein in the BCL2 family (Kennedy et al., 2017; O'connor, 1998). *E2F2* provides genomic stability to activated T lymphocytes and plays a specific anti-apoptotic function (Mustafa et al., 2021). *AKT1S1* can decrease the levels of proapoptotic proteins and may lead to the inhibition of apoptosis (Kim et al., 2013; Zhao et al., 2019). *SIAH2* acts as important mediators of death receptor mediated apoptosis through the modulation of caspase-8 activity (Christian et al., 2011). The *GSK-3* isoforms play regulatory roles in various cellular processes, such as the cell cycle, apoptosis, DNA repair, tumor metabolism, invasion, and metastasis (Martelli et al., 2021). It was showed that silencing *GSK3A* exerted their effects primarily before TRAIL-induced caspase activation (Ovcharenko et al., 2007). Taken together, all these evidences allow us to propose that leprosy leads to anti-apoptotic profile could be modulated depending on the spectrum of the disease, in general driven by *BCL2L1*, *HSPB1*, *E2F2*, *AKT1S1*, *SIAH2* and *GSK-3* genes.

Several studies have shown autophagy to be an important mechanism in the elimination of various pathogens such as *M. tuberculosis* (Deretic, 2014), *Escherichia coli* (Xue et al.,20117), *Staphylococcus aureus* (Wang et al., 2011) among others, including *M. leprae* (Silva et al., 2017). *M. leprae* infection was found to alter host cell autophagy as an immune escape mechanism, which is countered by Th1 cytokine IFN- $\gamma$  stimulation. Conversely, Th2 cytokines IL-4 and IL-13 inhibit autophagy in both murine and human macrophages (Harris et al., 2009). Genes involved in autophagy, such as *ATG9A*, *TBC1D25* and *WIPI2*, were found to be upregulated in LP that plays a crucial role in the early stages of autophagy by contributing to the expansion of the phagophore membrane. *ATG9A* codes for a protein that has a role in the expansion of the phagophore membrane in the early stages of autophagy (Mailler et al., 2021). *ATG9A* interacts with AP2 and together with the RabGAP protein *TBC1D5* is required for autophagosome formation (Popovic et al., 2014). *WIPI2* is a component of the autophagy machinery that controls the major intracellular degradation process by which cytoplasmic materials are packaged into autophagosomes and

delivered to lysosomes for degradation (Polson et al., 2010). Studies have demonstrated the participation of autophagy in the skin immune response against *M. leprae* in both the polar forms of leprosy. It was related that autophagy occur at basal levels in the LL pole while at the TT pole is upregulated. Furthermore, proinflammatory cytokines present in the TT pole may promote both apoptosis and autophagic induction. This implies that the autophagy triggered by these cytokines in TT leprosy lesions may play a role in eliminating the mycobacteria. (Silva et al., 2017). Finally, autophagy plays a complex role in the pathogenesis of leprosy, both in the host defense against *M. leprae* and in the pathogenesis of the disease (Watson et al., 2012).

### **Ferroptosis and iron metabolism**

Ferroptosis is a type of regulated cell death that is characterized by iron-dependent lipid peroxidation. It is regulated by several cellular metabolic pathways, including redox homeostasis, iron handling, mitochondrial activity, and amino acid, lipid, and sugar metabolism. Additionally, various signaling pathways relevant to disease are involved in regulating this process (Jiang et al., 2021; Li et al., 2020). Ferroptosis has received increased attention in the study of the pathophysiology of various infectious and noninfectious diseases (Callea et al., 2016; Jorgensen et al., 2017; Morris et al., 2018). Ferroptosis is caused by a redox imbalance between the production of oxidants and antioxidants, which is induced by the abnormal expression and activity of several redox-active enzymes that either generate or detoxify free radicals and lipid oxidation products (Tang et al., 2021).

Disbalance of  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  levels and cellular antioxidative capacity can lead to the generation of toxic lipid peroxides called alkoxyl radicals, which ultimately results in lytic cell death through the destabilization of membrane integrity (Miotto et al. 2019; Soustre and Rakotonirina 1981). The degradation of PUFA by lipoxygenases can also induce lipid peroxidation. The nature of lysis in ferroptosis differs from other forms of regulated necrotic cell death where the failure of GPX4 activity in removing lipid hydroperoxides from biological membranes leads to pore generation and micellization, resulting in irreversible damage to membrane integrity (Agmon et al. 2018). The enzymes cyclooxygenases and lipoxygenases compete for arachidonic acid and play important roles in modulating host

defense and cell death following *M. tuberculosis* infection (Divangahi et al. 2009). Lipoxygenases induce peroxidation of PUFA and are involved in ferroptosis, while prostaglandins induced by cyclooxygenases promote cell viability by inducing GPX4 activity (Karuppagounder et al. 2018; Yang et al. 2014). Lipoxin A4 has a deleterious effect on host cell response against *Mycobacterium tuberculosis* by promoting macrophage necrosis, while PGE2 protects macrophages from necrosis and favors host resistance to *M. tuberculosis* (Bafca et al. 2005; Behar et al. 2010; Chen et al. 2008). Ferroptosis has been shown to be involved in *M. tuberculosis*-induced necrotic cell death, which is associated with increased levels of intracellular labile iron, mitochondrial superoxide, accumulation of lipid peroxides, and cellular necrosis (Amaral et al. 2019). A recent study has shown that *M. tuberculosis* can take control of the epigenetic machinery within host cells, leading to the induction of ferroptosis and ultimately promoting the pathogenicity and dissemination of the pathogen (Gan, 2023). However, the exact mechanism through which *M. tuberculosis* induces ferroptosis remains unclear. In leprosy, the distinction between M1 and M2 macrophages is not always clear-cut and there is a continuum of phenotypes between them. Lepromatous macrophages, which typically express M2 markers, also exhibit some M1 characteristics, such as increased iron storage and reduced expression of the iron exporter Ferroportin (Fpn-1) which may contribute to the survival of *M. leprae* inside these cells (Pinheiro et al., 2018). Furthermore, iron may play a role in regulating indoleamine 2,3 dioxygenase expression through a mechanism involving IL-10. This may contribute to the prevalence of the M2-like phenotype in LL lesions, which promotes phagocytosis and survival of *M. leprae* within host cells (de Mattos Barbosa et al., 2017). Genes involved in ferroptosis and iron metabolism were found to be upregulated in LP, such as *PINK1*, *SLC25A37*, *SLC48A1*, *NRF2*, *TFR2* and *GLRX1*. *PINK1* mediates the degradation of *SLC25A37* and *SLC25A28*, therefore increasing mitochondrial iron accumulation (Li et al., 2018). *PINK2* plays role in degradation pathway and a special mitochondrial selection strategy dependent on organellar topology under starvation (Guo et al., 2022). At the ultrastructural level, cells undergoing ferroptosis frequently exhibit aberrant mitochondrial morphology, characterized by mitochondrial swelling, changes in membrane density, and rupture of the outer membrane. However, the role of mitochondria to the process of ferroptosis remains controversial (Tang et al., 2021). *SLC25A37* codes for a mitoferrin, which is responsible for importing iron into the mitochondria and maintaining iron homeostasis (Ali et al., 2022; Ni et al., 2020). Similarly, *SLC48A1* is crucial for heme-iron

recycling in mammals and is required for normal iron homeostasis (Simmons et al., 2020). *NRF2* is a key regulator of the cellular antioxidant response, controlling the expression of genes that protect against oxidative and electrophilic stresses (Dodson et al., 2019). *TFR2* codes for a glycoprotein that facilitates the uptake of iron into cells through receptor-mediated endocytosis (Silvestri et al., 2014). Additionally, *GLRX5* codes for a protein involved in iron-sulfur (Fe-S) cluster biogenesis, which is essential for various biological processes such as DNA repair and electron transport (Liu et al., 2014; Sankaran et al., 2021). Given the role of iron in innate and adaptive immune response, understanding the mechanisms underlying ferroptosis and iron metabolism in leprosy is critical and can provide insight into disease pathogenesis and potential therapeutic targets.

### **Vitamin D response**

The active form of vitamin D, 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1,25D<sub>3</sub>), not only regulates calcium and bone metabolism but also has an immunoregulatory role mediated through binding to the vitamin D receptor (VDR) in monocytes, macrophages and activated lymphocytes (Roy et al., 1999). There is evidence of abnormal metabolism of vitamin D endocrine system in leprosy patients who typically present bone deformities. Genetic factors, such as *VDR*, major histocompatibility complex (*MHC*) regions, *TLRs*, *NRAMP1*, *NOD2*, *PHEX*, and ErbB-2 tyrosine kinase growth factor receptor, contribute to both vitamin D status and leprosy (Lu'o'ng and Nguyễn, 2012). In our study, *KANK2* was found to be upregulated. This gene encodes the steroid receptor coactivator (SRC)-interacting protein (SIP), an ankyrin repeat containing protein, which sequesters SRCs in the cytoplasm and controls transcription activation of *VDR* (Ramot et al., 2014). Vitamin D has been shown to control several host immunomodulating properties through *VDR* gene and their deficiency was found to be linked to an increased risk for several infections and metabolic diseases (Singh et al., 2018). *PIMI* was also found to be upregulated in our study. This gene codes for a kinase that interacts with the DNA binding domain of the VDR. Studies in keratinocytes have shown that when PIM-1 kinase is overexpressed, it increases the transcription of endogenous calcitriol response genes and enhances the response to an extrachromosomal DR3 reporter. Conversely, when PIM-1 kinase is suppressed, the transcription of these genes is decreased. These findings suggest that the interaction between VDR and PIM-1 kinase is

involved in growth and differentiation mediated by calcitriol (Maier et al., 2012). Overall, the VDR plays a crucial role in the regulation of the immune response and antimicrobial defense in leprosy and its modulation by genetic and environmental factors might have important implications for the pathogenesis and clinical management of the disease.

### **Immune System**

The enriched terms related to the immune system include the development, differentiation, and homeostasis of myeloid cells, as well as, pathways related to class II MHC mediated antigen processing and presentation. *FOXO3* was upregulated in LP, this gene plays a significant role in the development and function of immune cells with suppressive functions during infections and immune stress conditions (Thompson et al., 2015). Studies have demonstrated that *FOXO3* is crucial for inducing FOXP3 expression in the development of T regulatory cells, central memory CD8+ T cells and the suppressive functions of myeloid cells and monocytes (Kerdiles et al., 2010; Lee et al., 2013; Ouyang et al., 2010). Another gene found to be upregulated in our study was *GATA1*, a transcription factor expressed in multiple hematopoietic lineages. A study showed that *GATA1* is expressed in both myeloid and plasmacytoid dendritic cells and its ablation has been shown to affect the survival of dendritic cells. It acts as a transcriptional regulator of dendritic cell differentiation, suggesting that it plays a role in the separation of dendritic cell and macrophage lineages (Gutiérrez et al., 2007). Likewise, it was demonstrated that *GATA1* controls the numbers of hematopoietic progenitors and their response to autoimmune neuroinflammation. Nevertheless, whether it plays a role in hematopoietic stem cell biology and the development of myeloid cells, and what that role might be, remains unclear (Hwang et al., 2022). *TALI*, which was also found to be upregulated in our study, regulates normal myeloid differentiation, controls the proliferation of erythroid progenitors, and determines the direction of hematopoietic stem cells differentiation (Vagapova et al., 2018). Overall, *FOXO3*, *GATA1* and *TALI* genes are important regulators of immune responses in leprosy, and their dysregulation may contribute to the chronic inflammation and tissue damage that are characteristic of the disease.



## Genes candidates as potential biomarkers for leprosy

Medical research on leprosy has an ongoing objective of identifying new risk factors associated with the disease. Advances in molecular biology, genetics, and computational biology are accelerating the pace of this research. In this research we aim to increase our understanding of the causes of leprosy. Additionally, the identification of new risk factors has the potential to improve the detection of individuals who are in the early stages of, or at high risk for, the disease. This, in turn, could lead to earlier diagnosis and treatment, ultimately improving outcomes for individuals affected by leprosy.

Six upregulated and two downregulated DEG showed AUC > 0.85, accurately distinguishing between LP and non-LP groups.

*SHISA7* codes for a single-passing transmembrane protein, and localizes at GABAergic inhibitory synapses and interacts with GABA type A receptors (GABAARs). The protein controls receptor abundance at synapses and speeds up the channel deactivation kinetics (Han et al, 2019). GABA is the major inhibitory neurotransmitter in the brain, acts primarily on GABAARs to mediate fast inhibitory synaptic transmission (Wu et al., 2021). One of the unusual properties of *M. leprae* is the neurotropism. The bacillus contains the enzyme glutamic acid decarboxylase that generates GABA and it was detected the presence of GABA in the infected tissues by *M leprae*. The exact role of the enzyme in *M. leprae* is not clear. The decarboxylation product GABA is an inhibitory neurotransmitter, and impairment of sensation in the lesions is an early sign of the infection (Prabhakaran et al., 1983; Prabhakaran et al., 1992).

*MARCHF8* codes for a member of RING-finger E3 ubiquitin ligases (Zhang et al., 2020). *MARCH8* protein downregulates a variety of cellular transmembrane proteins, such as MHC-II and several types of lymphocytes (Ohmura-Hoshino et al., 2006; Tze et al., 2011; Bartee et al., 2010; Eyster et al., 2011). Recent studies (Zhang et al., 2020; Zheng and Tang, 2021) have highlighted the dual role played by the *MARCH8* in viral infections. On the one hand, they contribute to cellular antiviral functions by disrupting viral production (Zhang et al., 2020). The same, can be repurposed by other viruses to enhance their infectivity or to downregulate important immunoreceptors thereby dampening the immune response and

facilitating viral replications (Zheng and Tang, 2021). However, its role in leprosy and others bacterial diseases still needs to be studied.

*FOXO3*, in addition to its role in the development of immune cells (Thompson et al., 2015), as mentioned earlier, has a wide expression and regulates diverse transcriptional programs such as cell cycle control, metabolism, and apoptosis (Kerdiles et al., 2010; Lee et al., 2013; Ouyang et al., 2010). With regard to *FOXO3* variability, information on the clinical outcome of inflammatory or infectious diseases is scarce (Lee et al., 2013). A study in malaria showed the contribution of *FOXO3* rs12212067T>G polymorphism in the regulation of the immune response during the infection (Nguetse et al., 2015). In Leprosy, a study conducted by our group found that *FOXO3* is regulated by two miRNAs (hsa-miR-155-5p and hsa-miR-223-3p), which were found to be overexpressed in patients with lepromatous leprosy. These results are related, along with other information, to an anti-apoptotic profile present in this type of polar form (Salgado et al., 2018).

*TSPAN5* encodes a protein that interacts with ADAM10, regulating its substrate cleavage and Notch signaling activation. It plays a critical role in various functions, including immunity. Nevertheless, there is no known association between *TSPAN5* and bacterial infections such as *M. leprae*. (Charrin et al., 2009; Charrin et al., 2014; Hemler, 2005). However, there is a lack of studies that establish a relationship between *TSPAN5* and bacterial infections, such as *M. leprae*.

The *WNK1* gene product is a kinase that is involved in a well-characterized signaling pathway regulating ion transport across cell membranes. In a recent study, it was discovered a novel function for *WNK1* as a negative regulator of autophagy in multiple cell lines, suggesting that *WNK1* action on autophagy is universal (Gallolu et al., 2017).

*RPIA* codes for an enzyme that plays an essential role in the carbohydrate metabolism. This gene has been linked to several types of cancer such as colorectal (Guo et al., 2020) and glioma (Minchenko et al., 2017). However, studies on infectious diseases are very limited.

*PSAT1* codes for an enzyme that catalyzes the first step in the serine biosynthetic pathway. The enzyme promotes cell proliferation and has been closely associated with

tumorigenesis in colon and breast cancer (Vie et al., 2008; Friederichs et al., 2005; Gao et al., 2017). Studies on bacterial diseases are scarce. Finally, *RBBP4P2* is a pseudogene with no information in literature (GeneCard). Although pseudogenes do not produce proteins, they can still have regulatory and structural functions and further studies are required to elucidate it.

The identification of novel blood-based biomarkers for leprosy can have significant implications in the prevention of infection and early diagnosis for asymptomatic patients and household contacts. Recent studies have shown that altered gene expression in various diseases can be utilized for diagnostic and therapeutic purposes. However, in leprosy, genomic studies remain limited. It is important to note that the genetic profile of the host is critical in the pathogenesis of leprosy. The use of these new biomarkers for early diagnosis and targeted therapies has the potential to significantly reduce transmission and prevent the progression to advanced stages of the disease. Nonetheless, it is essential to conduct further specific studies to fully elucidate the relation between some of the genes identified as potential biomarkers in our work and leprosy.

The current study presents a preliminary investigation of gene modulation as an element of host response in leprosy. Despite the relevant findings obtained, several limitations must be acknowledged. Firstly, our study did not consider the comorbidities of the participants, as many of them were not aware of the presence of other potential diseases they might be suffering from. Secondly, the low number of samples obtained did not permit the inclusion of other forms of leprosy in our analysis. Moreover, the establishment of a more robust relationship between the evaluated genes and the development of the disease requires a larger number of samples. These limitations emphasize the need for further research on the subject to provide a more comprehensive understanding of gene modulation in leprosy.

## References

- Agmon E, Solon J, Bassereau P, Stockwell BR. Modeling the effects of lipid peroxidation during ferroptosis on membrane properties. *Sci Rep*, 8(1):5155 (2018).
- Alencar CH, Ramos AN, Dos Santos ES, Richter J, Heukelbach J. Clusters of leprosy transmission and of late diagnosis in a highly endemic area in Brazil: focus on different spatial analysis approaches: High-risk leprosy clusters in an endemic area in Brazil. *Tropical Medicine & International Health*, 17:518–25 (2012).
- Ali MY, Oliva CR, Flor S, Griguer CE. Mitoferrin, Cellular and Mitochondrial Iron Homeostasis. *Cells*, 11:3464 (2022).
- Alter A, Grant A, Abel L, Alcais A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome* 2011;22(1-2):19–31.
- Amaral EP, Costa DL, Namasivayam S, Riteau N, Kamenyeva O, Mittereder L et al. A major role for ferroptosis in *Mycobacterium tuberculosis*-induced cell death and tissue necrosis. *J Exp Med.*, 216(3):556–570 (2019).
- Anselmo AN, Earnest S, Chen W, Juang Y-C, Kim SC, Zhao Y, et al. WNK1 and OSR1 regulate the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:10883–8 (2006).
- Bafca A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest.*, 115(6):1601–1606 (2005).
- Barbieri RR, Manta FSN, Moreira SJM, Sales AM, Nery JAC, Nascimento LPR, et al. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. *PLoS Negl Trop Dis*, 13(3):e0007147 (2019).
- Barreto JG, Bisanzio D, Guimarães L de S, Spencer JS, Vazquez-Prokopec GM, Kitron U, et al. Spatial Analysis Spotlighting Early Childhood Leprosy Transmission in a Hyperendemic Municipality of the Brazilian Amazon Region. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, e2665 (2018).
- Bartee E, Eyster CA, Viswanathan K, Mansouri M, Donaldson JG, Früh K. Membrane-Associated RING-CH proteins associate with Bap31 and target CD81 and CD44 to lysosomes. *PLOS ONE*, 5:e15132 (2010).
- Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol.*, 8(9):668–674 (2010).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Especial da Hanseníase. Brasília (2023).
- Callea M, Pedica F, Doglioni C. Programmed death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) as a new frontier in cancer immunotherapy and challenges for the pathologist: state of the art. *Pathologica*, 108:48–58 (2016).
- Cardona-Castro N, Beltran-Alzate JC, Manrique-Hernandez R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103 (4):332–6 (2008).
- Cardoso CC, Pereira AC, De Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiology*, 6:533–49 (2011).

- Carvalho RS, Foschiani IM, Costa M, Marta SN, da Cunha Lopes Virmond M. Early detection of *M. leprae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 37(10):1863–7 (2018).
- Charrin S, Jouannet S, Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins at a glance. *J Cell Sci*, 127:3641–8 (2014).
- Charrin S, le Naour F, Silvie O, Milhiet P-E, Boucheix C, Rubinstein E. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. *Biochem J*, 420:133–54 (2009).
- Chen M, Divangahi M, Gan H, Shin DS, Hong S, Lee DM et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. *J Exp Med.*, 205(12):2791–2801 (2008).
- Chen X, You YG, Yuan YH, Yuan LC, Wen Y. Host immune responses induced by specific *Mycobacterium leprae* antigens in an overnight whole-blood assay correlate with the diagnosis of paucibacillary leprosy patients in China. *PLoS Negl Trop Dis*, 13(4):e0007318 (2019).
- Christian PA, Fiandalo MV, Schwarze SR. Possible role of death receptor-mediated apoptosis by the E3 ubiquitin ligases Siah2 and POSH. *Mol Cancer*, 10:57 (2011).
- Da Silva, Moises B.; Portela, Juliana M.; Li, Wei; *et al.* Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLOS Negl. Trop. Dis.*, v. 12, n. 6, p. e0006532 (2018).
- de Mattos Barbosa MG, da Silva Prata RB, Andrade PR, Ferreira H, de Andrade Silva BJ, da Paixão de Oliveira JA, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase and iron are required for *Mycobacterium leprae* survival. *Microbes and Infection*, 19:505–14 (2017).
- De Mattos Barbosa, M.G., De Andrade Silva, B.J., Assis, T.Q., Da Silva Prata, R.B., Ferreira, H., Andrade, P. R. et al. Autophagy impairment is associated with increased inflammasome activation and reversal reaction development in multibacillary leprosy. *Front. Immunol.*, 9, 1223 (2018).
- Deretic V. Autophagy in Tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4:a018481–a018481 (2014).
- Divangahi M, Chen M, Gan H, Desjardins D, Hickman TT, Lee DM et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. *Nat Immunol.*, 10(8):899–906 (2009).
- Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biology*, 23:101107 (2019).
- Dwivedi VP, Banerjee A, Das I, Saha A, Dutta M, Bhardwaj B, et al. Diet and nutrition: an important risk factor in leprosy. *Microb Pathog*, 137:103714 (2019).
- Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, 104:554–63 (2013).
- Eyster CA, Cole NB, Petersen S, Viswanathan K, Früh K, Donaldson JG. MARCH ubiquitin ligases alter the itinerary of clathrin-independent cargo from recycling to degradation. *Molecular Biology of the Cell.*, 22:3218–3230 (2011).
- Feenstra SG, Nahar Q, Pahan D, Oskam L, Richardus JH. Recent food shortage is associated with leprosy disease in Bangladesh: a case-control study. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5):e1029 (2011).

- Friederichs J, Rosenberg R, Mages J, Janssen KP, Maeckl C, Nekarda H, Holzmann B, Siewert JR: Gene expression profiles of different clinical stages of colorectal carcinoma: Toward a molecular genetic understanding of tumor progression. *Int J Colorectal Dis.*, 20:391-402 (2005).
- Gallolu Kankanamalage S, Lee A-Y, Wichaidit C, Lorente-Rodriguez A, Shah AM, Stippec S, et al. WNK1 is an unexpected autophagy inhibitor. *Autophagy*, 13:969–70 (2017).
- Gama RS, Gomides TAR, Gama CFM, Moreira SJM, de Neves Manta FS, de Oliveira LBP, et al. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. *BMC Infectious Diseases*, 18(1):153 (2018).
- GAN, Boyi. Ferroptosis hijacking by *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications*, v. 14, n. 1, p. 1431 (2023).
- Gao S, Ge A, Xu S, You Z, Ning S, Zhao Y, et al. PSAT1 is regulated by ATF4 and enhances cell proliferation via the GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin/cyclin D1 signaling pathway in ER-negative breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res.*, 36:179 (2017).
- Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Goncalves MA, Goulart LR. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. *Clin Vaccine Immunol*, 15 (1):101–5 (2018)
- Guo J, Zhang Q, Su Y, Lu X, Wang Y, Yin M, et al. Arginine methylation of ribose-5-phosphate isomerase A senses glucose to promote human colorectal cancer cell survival. *Sci China Life Sci*, 63:1394–405 (2020).
- Gupta, R., Kar, H. K., & Bharadwaj, M. Revalidation of various clinical criteria for the classification of leprosy – A clinic-pathological study. *Leprosy Review*, 83(4), 354–362 (2012).
- Gutiérrez L, Nikolic T, Van Dijk TB, Hammad H, Vos N, Willart M, et al. Gata1 regulates dendritic-cell development and survival. *Blood*, 110:1933–41 (2007)
- Han W, Li J, Pelkey KA, Pandey S, Chen X, Wang Y-X, et al. Shisa7 is a GABA A receptor auxiliary subunit controlling benzodiazepine actions. *Science*, 366:246–50 (2019).
- Harris, J., Master, S.S., De Haro, S.A., Delgado, M., Roberts, E.A., Hope, J.C. et al. Th1-Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 128(1-3)37-43 (2009)
- Hemler ME. Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6:801–11 (2005).
- Hwang D, Ishikawa LLW, Seyedsadr MS, Mari E, Kasimoglu E, Sahin Z, et al. GATA1 controls numbers of hematopoietic progenitors and their response to autoimmune neuroinflammation. *Blood Advances*, 6:5980–94 (2022).
- Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22:266–82 (2021).
- Jingyi Guo, Yunhao Zhou, Dingfei Liu, Mengfei Wang, Yi Wu, Daolin Tang, Xingguo Liu, Mitochondria as multifaceted regulators of ferroptosis, *Life Metabolism*, 1, 2, 134–148 (2022).
- Jorge KTOS, Souza RP, Assis MTA, Araújo MG, Locati M, Jesus AMR, et al. Characterization of MicroRNA Expression Profiles and Identification of Potential Biomarkers in Leprosy. *J Clin Microbiol*, 55:1516–25 (2017).
- Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Rev Immunol.*, 17:151–164 (2017).

- Karuppagounder SS, Alin L, Chen Y, Brand D, Bourassa MW, Dietrich K et al. N-acetylcysteine targets 5 lipoxygenase-derived, toxic lipids and can synergize with prostaglandin E2 to inhibit ferroptosis and improve outcomes following hemorrhagic stroke in mice. *Ann Neurol.*, 84(6):854–872 (2018).
- Kennedy D, Mnich K, Oommen D, Chakravarthy R, Almeida-Souza L, Krols M, et al. HSPB1 facilitates ERK-mediated phosphorylation and degradation of BIM to attenuate endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Cell Death Dis.*, 8:e3026 (2017).
- Kerdiles Y. M., Stone E. L., Beisner D. R., McGargill M. A., Ch'en I. L., Stockmann C., Katayama C. D., Hedrick S. M. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity*, 33: 890–904 (2010).
- Kerr-Pontes LRS, Montenegro ACD, Barreto ML, Werneck GL, Feldmeier H. Inequality and leprosy in Northeast Brazil: an ecological study. *Int J Epidemiol*, 33(2):262–9 (2004).
- Kim W, Youn H, Kwon T, Kang J, Kim E, Son B, et al. PIM1 kinase inhibitors induce radiosensitization in non-small cell lung cancer cells. *Pharmacol Res.*, 70:90–101 (2013).
- Leal-Calvo T, Avanzi C, Mendes MA, Benjak A, Busso P, Pinheiro RO, et al. A new paradigm for leprosy diagnosis based on host gene expression. *PLOS Pathogens*, 17:e1009972 (2021).
- Leal-Calvo, Thyago; Avanzi, Charlotte; Mendes, Mayara Abud; et al. A new paradigm for leprosy diagnosis based on host gene expression. *PLOS Pathogens*, 17, 10, e1009972, (2021).
- Lee J. C., Espéli M., Anderson C. A., Linterman M. A., Pocock J. M., Williams N. J., Roberts R., Viatte S., Fu B., Peshu N., et al. UK IBD Genetics Consortium. Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell*, 155: 57–69 (2013).
- Li J, Cao F, Yin H, Huang Z, Lin Z, Mao N, et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*, 11:1–13 (2020).
- Li, L., Hao, Y., Zhao, Y., Wang, H., Zhao, X., Jiang, Y., et al. Ferroptosis is associated with oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced Sertoli cell death. *Int. J. Mol. Med.*, 41, 3051–3062 (2018).
- Liu G, Guo S, Anderson GJ, Camaschella C, Han B, Nie G. Heterozygous missense mutations in the GLRX5 gene cause sideroblastic anemia in a Chinese patient. *Blood*, 124:2750–1 (2014).
- Lu'o'ng K, vinh quốc, Nguyễn LTH. Role of the vitamin D in leprosy. *Am J Med Sci*, 343:471–82 (2012).
- Maier CJ, Maier RH, Rid R, Trost A, Hundsberger H, Eger A, et al. PIM-1 kinase interacts with the DNA binding domain of the vitamin D receptor: a further kinase implicated in 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> signaling. *BMC Molecular Biol.*, 13:18 (2012).
- Mailler E, Guardia CM, Bai X, Jarnik M, Williamson CD, Li Y, et al. The autophagy protein ATG9A enables lipid mobilization from lipid droplets. *Nat Commun*, 12:6750 (2021).
- Martelli AM, Evangelisti C, Paganelli F, Chiarini F, McCubrey JA. GSK-3: a multifaceted player in acute leukemias. *Leukemia*, 35:1829–42 (2021).
- Martins ACdC, Miranda A, Oliveira MLW-d-Rd, Bühner-Sékula S, Martinez A. Nasal mucosa study of leprosy contacts with positive serology for the phenolic glycolipid 1 antigen. *Braz J Otorhinolaryngol*, 76(5):579–87 (2010).

- Mcgarvey JA, Wagner D, Bermudez LE. Differential gene expression in mononuclear phagocytes infected with pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Clinical and Experimental Immunology*, 136:490–500 (2004).
- Minchenko OH, Garmash IA, Minchenko DO, Kuznetsova AY, Ratushna OO. Inhibition of IRE1 modifies hypoxic regulation of G6PD, GPI, TKT, TALDO1, PGLS and RPIA genes expression in U87 glioma cells. *UkrBiochemJ*, 89:38–49 (2017).
- Miotto G, Rossetto M, Di Paolo ML, Orian L, Venerando R, Roveri A et al., Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1. *Redox Biol.*, 28:101328 (2019).
- Misch EA, Berrington WR, Vary JC, Hawn TR. Leprosy and the Human Genome. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 74:589–620 (2010).
- Morris G, Walker AJ, Berk M, Maes M, Puri BK. Cell Death Pathways: A Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists. *Mol Neurobiol*, 55:5767–86 (2018).
- Nguetse CN, Kremsner PG, Velavan TP. FOXO3A regulatory polymorphism and susceptibility to severe malaria in Gabonese children. *Immunogenetics*, 67:67–71 (2015).
- Ni S, Kuang Y, Yuan Y, Yu B. Mitochondrion-mediated iron accumulation promotes carcinogenesis and Warburg effect through reactive oxygen species in osteosarcoma. *Cancer Cell International*, 20:399 (2020).
- O'Connor, L. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J.*, 17, 2, 384–395 (1998).
- Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Aoki M, Goto E, Mito M, Uematsu M, Kakiuchi T, Hotta H, Ishido S. Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. *The Journal of Immunology*, 177:341–354 (2006).
- Ouyang W., Beckett O., Ma Q., Paik J. H., DePinho R. A., Li M. O. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 11: 618–627 (2010).
- Ovcharenko D, Kelnar K, Johnson C, Leng N, Brown D. Genome-Scale MicroRNA and Small Interfering RNA Screens Identify Small RNA Modulators of TRAIL-Induced Apoptosis Pathway. *Cancer Research*, 67:10782–8 (2007).
- Parkash, O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: An analysis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 55(1), 1–5 (2009).
- Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJ de A, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, et al. Innate Immune Responses in Leprosy. *Frontiers in Immunology*, 9 (2018).
- Polson HEJ, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*, 6:506–22 (2010).
- Popovic D, Dikic I. TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO Rep*, 15:392–401 (2014).
- Prabhakaran K, Harris EB, Kirchheimer WF. Glutamic acid decarboxylase in *Mycobacterium leprae*. *Arch Microbiol*, 134:320–3 (1983).
- Prabhakaran K, Harris EB, Randhawa B. A unique type of GABA binding by *Mycobacterium leprae*. *Microbios*, 70:139–44 (1992).



- Queiroz EA, Medeiros NI, Mattos RT, Carvalho APM, Rodrigues-Alves ML, Dutra WO, et al. Immunological biomarkers of subclinical infection in household contacts of leprosy patients. *Immunobiology*, 224(4):518–25 (2019).
- Ramot Y, Molho-Pessach V, Meir T, Alper-Pinus R, Siam I, Tams S, et al. Mutation in *KANK2*, encoding a sequestering protein for steroid receptor coactivators, causes keratoderma and woolly hair. *Journal of Medical Genetics*, 51:388–94 (2014).
- RBBP4P2 Gene - GeneCards | RBBP4P2 Pseudogene n.d. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RBBP4P2> (accessed March 31, 2023).
- Rodrigues Júnior, I. A., Gresta, L. T., Noviello, M. de L. M., Cartelle, C. T., Lyon, S., & Arantes, R. M. E. Leprosy classification methods: A comparative study in a referral center in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, 45, 118–122 (2016).
- Roy S, Frodsham A, Saha B, Hazra SK, Mascie-Taylor CG, Hill AV. Association of vitamin D receptor genotype with leprosy type. *J Infect Dis*, 179:187–91 (1999).
- Salgado CG, Pinto P, Bouth RC, Gobbo AR, Messias ACC, Sandoval TV, et al. miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. *Front Immunol*, 9:463 (2018).
- Samali A, Robertson JD, Peterson E, Manero F, van Zeijl L, Paul C, et al. Hsp27 protects mitochondria of thermotolerant cells against apoptotic stimuli. *Cell Stress Chaperones*, 6:49–58 (2001).
- Sankaran BP, Gupta S, Tchan M, Devanapalli B, Rahman Y, Procopis P, et al. *GLRX5*-associated [Fe-S] cluster biogenesis disorder: further characterisation of the neurological phenotype and long-term outcome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 16:465 (2021).
- Santos DFD, Mendonca MR, Antunes DE, Sabino EFP, Pereira RC, Goulart LR, et al. Molecular, immunological and neurophysiological evaluations for early diagnosis of neural impairment in seropositive leprosy household contacts. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(5):e0006494 (2018).
- Silva ARD, Lima Neto PM, Santos LHD, Lima RJCP, Tauil PL, Gonçalves EDGDR. Factors associated with leprosy in a municipality of the Pre-Amazon region, state of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 51:789–94 (2018).
- Silva BJ de A, Barbosa MG de M, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA da C, Côte-Real S, et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLOS Pathogens*, 13:e1006103 (2017).
- Silvestri, L., Nai, A., Pagani, A., and Camaschella, C. The Extrahepatic Role of *TFR2* in Iron Homeostasis. *Front. Pharmacol.*, 5, 93 (2014).
- Simmons WR, Wain L, Toker J, Jagadeesh J, Garrett LJ, Pek RH, et al. Normal Iron Homeostasis Requires the Transporter *SLC48A1* for Efficient Heme-Iron Recycling in Mammals. *Frontiers in Genome Editing*, 2 (2020).
- Singh I, Lavania M, Pathak VK, Ahuja M, Turankar RP, Singh V, et al. *VDR* polymorphism, gene expression and vitamin D levels in leprosy patients from North Indian population. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12:e0006823 (2018).
- SIONOV, R. V.; VLAHOPOULOS, S. A.; GRANOT, Z. Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget*, v. 6, n. 27, p. 23058–23134 (2015).
- Soustre H, Rakotonirina A. Electrophysiological and mechanical studies of frog heart adrenoceptor stimulation by epinine. *Cardiovasc Res.*, 15(12):700–710 (1981).

Tang D, Chen X, Kang R, Kroemer G. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. *Cell Res*, 31:107–25 (2021).

Thompson MG, Larson M, Vidrine A, Barrios K, Navarro F, Meyers K, et al. FOXO3–NF- $\kappa$ B RelA Protein Complexes Reduce Proinflammatory Cell Signaling and Function. *The Journal of Immunology*, 195:5637–47 (2015).

Ti3-Coma M, Avanzi C, Verhard EM, Pierneef L, van Hooij A, Benjak A, et al. Genomic characterization of mycobacterium leprae to explore transmission patterns identifies new subtype in Bangladesh. *Front Microbiol*, 11 (2020).

Ti3-Coma M, Kielbasa SM, Van Den Eeden SJF, Mei H, Roy JC, Wallinga J, et al. Blood RNA signature RISK4LEP predicts leprosy years before clinical onset. *EBioMedicine*, 68:103379 (2021).

Ti3-Coma M, van Hooij A, Bobosha K, van der Ploeg-van Schip JJ, Banu S, Khadge S, et al. Whole blood RNA signatures in leprosy patients identify reversal reactions before clinical onset: a prospective, multicenter study. *Sci Rep*, 9:17931 (2019).

Ti3-Coma, Maria; Kielbasa, Szymon M.; van Den Eeden, Susan J.F.; et al. Blood RNA signature RISK4LEP predicts leprosy years before clinical onset. *EBioMedicine*, 68, 103379 (2021).

Ti3-Coma, Maria; VAN HOOIJ, Anouk; BOBOSHA, Kidist; et al. Whole blood RNA signatures in leprosy patients identify reversal reactions before clinical onset: a prospective, multicenter study. *Scientific Reports*, 9, 1, 17931 (2019).

Tze LE, Horikawa K, Domaschenz H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *The Journal of Experimental Medicine*, 208:149–165 (2011).

Vagapova ER, Spirin PV, Lebedev TD, Prassolov VS. The Role of TAL1 in Hematopoiesis and Leukemogenesis. *Acta Naturae*, 10(1):15-23 (2018).

van Hooij A, Ti3-Coma M, Verhard EM, Khatun M, Alam K, Tjon Kon Fat E, et al. Household contacts of leprosy patients in endemic areas display a specific innate immunity profile. *Front Immunol*, 11, 1811 (2020).

van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, Batista da Silva M, Carvalho Bouth R, Cunha Messias AC, Gobbo AR, et al. Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia. *Sci Rep*, 8(1):17920 (2018).

van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, Richardus R, van den Eeden SJ, Wilson L, de Dood CJ, et al. Quantitative lateral flow strip assays as user-friendly tools to detect biomarker profiles for leprosy. *Sci Reports*, 6:34260 (2016).

van Hooij A, Tjon Kon Fat EM, van den Eeden SJF, Wilson L, Batista da Silva M, Salgado CG, et al. Field-friendly serological tests for determination of *M. leprae*-specific antibodies. *Sci Rep*, 7(1):8868 (2017).

van Hooij A, van den Eeden S, Richardus R, Tjon Kon Fat E, Wilson L, Franken K, et al. Application of new host biomarker profiles in quantitative point-of-care tests facilitates leprosy diagnosis in the field. *EBioMedicine*, 47:301–8 (2019).

Vie N, Copois V, Bascoul-Mollevis C, Denis V, Bec N, Robert B, Fraslon C, Conseiller E, Molina F, Larroque C, Martineau P, Del Rio M, Gongora C: Overexpression of phosphoserine aminotransferase psat1 stimulates cell growth and increases chemoresistance of colon cancer cells. *Mol Cancer*, 7:14 (2008).

Vieira MCA, Nery JS, Paixão ES, Freitas de Andrade KV, Oliveira Penna G, Teixeira MG. Leprosy in children under 15 years of age in Brazil: A systematic review of the literature. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(10):e0006788 (2008).

Wang M, Fan Z, Han H. Autophagy in *Staphylococcus aureus* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11 (2021)

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet*, 10:57–63 (2009).

Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell*, 150(4):803–15 (2012).

Wilder-Smith EP, Van Brakel WH. Nerve damage in leprosy and its management. *Nat Rev Neurol*, 4:656–63 (2008).

Wu K, Han W, Tian Q, Li Y, Lu W. Activity- and sleep-dependent regulation of tonic inhibition by Shisa7. *Cell Reports*, 34:108899 (2021).

Xue Y, Du M, Sheng H, Hovde CJ, Zhu M-J. *Escherichia coli* O157:H7 suppresses host autophagy and promotes epithelial adhesion via Tir-mediated and cAMP-independent activation of protein kinase A. *Cell Death Discov*, 3:17055 (2017).

Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 156(1–2):317–331 (2014)

Yu G., Wang L.-G., Han Y., He Q.-Y. ClusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes among Gene Clusters. *Omics A J. Integr. Biol.*, 16:284–287 (2012).

Zhang FR, Huang W, Chen SM, Sun LD, Liu H, Li Y, et al. Genomewide association study of leprosy. *N Engl J Med*, 361(27):2609–18 (2009).

Zhang Y, Tada T, Ozono S, Kishigami S, Fujita H, Tokunaga K. MARCH8 inhibits viral infection by two different mechanisms. *ELife*, 9 (2020).

Zhang Y, Tada T, Ozono S, Kishigami S, Fujita H, Tokunaga K. MARCH8 inhibits viral infection by two different mechanisms. *Elife*, 9:e57763 (2020).

Zhao S, Li B, Li C, Gao H, Miao Y, He Y, et al. The Apoptosis Regulator 14-3-3 $\eta$  and Its Potential as a Therapeutic Target in Pituitary Oncocytoma. *Frontiers in Endocrinology*, 10 (2019).

Zheng C, Tang Y-D. When MARCH family proteins meet viral infections. *Virology Journal*, 18:49 (2021).

## **Acknowledgements**

This research was supported by funds from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível - CAPES – Biocomputacional (2013/CAPES). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - CNPq/MCTI/FNDCT (407922/2021-0). MÁCD was awarded with a PhD fellowship from the CNPq (142091/2019-7).

## **Author contributions**

MÁCD, LM and ÂRdS designed research; CGS, AG and PP enrolled patients, performed, and registered clinical diagnosis; MÁCD and LM performed research; MÁCD and GBSS analyzed the data; MÁCD wrote the article; MÁCD, GBSS, LM, PP, AG, CGS and ÂRdS agree with manuscript results and conclusions.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Embora a hanseníase seja considerada uma das doenças infecciosas mais antigas conhecidas na história, ainda há muito a ser compreendido sobre ela. Esta continua sendo um problema de saúde pública em muitos países, especialmente em regiões mais pobres e com menor acesso aos sistemas de saúde. Para reduzir a incidência e a prevalência da hanseníase, é fundamental compreender a epidemiologia, os fatores de risco associados, a importância do diagnóstico precoce, as melhores formas de prevenção e tratamento, bem como, a imunologia e a genética da doença. Somente dessa forma será possível desenvolver estratégias eficazes para o controle da hanseníase e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Este trabalho gerou três artigos, presentes nos capítulos I, II e III deste documento. O primeiro capítulo visou estudar o comportamento epidemiológico da hanseníase em vários países da América Latina no período compreendido entre 2011-2020. A compreensão da distribuição da hanseníase em uma determinada população e/ou território é essencial para a definição de políticas públicas de saúde e prevenção da doença, o que torna os estudos epidemiológicos uma ferramenta fundamental. Através deste estudo, foi possível obter informações importantes sobre a incidência, prevalência, alguns fatores de risco, padrões de transmissão, formas clínicas e evolução da doença, além de avaliar a eficácia das intervenções realizadas para o seu controle. Com base nessas informações, foi possível identificar os oito países da América Latina com as maiores taxas de incidência da hanseníase de acordo com os dados oficiais da OMS. O Brasil se destaca como o único país da região com uma prevalência maior que 1 por 10.000 habitantes, representando 93,77% dos casos até esse momento. No entanto, é importante ressaltar que a aparente diminuição de casos em outros países não significa necessariamente que a doença esteja desaparecendo, mas que possivelmente há subnotificação de casos, o que resulta em uma representatividade menor em comparação com o Brasil. A doença foi mais comum em homens do que em mulheres, e a forma MB foi mais prevalente do que a PB. Durante o período analisado, o Brasil também apresentou as maiores incidências de casos de hanseníase infantil e deficiência de grau 2.

Apesar da hanseníase ser considerada um problema de saúde pública apenas no Brasil, a maioria dos países da América Latina ainda registra casos todos os anos, o que indica um diagnóstico tardio e falta de atenção médica adequada. O estudo confirmou a importância da vigilância ativa, do diagnóstico precoce e do planejamento de ações contra a doença em todos os países avaliados, com o objetivo de reduzir ou interromper sua transmissão.

O segundo capítulo buscou validar um conjunto de nove miRNAs que foram achados com expressão diferenciada no estudo de Salgado e colaboradores (2018), a fim de propor novos biomarcadores para o diagnóstico precoce da doença. O diagnóstico precoce da hanseníase é uma tarefa desafiadora, sendo poucos os grupos ou profissionais de saúde capazes de realizá-lo. Esse cenário resulta em atrasos no diagnóstico, que podem acarretar o desenvolvimento de fases avançadas da doença, aumentando a probabilidade de transmissão e prejudicando a qualidade de vida dos pacientes. Nesse sentido, a pesquisa em miRNAs e suas vias regulatórias pode proporcionar novos conhecimentos sobre a complexa regulação genética e imunológica da doença, direcionando novas abordagens para a prevenção, diagnóstico e tratamento. O uso de miRNAs como possíveis biomarcadores da hanseníase apresenta-se como uma perspectiva particularmente promissora.

Este estudo coletou 108 amostras de sangue de pacientes com hanseníase, incluindo diferentes formas da doença, antes do tratamento, e de contatos domiciliares sem hanseníase. Foram analisados os níveis de expressão de nove miRNAs e foi avaliado o seu potencial como biomarcadores para distinguir pacientes com e sem hanseníase. Por fim, o estudo buscou os genes alvos dos miRNAs com expressão diferencial e realizou-se uma análise funcional.

Os miRNAs que apresentaram uma expressão diferencial em todas as comparações e com um AUC  $\geq 0,75$  foram identificados como possíveis biomarcadores de diagnóstico para hanseníase. Entre eles, *hsa-miR-144-5p* destacou-se como um possível biomarcador capaz de discriminar com precisão os grupos LP e non-LP, non-LP dos dois polos da doença e entre os dois polos da doença. Além disso, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-1291* e *hsa-miR-*

*106b-5p* apresentaram potencial para discriminar com precisão entre os grupos non-LP e LP, assim como entre o grupo non-LP e os dois polos, e *hsa-miR-16-5p* teve destaque em discriminar com precisão entre os grupos non-LP e LP e entre non-LP e o polo BL-LL.

Este trabalho também revelou que vários dos miRNAs estudados apresentaram diferença na expressão por sexo nos pacientes com hanseníase. Embora não tenham alcançado significância estatística, *hsa-miR-126-5p*, *hsa-15a-5p* e *hsa-let7f-5p* foram hipoexpressos em pacientes masculinos e não em femininos. Adicionalmente, *hsa-miR-1291* foi mais hiperexpresso em pacientes masculinos, desse modo sugere-se que pode ser um potencial biomarcador específico para este sexo. Em mulheres, *hsa-miR-16-5p*, *hsa-miR-20a-5p* e *hsa-miR-144-5p* mostraram potencial em discriminar com precisão entre várias das comparações realizadas. As diferenças na expressão de miRNAs entre homens e mulheres podem ser influenciadas pela interação entre hormônios sexuais e componentes do sistema imunológico (GUERRA-SILVEIRA, ABAD-FRANCH, 2013) ou pela dependência hormonal de *M. leprae* e desequilíbrios hormonais durante a hanseníase (REÉ et al., 1981).

Na patogênese da hanseníase, vários processos celulares importantes foram identificados, como apoptose, mitofagia e autofagia. Foi demonstrado que a apoptose de células imunológicas e nervos afetados pela doença contribui para a imunossupressão e o dano tecidual na hanseníase (FAVALORO et al., 2012). Além disso, a autofagia e mitofagia (VAN HOOIJ; ANNEMIEKE, 2021) podem estar envolvidas na resposta imune e na sobrevivência celular dos patógenos dentro das células hospedeiras (HARRIS et al., 2008; SILVA et al., 2017; VAN HOOIJ; ANNEMIEKE, 2021).

Em nosso estudo foi encontrado que os genes antiapoptóticos *BCL2* e *AKT3* são alvos de vários miRNAs hiperexpressos nas amostras de pacientes LP. Porém, ao comparar a expressão de miRNAs entre os dois polos, *hsa-miR-15a-5p* apresentou uma expressão 4 vezes menor na forma BL-LL, sugerindo uma menor regulação de seus genes alvos *BCL2* e *AKT3* nesses pacientes. Isso pode resultar em um perfil antiapoptótico nesse polo, que está associado a uma diminuição na resposta imune (SIONOV et al., 2015). Do mesmo modo, a forma BT-TT estaria apresentando um perfil pró-apoptótico, associado a uma melhor resposta imune. Além disso, AKT inibe a expressão dos genes pró-apoptóticos *YAP1* e

*FOXO3*, enquanto estimula a expressão do gene antiapoptótico *MDM4*. O gene pró-apoptótico *BCL2L11* é regulado por *hsa-miR-20a-5p* que foi encontrado mais hiperexpresso na forma BL-LL, levando a um estado antiapoptótico nessa forma da doença, o que está associado a uma resposta imune menos eficaz. Adicionalmente, *hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-106b-5p* e *hsa-miR-144-5p* ao inibir *SMAD4* e *SMAD7* inibem a apoptose, ativando a via de sinalização do TGF- $\beta$  (YAO et al., 2018; ZOU, 2011). Notavelmente, *hsa-miR-144-5p* foi hiperexpresso 38 vezes mais na forma BL-LL, favorecendo o estado antiapoptótico nesse polo.

A autofagia e a mitofagia são processos celulares importantes que estão relacionados às respostas imunes contra patógenos intracelulares. A infecção por *M. leprae* altera a autofagia da célula hospedeira como um mecanismo de escape imune (SILVA et al., 2017). A mitofagia, por sua vez, desempenha um papel na diferenciação de macrófagos M1 ou M2, afetando a resposta imune e o fenótipo metabólico observado na apresentação espectral da hanseníase. As mitocôndrias também desempenham um papel no dano nervoso detectado em pacientes com hanseníase. Em resumo, a autofagia e a mitofagia podem afetar a resposta imune contra patógenos intracelulares, incluindo *M. leprae*, e também podem estar envolvidos no dano nervoso associado à hanseníase (VAN HOOIJ; GELUK, 2021).

A desregulação do ciclo celular e do sistema imunológico tem sido relacionada à patogênese da hanseníase. Entre os miRNAs estudados, encontram-se reguladores de genes envolvidos no controle do ciclo celular. *Hsa-miR-20a-5p*, *hsa-miR-26b-5p* e *hsa-miR-106b-5p* regulam o gene supressor de tumor *PTEN*, que participa na resistência a infecções por patógenos (SONG et al., 2012; HUANG et al., 2012). Além disso, *hsa-miR-15a-5p* e *hsa-miR-16-5p* desempenham um papel na regulação do gene supressor de tumor *TP53*, que é fundamental na regulação da resposta imune e na atividade antibacteriana. Embora estudos recentes tenham mostrado que a presença da proteína TP53 é essencial para a defesa do organismo contra bactérias, incluindo as *M. leprae*, a função exata de TP53 na infecção por micobactérias ainda não é totalmente compreendida (LIM et al., 2020). A hiperexpressão desses miRNAs pode afetar a expressão dos genes supracitados e, conseqüentemente, a sua atividade.

Outros genes envolvidos no ciclo celular são alvos dos miRNAs estudados, incluindo ciclinas, quinases dependentes de ciclinas e *RB1*. A expressão desses genes contribui para a ativação dos fatores de transcrição *E2F*, que, por sua vez, podem causar proliferação celular descontrolada e divisões celulares ectópicas (JOHNSON et al., 2016). *IFNG* é controlado por *hsa-miR16-5p*, que apresentou uma expressão 10 vezes maior em pacientes BL-LL do que em pacientes BT-TT. Foi relatado que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  têm papel importante na proteção imunológica. IFN- $\gamma$  ativa mecanismos antimicrobianos, levando à produção de óxido nítrico, um microbicida importante que destrói o bacilo liberando radicais livres (MOUBASHER et al., 1998). IFN- $\gamma$  também induz macrófagos a produzir TNF- $\alpha$ , levando à ativação dessas mesmas células. Vale ressaltar, que TNF- $\alpha$  está presente no soro de pacientes BT-TT e ausente no soro de pacientes BL-LL, indicando que a destruição do bacilo e a formação de granulomas devem estar relacionadas à presença dessa citocina (MURRAY et al., 1985; MADAN et al., 2011).

O estudo da expressão diferencial de miRNAs em doenças tem sido promissor na busca por novos biomarcadores com potencial prognóstico, diagnóstico e terapêutico. No entanto, apesar dos avanços, a pesquisa com miRNAs em doenças infecciosas, especialmente na hanseníase, ainda é insuficiente. Os miRNAs parecem desempenhar um papel importante na patogênese da hanseníase e, portanto, podem ser utilizados como novos biomarcadores para diagnóstico precoce e alvos terapêuticos. Dessa forma, é possível contribuir para a diminuição ou interrupção da transmissão da doença e prevenir o desenvolvimento de fases mais avançadas. Não obstante, mais estudos são necessários para compreender de forma mais ampla, o papel dos miRNAs na hanseníase e seu potencial uso em configurações clínicas.

O capítulo III teve como objetivo caracterizar o perfil de expressão global de genes em pacientes com hanseníase e em contatos domiciliares sem a doença, a fim de identificar possíveis biomarcadores para o diagnóstico precoce e relacioná-los com a sua imunopatologia.

Neste estudo, foram coletadas 37 amostras de sangue de 18 pacientes com hanseníase (LP, sendo 7 LL e 11 TT) antes de iniciar o tratamento MDT, e 19 contatos



domiciliares sem hanseníase (non-LP). A análise de expressão diferencial, revelou 358 genes diferencialmente expressos em pacientes com hanseníase, sendo 298 hiperexpressos e 60 hipoexpressos. Além disso, foram identificados 1.414 genes diferencialmente expressos entre pacientes com a forma LL e os contatos domiciliares sem hanseníase, com 825 hiperexpressos e 589 hipoexpressos. Também, foram encontrados 436 genes diferencialmente expressos entre as formas LL e TT, com 315 genes hiperexpressos e 121 hipoexpressos. No entanto, não foram encontrados genes diferencialmente expressos na comparação entre a forma TT e os contatos domiciliares sem hanseníase.

A análise de enriquecimento dos DEG em *Gene Ontology* (GO) revelou processos relevantes à hanseníase, sobretudo apoptose, autofagia, metabolismo do ferro, ciclo celular e sistema imunológico, como desenvolvimento, diferenciação e homeostase de células mieloides e a vias de sinalização do receptor de vitamina D. Já as análises de enriquecimento conduzidas em KEGG e Reactome apontaram para autofagia, mitofagia, ferroptose e algumas vias associadas ao sistema imunológico, sendo todas elas potencialmente importantes no cenário da hanseníase.

Microrganismos patogênicos tentam evitar a detecção e destruição através da modulação da apoptose nas células do hospedeiro. Isso pode permitir a colonização e infecção sustentadas, mas a apoptose também desempenha um papel na defesa do hospedeiro contra patógenos. Vários genes com efeitos antiapoptóticos foram hiperexpressos nos pacientes LP, incluindo *BCL2L1*, *HSPB1*, *E2F2*, *AKT1S1*, *SIAH2* e *GSK-3*. Citocinas pró-inflamatórias podem induzir a autofagia em lesões polares TT, mas membros da família *BCL2* podem impedir a indução da autofagia mediada em células com lesões polares LL (SILVA et al., 2017). Alguns genes envolvidos na autofagia foram encontrados hiperexpressos em LP, incluindo *ATG9A*, *TBC1D25* e *WIPI2*.

A ferroptose é um tipo de morte celular regulada, que ocorre através da peroxidação lipídica dependente de ferro. É controlada por diferentes vias metabólicas celulares e envolve várias vias de sinalização relevantes para doenças. Genes envolvidos na ferroptose e no metabolismo do ferro foram hiperexpressos em LP, como *PINK1*, *SLC25A37*,

*SLC48A1*, *NRF2*, *TFR2* e *GLRX1*. No entanto, os mecanismos moleculares específicos responsáveis pela ferroptose na infecção pelo *M. leprae* ainda não foram totalmente elucidados.

Na hanseníase, há uma continuidade de fenótipos entre os macrófagos M1 e M2, tornando a distinção entre eles menos esclarecida. Os macrófagos lepromatosos, que normalmente expressam marcadores M2, possuem características M1, como aumento do armazenamento de ferro e redução da expressão de ferroportina, o que pode favorecer a sobrevivência de *M. leprae* dentro dessas células (PINHEIRO et al., 2018). Além disso, o ferro contribui, através de vários mecanismos, para o fenótipo semelhante a M2 em lesões LL, favorecendo a fagocitose e a sobrevivência de *M. leprae* dentro das células hospedeiras (DE MATTOS BARBOSA et al., 2017).

Suplementarmente, neste trabalho encontrou-se genes importantes reguladores das respostas imunes na hanseníase como *FOXO3*, *GATA1* e *TAL1* que foram hiperexpressos no grupo LP. A disfunção desses genes contribui para um processo de inflamação crônica e danos teciduais, característicos da doença.

A vitamina D é um nutriente essencial que desempenha um papel importante na regulação do metabolismo ósseo e no sistema imunológico. A relação entre a vitamina D e a hanseníase, por meio da influência de fatores ambientais e genéticos tem sido estudada (LU'O'NG e HOÀNG NGUYỄN, 2012). A vitamina D (hormônio) pode ter um efeito direto na hanseníase por meio de seus receptores VDR, ou pode influenciar a hanseníase por meio de efeitos indiretos. *KANK2* e *PIM1* foram hiperexpressos no grupo LP. Esses genes participam no controle da ativação e na função do VDR (RAMOT et al., 2014; MAIER et al., 2012).

Para a avaliação de biomarcadores potenciais para a hanseníase, os genes mais diferencialmente expressos foram selecionados usando os filtros  $LFC > 1$  e  $p < 0,05$ , sendo escolhidos dez genes hiperexpressos e nove hipoexpressos. Entre os genes hiperexpressos, seis: *SHISA7*, *MARCHF8*, *FOXO3*, *TSPAN5*, *WINK1* e *RPIA*, foram capazes de discriminar com alta precisão os grupos LP e non-LP, mostrando uma  $AUC \geq 0,85$ . Da mesma forma, entre

os genes hipoexpressos, dois: *RBBP4P2* e *PSAT1*, também foram capazes de discriminar com alta precisão os grupos LP e non-LP, com uma AUC  $\geq 0,85$ .

Como já foi discutido previamente, a identificação de novos biomarcadores sanguíneos para a hanseníase pode ser importante para a prevenção e diagnóstico precoce da doença, visto que a expressão gênica alterada tem sido utilizada com sucesso em outras doenças. Porém, estudos genômicos específicos para a hanseníase ainda são limitados.

Em suma, os capítulos aqui expostos contribuem de forma particular para um melhor entendimento entre a relação do perfil genético e epigenético do hospedeiro e a patogênese da hanseníase. Adicionalmente, conseguimos identificar novos genes e miRNAs como potenciais biomarcadores de diagnóstico precoce, que são de extrema importância, pois podem auxiliar na redução da transmissão e prevenir a progressão da doença. Contudo, estudos adicionais são necessários para melhor esclarecer a relação entre esses biomarcadores e a hanseníase.

## 7. REFERÊNCIAS

ABEL, L.; DEMENASIS, F. Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *American Journal of Human Genetics*, v. 42, n. 2, p. 256–266, 1988.

ALTER, Andrea; ALCAÏS, Alexandre; ABEL, Laurent; et al. Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Human Genetics*, v. 123, n. 3, p. 227–235, 2008.

ALTER, Andrea; GRANT, Audrey; ABEL, Laurent; et al. Leprosy as a genetic disease. *Mammalian Genome*, v. 22, n. 1–2, p. 19–31, 2011.

ANDRADE, P. R.; AMADEU, T. P.; NERY, J. A.; et al. CD123, the plasmacytoid dendritic cell phenotypic marker, is abundant in leprosy type 1 reaction. *The British Journal of Dermatology*, v. 172, n. 1, p. 268–271, 2015.

BAHMANYAR, Edith Roset; SMITH, William Cairns; BRENNAN, Patrick; et al. Leprosy Diagnostic Test Development As a Prerequisite Towards Elimination: Requirements from the User's Perspective. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 2, p. e0004331, 2016.

BENNETT, Brian H.; PARKER, David L.; ROBSON, Mark. Leprosy: Steps Along the Journey of Eradication. *Public Health Reports*, v. 123, n. 2, p. 198–205, 2008.

BRANAGAN, P.; MORAN, B.; FITZGIBBON, M.; et al. Inoculation site leprosy in a tattoo as a paradoxical reaction following tuberculosis treatment. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease*, v. 20, n. 5, p. 706–708, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Especial da Hanseníase. Brasília, 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Especial da Hanseníase. Brasília, 2023.

CARDOSO, Cynthia Chester; PEREIRA, Ana Carla; DE SALES MARQUES, Carolinne; et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiology*, v. 6, n. 5, p. 533–549, 2011.

CHAKRAVARTI M.R.; VOGEL F. A twin study on leprosy, em: Becker, PE; Lenz, W; Vogel, F; Wendt G.G. (ed) *Topics in human genetics*, vol 1. 1973. New York. Georg Thieme, Stuttgart, p. 1–123.

CHU, Yongjun; COREY, David R. RNA Sequencing: Platform Selection, Experimental Design, and Data Interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics*, v. 22, n. 4, p. 271–274, 2012.

CLAPASSO, Andrea; CANATA, Silvia. Microbiology. In NUNZI, Enrico; MASSONE, Cesare (Orgs.). *Leprosy*. Milano: Springer Milan, 2012.

COKUS, Shawn J.; FENG, Suhua; ZHANG, Xiaoyu; et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, v. 452, n. 7184, p. 215–219, 2008.

COLE, S.T; EIGLMEIER, K; PARKHILL, J.; et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, v. 409, p. 1007–1011, 2001.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E. Leprosy: Confirmation in the Armadillo. *Science*, v. 184, n. 4142, p. 1191–1192, 1974.

COUTO DAL SECCO, Raissa Gonçalves; FRANÇA, Katlein; CASTILLO, David; et al. A synopsis of the history of Hansen's disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, v. 167, n. S1, p. 27–30, 2017.

CRUZ, Rossilene Conceição da Silva; BÜHRER-SÉKULA, Samira; PENNA, Maria Lúcia F.; et al. Leprosy: current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 92, n. 6, p. 761–773, 2017.

DA SILVA, Moises B.; PORTELA, Juliana M.; LI, Wei; et al. Evidence of zoonotic leprosy in Pará, Brazilian Amazon, and risks associated with human contact or consumption of armadillos. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, n. 6, p. e0006532, 2018.

DE ALVARENGA LIRA, Marcia Lanzoni; PAGLIARI, Carla; DE LIMA SILVA, Aline Alves; et al. Dermal dendrocytes FXIIIa+ are essential antigen-presenting cells in indeterminate leprosy. *The American Journal of Dermatopathology*, v. 37, n. 4, p. 269–273, 2015.

DE MATTOS BARBOSA, Mayara Garcia; DE ANDRADE SILVA, Bruno Jorge; ASSIS, Tayná Quintella; et al. Autophagy Impairment Is Associated With Increased Inflammasome Activation and Reversal Reaction Development in Multibacillary Leprosy. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 1223, 2018.

DE SOUSA, Jorge Rodrigues; SOTTO, Mirian Nacagami; SIMÕES QUARESMA, Juarez Antonio. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1635, 2017.

DRAPER, Phillip. The bacteriology of *Mycobacterium leprae*. *Tubercle*, p. 43-56, 1983.

EICHELMANN, K.; GONZÁLEZ GONZÁLEZ, S.E.; SALAS-ALANIS, J.C.; et al. Lepra: puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. *Actas Dermo-Sifiligráficas*, v. 104, n. 7, p. 554–563, 2013.

EIDT, Letícia María. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade* v.13, n.2, p.76-88, 2004.

FALUS Orsolya. Leprosy – a stigmata in the 21st century. *Orvosi Hetilap*, v. 152, n. 7, p. 246–251, 2011.

FAVA, Vinicius M.; DALLMANN-SAUER, Monica; SCHURR, Erwin. Genetics of leprosy: today and beyond. *Human Genetics*, v. 139, n. 6–7, p. 835–846, 2020.

FAVALORO, B. et al. Role of Apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, v. 4, n. 5, p. 330–349, 2012.

GELUK, Annemieke; BOBOSHA, Kidist; VAN DER PLOEG-VAN SCHIP, Jolien J.; et al. New biomarkers with relevance to leprosy diagnosis applicable in areas hyperendemic for leprosy. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 188, n. 10, p. 4782–4791, 2012.

GHORPADE, A. Inoculation (tattoo) leprosy: a report of 31 cases. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, v. 16, n. 5, p. 494–499, 2002.

GILLIS, Thomas P. *Mycobacterium leprae*, em: *Molecular Medical Microbiology*. [s.l.]: Elsevier, 2015, p. 1655–1668.

GOBBO, Angélica Rita; BOUTH, Raquel Carvalho; MORAES, Tania Mara Pires; et al. NDO-BSA, LID-1, and NDO-LID Antibody Responses for Infection and RLEP by Quantitative PCR as a Confirmatory Test for Early Leprosy Diagnosis. *Frontiers in Tropical Diseases*, v. 3, 2022.

GUERRA-SILVEIRA, F.; ABAD-FRANCH, F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e62390, 2013.

GUERREIRO, Luana Tatiana Albuquerque; ROBOTOM-FERREIRA, Anna Beatriz; RIBEIRO-ALVES, Marcelo; et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PloS One*, v. 8, n. 6, p. e64748, 2013.

GUPTA, R., KAR, H. K., BHARADWAJ, M. Revalidation of various clinical criteria for the classification of leprosy – A clinic-pathological study. *Leprosy Review*, 83(4), 354–362, 2012

HAN, Xiang Y.; SEO, Yiel-Hea; SIZER, Kurt C.; et al. A New Mycobacterium Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 130, n. 6, p. 856–864, 2008.

HAN, Xiang Y.; SIZER, Kurt C.; THOMPSON, Erika J.; et al. Comparative Sequence Analysis of Mycobacterium leprae and the New Leprosy-Causing Mycobacterium lepromatosis. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 19, p. 6067–6074, 2009.

HANSEN, G. Armauer. On the Etiology of Leprosy. *The British and Foreign Medico-Chirurgical Review*, v. 55, n. 110, p. 459–489, 1875.

HARRIS, James; MASTER, Sharon S.; DE HARO, Sergio A.; et al. Th1 – Th2 polarisation and autophagy in the control of intracellular mycobacteria by macrophages. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 128, n. 1–3, p. 37–43, 2009.

HETT, Erik C.; RUBIN, Eric J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72, n. 1, p. 126–156, 2008.

HOCKINGS, Kimberley J.; MUBEMBA, Benjamin; AVANZI, Charlotte; et al. Leprosy in wild chimpanzees. *Nature*, v. 598, n. 7882, p. 652–656, 2021.

HUANG, Guochang; REDELMAN-SIDI, Gil; ROSEN, Neal; et al. Inhibition of mycobacterial infection by the tumor suppressor pten. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 27, p. 23196–23202, 2012.

JACOBSON, Robert; KRAHENBUHL, James. Leprosy. *Lancet*, v. 353, p. 655–660, 1999.

JIN, Song-Hyo; AHN, Kyu Joong; AN, Sungkwan. Importance of the immune response to Mycobacterium leprae in the skin. *Biomedical Dermatology*, v. 2, n. 1, p. 1, 2018.

JORGE, Karina T. O. S.; SOUZA, Renan P.; ASSIS, Marieta T. A.; et al. Characterization of MicroRNA Expression Profiles and Identification of Potential Biomarkers in Leprosy. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 55, n. 5, p. 1516–1525, 2017.

JOHNSON, Jackie; THIJSEN, Bram; MCDERMOTT, Ultan; et al. Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene*, v. 35, n. 37, p. 4829–4835, 2016.

KIBBIE, Jon; TELES, Rosane M. B.; WANG, Zhiming; et al. Jagged1 Instructs Macrophage Differentiation in Leprosy. *PLOS Pathogens*, v. 12, n. 8, p. e1005808, 2016

KUMAR, B; UPRETY, S; DOGRA. Clinical diagnosis of leprosy, em: SCOLLARD, D.M.; GILLIS, T.P. (ed), International textbook of leprosy. 2017. Disponível em: <https://www.internationaltextbookofleprosy.org>. Acesso em: 01 abr. 2020.

- LASTÓRIA, Joel Carlos; DE ABREU, Marilda Aparecida Milanez Morgado. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014.
- LEAL-CALVO, Thyago; AVANZI, Charlotte; MENDES, Mayara Abud; et al. A new paradigm for leprosy diagnosis based on host gene expression. *PLOS Pathogens*, v. 17, n. 10, p. e1009972, 2021.
- LIM, Yun-Ji; LEE, Junghwan; CHOI, Ji-Ae; *et al.* M1 macrophage dependent-p53 regulates the intracellular survival of mycobacteria. *Apoptosis*, v. 25, n. 1–2, p. 42–55, 2020.
- LU’O’NG, Khanh vinh quốc; HOÀNG NGUYỄN, Lan Thi. Role of the Vitamin D in Leprosy. *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 343, n. 6, p. 471–482, 2012.
- MADAN, Neha Kawatra; AGARWAL, Kiran; CHANDER, Ram. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Leprosy Review*, v. 82, n. 4, p. 371–382, 2011.
- MAIER, Christina J.; MAIER, Richard H.; RID, Raphaela; *et al.* PIM-1 kinase interacts with the DNA binding domain of the vitamin D receptor: a further kinase implicated in 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> signaling. *BMC Molecular Biology*, v. 13, n. 1, p. 18, 2012.
- MARCINEK, Patrick; JHA, Aditya Nath; SHINDE, Vidyagouri; et al. LRRK2 and RIPK2 Variants in the NOD 2-Mediated Signaling Pathway Are Associated with Susceptibility to Mycobacterium leprae in Indian Populations. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. e73103, 2013.
- MATHESON, Carney D.; VERNON, Kim K.; LAHTI, Arlene; et al. Molecular Exploration of the First-Century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem. *PLOS ONE*, v. 4, n. 12, p. e8319, 2009.
- MI, Zihao; LIU, Hong; ZHANG, Furen. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 567, 2020.
- MIRA, Marcelo T.; ALCAÏS, Alexandre; VAN THUC, Nguyen; et al. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature*, v. 427, n. 6975, p. 636–640, 2004
- MODLIN, Robert L. Th1-Th2 Paradigm: Insights from Leprosy. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 102, n. 6, p. 828–832, 1994.
- MONTOYA, Dennis; CRUZ, Daniel; TELES, Rosane M. B.; et al. Divergence of Macrophage Phagocytic and Antimicrobial Programs in Leprosy. *Cell Host & Microbe*, v. 6, n. 4, p. 343–353, 2009.
- MORTAZAVI, Ali; WILLIAMS, Brian A; MCCUE, Kenneth; et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, v. 5, n. 7, p. 621–628, 2008.
- MOUBASHER, Alaa El-Din A.; KAMEL, Neveen A.; ZEDAN, Hatem; *et al.* Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *International Journal of Dermatology*, v. 37, n. 10, p. 733–740, 1998.
- MUNJAL, Ashok; KHANDIA, Rekha; SHENDE, Kishor K.; et al. Mycobacterium lepromatosis genome exhibits unusually high CpG dinucleotide content and selection is key force in shaping codon usage. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 84, p. 104399, 2020.
- MURRAY, H. W.; SPITALNY, G. L.; NATHAN, C. F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 134, n. 3, p. 1619–1622, 1985.

- NATH, Indira; SAINI, Chaman; VALLURI, Vijaya Lakshmi. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clinics in Dermatology*, v. 33, n. 1, p. 90–98, 2015.
- NUNZI, Enrico; MASSONE, Cesare (Orgs.). *Leprosy*. Milano: Springer Milan, 2012.
- O'BRIEN, Carolyn; MALIK, Richard. History and mysteries of leprosy. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 19, n. 5, p. 496–497, 2017.
- OLIVEIRA, Ilanna Vanessa Pristo de Medeiros; DEPS, Patrícia Duarte; ANTUNES, João Marcelo Azevedo de Paula. Armadillos and leprosy: from infection to biological model. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 61, p. e44, 2019.
- PARKASH, O. (2009). Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: An analysis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 55(1), 1–5.
- PEPINELI, Afonso Carrasco; ALVES, Hugo Vicentin; TIYO, Bruna Tiaki; et al. Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms Are Associated With Leprosy in Southern Brazil. *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 2157, 2019.
- PINHEIRO, Roberta Olmo; DE SOUZA SALLES, Jorgenilce; SARNO, Euzenir Nunes; et al. *Mycobacterium leprae* –host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiology*, v. 6, n. 2, p. 217–230, 2011.
- PINHEIRO, Roberta Olmo; SCHMITZ, Veronica; SILVA, Bruno Jorge de Andrade; et al. Innate Immune Responses in Leprosy. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 518, 2018.
- PINTO, Pablo; DA SILVA, Moisés Batista; MOREIRA, Fabiano Cordeiro; et al. Leprosy piRnome: exploring new possibilities for an old disease. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 12648, 2020.
- PRATA, Rhana Berto da Silva; BARBOSA, Mayara Garcia de Mattos; SILVA, Bruno Jorge de Andrade; et al. *Macrophages in the Pathogenesis of Leprosy*. [s.l.]: IntechOpen, 2019.
- RAMOT, Yuval; MOLHO-PESSACH, Vered; MEIR, Tomer; et al. Mutation in KANK2, encoding a sequestering protein for steroid receptor coactivators, causes keratoderma and woolly hair. *Journal of Medical Genetics*, v. 51, n. 6, p. 388–394, 2014.
- RÉE, G. H. et al. Hormonal changes in human leprosy. *Leprosy Review*, v. 52, n. 2, p. 121–126, 1981.
- REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Médecine et Maladies Infectieuses*, v. 45, n. 9, p. 383–393, 2015.
- RIDLEY, D.S.; JOPLING, W.H. Classification of leprosy according the immunity. A five-group system. *International Journal of Leprosy*, v. 34, n; 3, p. 255-273, 1966.
- ROBBINS, Gwen; TRIPATHY, V. Mushrif; MISRA, V. N.; et al. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B.C.). *PLOS ONE*, v. 4, n. 5, p. e5669, 2009.
- RODRIGUES JÚNIOR, I. A., GRESTA, L. T., NOVIELLO, M. de L. M., CARTELLE, C. T., LYON, S., ARANTES, R. M. E. Leprosy classification methods: A comparative study in a referral center in Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, 45, 118–122. 2016.
- RODRIGUES, Laura C; LOCKWOOD, Diana NJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 11, n. 6, p. 464–470, 2011.



- ROY, S.; FRODSHAM, A.; SAHA, B.; et al. Association of Vitamin D Receptor Genotype with Leprosy Type. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 179, n. 1, p. 187–191, 1999.
- SADHU, S.; MITRA, D. K. Emerging Concepts of Adaptive Immunity in Leprosy. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 2018.
- SALGADO, Claudio Guedes; BARRETO, Josafá Gonçalves; DA SILVA, Moisés Batista; et al. What do we actually know about leprosy worldwide? *The Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 7, p. 778, 2016.
- SALGADO, Claudio Guedes; BARRETO, Josafá Gonçalves; DA SILVA, Moisés Batista; et al. Are leprosy case numbers reliable? *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 2, p. 135–137, 2018.
- SALGADO, Claudio Guedes; PINTO, Pablo; BOUTH, Raquel Carvalho; et al. miRNome Expression Analysis Reveals New Players on Leprosy Immune Physiopathology. *Frontiers in Immunology*, v. 9, p. 463, 2018.
- SCOTT, L; STEPHENSON; LINDENMAYER, G, et al. Guidelines for the control of leprosy in the Northern Territory, 2018.
- SCOLLARD, D.M. Pathogenesis and pathology of leprosy, Chapter 2.4. *In* Scollard DM, Gillis TP (ed), *International textbook of leprosy*. 2016. [www.internationaltextbookofleprosy.org](http://www.internationaltextbookofleprosy.org).
- SEGHAL, V. N., REGE, V. L. and VEDIRAJ, S. N. Inoculation leprosy subsequent to small-pox vaccination. *Dermatológica* 141(1970)393-396.
- SEHGAL, Alfica. *Leprosy*. Philadelphia: Chelsea House Publishers, 2006. (Deadly diseases and epidemics).
- SHEPARD, Charles C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *Journal of Experimental Medicine*, v. 112, n. 3, p. 445–454, 1960.
- SHIELDS, E D; RUSSELL, D A; PERICAK-VANCE, M A. Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *Journal of Clinical Investigation*, v. 79, n. 4, p. 1139–1143, 1987.
- SILVA, Bruno Jorge de Andrade; BARBOSA, Mayara Garcia de Mattos; ANDRADE, Priscila Ribeiro; et al. Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLOS Pathogens*, v. 13, n. 1, p. e1006103, 2017.
- SIMÕES QUARESMA, Juarez Antônio; DE OLIVEIRA, Michell Frank Alves; RIBEIRO GUIMARÃES, Angela Cristina; et al. CD1a and factor XIIIa immunohistochemistry in leprosy: a possible role of dendritic cells in the pathogenesis of *Mycobacterium leprae* infection. *The American Journal of Dermatopathology*, v. 31, n. 6, p. 527–531, 2009.
- SINGH, Pushpendra; COLE, Stewart T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiology*, v. 6, n. 1, p. 57–71, 2011.
- SONG, Min Sup; SALMENA, Leonardo; PANDOLFI, Pier Paolo. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 13, n. 5, p. 283–296, 2012.
- TIÓ-COMA, Maria; KIEŁBASA, Szymon M.; VAN DEN EEDEN, Susan J.F.; et al. Blood RNA signature RISK4LEP predicts leprosy years before clinical onset. *EBioMedicine*, v. 68, p. 103379, 2021.

- TIÓ-COMA, Maria; VAN HOOIJ, Anouk; BOBOSHA, Kidist; et al. Whole blood RNA signatures in leprosy patients identify reversal reactions before clinical onset: a prospective, multicenter study. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 17931, 2019.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia: Micobactérias*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p.431-432.
- VAN HOOIJ, Anouk; GELUK, Annemieke. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Immunological Reviews*, v. 301, n. 1, p. 175–192, 2021.
- VIRMOND, Marcos; GRZYBOWSKI, Andrzej; VIRMOND, Luiza. Leprosy: A glossary. *Clinics in Dermatology*, v. 33, n. 1, p. 8–18, 2015.
- VISSA, V.D.; BRENNAN, P.J. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology*, v. 2, n. 8, 2001
- VISSCHEDIJK, J.; VAN DE BROEK, J.; EGGENS, H.; et al. *Mycobacterium leprae*--millennium resistant! Leprosy control on the threshold of a new era. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, v. 5, n. 6, p. 388–399, 2000.
- WALKER, Stephen L.; WITHINGTON, Stephen G.; LOCKWOOD, Diana N.J. Leprosy. Em: *Manson's Tropical Infectious Diseases*. [s.l.]: Elsevier, 2014, p. 506-518.e1.
- WHITE, Cassandra; FRANCO-PAREDES, Carlos. Leprosy in the 21st Century. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 1, p. 80–94, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Weekly epidemiological record*, n. 36, 2020, 95, 417–440.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Weekly epidemiological record*, n. 36, 2022, 97, 429–452
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Weekly epidemiological record*, n. 36, 2021, 96, 421–444
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), REGIONAL OFFICE FOR SOUTH-EAST ASIA. *Global Leprosy Strategy 2016-2020. Accelerating towards a leprosy-free world. Monitoring and Evaluation Guide*. New Delhi 2017.
- YAO, Wang; PAN, Zengxiang; DU, Xing; et al. miR-181b-induced SMAD7 downregulation controls granulosa cell apoptosis through TGF- $\beta$  signaling by interacting with the TGFBR1 promoter. *Journal of Cellular Physiology*, v. 233, n. 9, p. 6807–6821, 2018.
- ZHAO, Sida; LI, Bin; LI, Chuzhong; et al. The Apoptosis Regulator 14-3-3 $\eta$  and Its Potential as a Therapeutic Target in Pituitary Oncocytoma. *Frontiers in Endocrinology*, v. 10, 2019.
- ZHANG, Fu-Ren; HUANG, Wei; CHEN, Shu-Min; et al. Genomewide Association Study of Leprosy. *New England Journal of Medicine*, v. 361, n. 27, p. 2609–2618, 2009.

## ANEXO I



### Universidade Federal do Pará Instituto de Ciências Biológicas

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Universidade Federal do Pará - URE Dr. Marcello Candia.

A equipe de pesquisadores liderada pelo Professor Dr. Claudio Guedes Salgado está realizando uma pesquisa cujo título é **“Hanseníase nos municípios do Pará: diagnóstico de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal local para manutenção das estratégias de controle da doença”**. Gostaríamos que você participasse desta pesquisa e para isso precisamos de sua autorização.

O estudo tem por objetivo identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética do micróbio que causa hanseníase, para entender melhor sobre a transmissão da doença, melhorando sua prevenção e tratamento.

As crianças e os adolescentes que participarem deste estudo serão submetidos à coleta de sangue e de raspado intradérmico, realizada por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificar o *Mycobacterium leprae*. Suas casas serão visitadas, para que seja feito um mapeamento dos casos de hanseníase por bairros e ruas.

A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue e de raspado poderão causar dor e pequena reação no local.

A participação nessa pesquisa é voluntária e você participará apenas se você autorizar. Sempre que desejar, será fornecido esclarecimento sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar o estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Está garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identificação dos participantes.

Tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado, AUTORIZO A MINHA PARTICIPAÇÃO COMO VOLUNTÁRIO DESTA PESQUISA, SEM QUE ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão dactiloscópica do participante

Doc: \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_, Data: \_\_/\_\_/\_\_

## ANEXO II



**Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (menores de idade)**  
**Instituição: Universidade Federal do Pará**

A equipe de pesquisadores liderada pelo Professor Dr. Claudio Guedes Salgado está realizando uma pesquisa cujo título é **“Hanseníase nos municípios do Pará: diagnóstico de novos casos, identificação de áreas críticas e treinamento de pessoal local para manutenção das estratégias de controle da doença”**. Gostaríamos que seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade participasse desta pesquisa e para isso, precisamos de sua autorização.

O estudo tem por objetivo identificar características relacionadas às pessoas, aos seus modos de vida, ao meio ambiente e à genética do micróbio que causa hanseníase, para entender melhor sobre a transmissão da doença, melhorando sua prevenção e tratamento.

As crianças e os adolescentes que participarem deste estudo serão submetidos à coleta de sangue e de raspado intradérmico, realizada por médicos e profissionais de saúde experientes, sempre com a finalidade de identificar o *Mycobacterium leprae*. Suas casas serão visitadas, para que seja feito um mapeamento dos casos de hanseníase por bairros e ruas.

A pesquisa será realizada em ambiente seguro, com material limpo e descartável. A coleta de sangue e de raspado poderão causar dor e pequena reação no local.

A participação nessa pesquisa é voluntária e seu filho participará apenas se você autorizar. Sempre que desejar, será fornecido esclarecimento sobre cada uma das etapas do estudo. A qualquer momento, o participante poderá recusar-se a continuar o estudo e retirar seu consentimento, sem que isso lhe traga qualquer penalidade ou prejuízo.

Está garantido o cumprimento do que fora informado acima, a gratuidade de todos os procedimentos e o sigilo da identificação dos participantes.

Declaração de pais ou responsáveis

Tendo compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado, AUTORIZO QUE  
MEU FILHO(A) \_\_\_\_\_,  
PARTICIPE DESTA PESQUISA, SEM QUE ISSO TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão dactiloscópica do(a) pai/ mãe ou responsável legal.

Doc: \_\_\_\_\_

Local: \_\_\_\_\_, Data: \_\_/\_\_/\_\_

## ANEXO III

### Artigo publicado



International Journal of  
*Molecular Sciences*



Review

# Roles and Mechanisms of the Long Noncoding RNAs in Cervical Cancer

Miguel Ángel Cáceres-Durán <sup>1</sup>, Ândrea Ribeiro-dos-Santos <sup>1,2</sup> and Amanda Ferreira Vidal <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Human and Medical Genetics, Institute of Biological Sciences, Graduate Program of Genetics and Molecular Biology, Federal University of Pará, Belém 66075-110, Brazil; macdur@gmail.com (M.Á.C.-D.); akelyufpa@gmail.com (Â.R.-d.-S.)
  - <sup>2</sup> Graduate Program in Oncology and Medical Sciences, Center of Oncology Researches, Federal University of Pará, Belém 66073-005, Brazil
- \* Correspondence: amandaferreiravidal@gmail.com; Tel.: +55-91-3201-7843

Received: 14 November 2020; Accepted: 10 December 2020; Published: 21 December 2020



**Abstract:** Cervical cancer (CC) continues to be one of the leading causes of death for women across the world. Although it has been determined that papillomavirus infection is one of the main causes of the etiology of the disease, genetic and epigenetic factors are also required for its progression. Among the epigenetic factors are included the long noncoding RNAs (lncRNAs), transcripts of more than 200 nucleotides (nt) that generally do not code for proteins and have been associated with diverse functions such as the regulation of transcription, translation, RNA metabolism, as well as stem cell maintenance and differentiation, cell autophagy and apoptosis. Recently, studies have begun to characterize the aberrant regulation of lncRNAs in CC cells and tissues, including Homeobox transcript antisense RNA (HOTAIR), H19, Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript1 (MALAT1), Cervical Carcinoma High-Expressed 1 (CCHE1), Antisense noncoding RNA in the inhibitors of cyclin-dependent kinase 4 (ANRIL), Growth arrest special 5 (GAS5) and Plasmacytoma variant translocation 1 (PVT1). They have been associated with several disease-related processes such as cell growth, cell proliferation, cell survival, metastasis and invasion as well as therapeutic resistance, and are novel potential biomarkers for diagnosis and prognosis in CC. In this review, we summarize the current literature regarding the knowledge we have about the roles and mechanisms of the lncRNAs in cervical neoplasia.

**Keywords:** cervical cancer; epigenetics; long noncoding RNAs; biological function; tumorigenesis

## 1. Introduction

Cervical cancer (CC) is the fourth most frequent cancer in women globally. It is a preventable disease and also curable if detected early and adequately treated. Yet it remains one of the most common cancers and the leading cause of cancer-related death in women across the globe [1].

CC occurs at the epithelium of the uterine cervix, particularly at the squamocolumnar junction of the ectocervix and endocervix, a site of continuous metaplastic activity [2]. Nearly all CCs are caused by human papillomavirus (HPV) infections, which is the most common sexually transmitted infection worldwide [3].

The two major histological types of epithelial tumors in the cervix are squamous cell carcinoma (SCC) and adenocarcinoma, the first being the most common one, comprising 95% of all diagnosed CCs worldwide, while the remaining 5% is represented by adenocarcinoma and other less common epithelial tumors [2].

The most common therapies used for CC treatment are radiotherapy and chemotherapy, but these methods are not always effective and can cause severe side effects. Hence, there is an evident interest

## ANEXO IV

### Artigo publicado

Meta Gene 28 (2021) 100889



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Meta Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mgene](https://www.elsevier.com/locate/mgene)



## Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and breast cancer susceptibility in a Brazilian population

Miguel Ángel Cáceres Durán<sup>a</sup>, Mariana Diniz Araújo<sup>a</sup>, Danilo do Rosário Pinheiro<sup>b</sup>, Rommel Mario Rodriguez Burbano<sup>c</sup>, Bárbara do Nascimento Borges<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Molecular Biology Laboratory, Biological Sciences Institute, Federal University of Para, Belém, Pará, Brazil

<sup>b</sup> Paragominas Campus, Federal Rural University of Amazonia, Paragominas, Pará, Brazil

<sup>c</sup> Molecular Biology Laboratory, Ophir Loyola Hospital, Belém, Pará, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Breast cancer  
Folate pathway  
Susceptibility

### ABSTRACT

Breast cancer (BC) is the most diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women worldwide. Polymorphisms in genes involved in the folate pathway are suggested as possible BC etiological factors. Among them, Thymidylate synthase (TYMS) has two polymorphisms related to BC: TSER and 1494del6. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) has two SNPs, C677T and A1298C, that also could increase breast cancer risk. This work aimed to determine if TYMS and MTHFR genes polymorphisms are related to BC risk in a population of North Brazil. A total of 124 DNA samples, obtained from BC patients and control women, were genotyped utilizing PCR and automatic sequencing. Chi-square, G-test, Fisher's exact test, and odds ratio were applied to analyse the data. Significant associations with BC risk were observed for TYMS 3R allele carriers. Besides, patients with the -6 allele of 1494del6 polymorphism were more likely to develop aggressive BC molecular tumor types (Luminal B, HER2-positive, and Triple-Negative). In conclusion, TYMS polymorphisms are related to BC risk in the studied population, as the 3R allele is associated with BC susceptibility and the presence of the 1494del6-6 allele increases the development risk of more aggressive BC subtypes. Those findings may be useful for predicting the efficacy of anti-TS drugs in BC patients.

### 1. Introduction

Breast cancer (BC) is the most diagnosed cancer and the leading cause of cancer death in women across the world. In 2020, BC surpassed lung cancer as the most diagnosed cancer worldwide with more than two million new cases registered (Fahad Ullah, 2019; Sung et al., 2021).

There are numerous risk factors such as sex, aging, estrogen, family history, gene mutations, and unhealthy lifestyle, which can increase the possibility of developing BC (Sun et al., 2017). Epigenetic modifications in the tumor microenvironment as well as folate deficiency can also increase BC risk. Biological functions of folate within so-called 'one-carbon metabolism' are to facilitate de novo dNTP synthesis and to provide methyl groups required for intracellular methylation reactions (da Silva Nogueira et al., 2012; Sun et al., 2017; Suzuki et al., 2008). It is known that polymorphisms in genes encoding critical enzymes involved in the folate pathway play an important role in folate metabolism influencing the risk of cancer, being described as possible

etiological factors of BC as well as an important factor in the response and outcome of chemotherapy (da Silva Nogueira et al., 2012).

Thymidylate synthase gene (TYMS), located at 18p11.32, encodes the thymidylate synthase enzyme (TS) that catalyzes the deoxyuridine monophosphate (dUMP) conversion to deoxythymidine monophosphate (dTMP), essential for thymidine production for DNA repair and synthesis (da Silva Nogueira et al., 2012). Due to the critical role of TS in nucleotide metabolism, this gene is a target of several chemotherapeutic agents including 5-fluorouracil (5-FU), capecitabine, and pemetrexed (Mandola et al., 2003). TYMS has polymorphisms in the 5'- and 3'- untranslated regions (UTRs), that influence gene expression (Yim et al., 2010). TSER (rs34743033) is a polymorphic 28 base-pair tandem repeats, resulting in two common alleles with double (2R) and triple (3R) repeats, uncovered in the 5'-UTR of the TYMS enhancer region and have been shown to influence gene expression. Another polymorphism in TYMS is 1494del6 (rs34489327) consisting of a 6 bp deletion of the sequence TTAAAG at nucleotide 1494 of the TYMS mRNA. Little is

## ANEXO V

### Artigo publicado



ACTA BIOCLINICA

Original

Cáceres Durán y Col

Volumen 11, Nº 21, Enero/Junio 2021

Depósito Legal: PPI201102ME3815

ISSN: 2244-8136

## POLIMORFISMOS EN GENES DE LA VÍA DE LOS FOLATOS Y SUASOCIACIÓN CON ENFERMEDADES HUMANAS

Miguel Ángel Cáceres Durán<sup>1-2</sup>, Bárbara do Nascimento Borges<sup>2</sup>

1. Laboratorio de Genética Humana y Médica. Instituto de Ciencias Biológicas.

Programa de Posgrado en Genética y Biología Molecular. UFPA.  
Brasil.

2. Laboratorio de Biología Molecular. Instituto de Ciencias Biológicas.

Programa de Posgrado en Neurociencias y Biología Celular. UFPA. Brasil.

**Correspondencia:** Laboratorio de Genética Humana y Médica. Universidad Federal de Pará, Brasil. Calle Augusto Correa, 01. Belém, PA, 66075-110. Teléfono: +55 91 98053-2660.

**E-mail:** [macdur@gmail.com](mailto:macdur@gmail.com)

### RESUMEN

El folato juega un papel esencial en procesos celulares importantes, entre ellos la síntesis de precursores del ADN y eventos epigenéticos como la metilación del ADN. Polimorfismos en genes involucrados en la vía de los folatos pueden estar asociados a diferentes tipos de enfermedades humanas, principalmente defectos en el tubo neural, autismo, enfermedades cardiovasculares y diversos tipos de cáncer. Se piensa que las variantes polimórficas T5ER y 1494del6 del gen *Timidilato sintasa (TYMS)*, C677T y A1298C del gen *Metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR)* y A1298G del gen *Metionina sintasa (MTR)* podrían ser funcionalmente relevantes y estar asociadas al riesgo de padecer

## ANEXO VI

### Artigo aceito para publicação

ISSN 2237-9223

REVISTA BRASILEIRA DE  
CRIMINALÍSTICA

DOI: <http://dx.doi.org/10.15260/rbc.v12i2.709>

## Epigenética em Ciências Forenses

M.A. Cáceres-Durán <sup>a,b\*</sup>, M.P.M. de Souza <sup>b,c</sup>, L.M. Cáceres <sup>d</sup>, P.A. Francez <sup>b,e</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Genética Humana e Médica. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém (PA), Brasil.

<sup>b</sup>Instituto Nacional de Perícias e Ciências Forenses, Belém (PA), Brasil.

<sup>c</sup>Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas. Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), Brasil.

<sup>d</sup>Dentista da Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

<sup>e</sup>Laboratório Forense da Polícia Técnico-Científica (POLITEC-AP), Macapá (AP), Brasil.

\*Endereço de e-mail para correspondência: [macdur@gmail.com](mailto:macdur@gmail.com). Tel.: +55-91-980532660.

---

### Resumo

A epigenética envolve mudanças na função dos genes que não estão relacionadas a mudanças na sequência do DNA. Dentro dos mecanismos epigenéticos estão a metilação do DNA e os RNAs não codificantes (ncRNAs). A metilação do DNA é um processo pelo qual se agrega grupos metil ao DNA e geralmente tem por função, dificultar a transcrição genética. Padrões de metilação podem ser usados no campo forense para determinação tecidual e de fluidos, estimativa de idade e diferenciação entre gêmeos monozigóticos. Os ncRNAs reguladores são moléculas de RNA que não são traduzidas em proteína, e têm uma importante função na regulação da expressão gênica. Dentre eles, os mais estudados são os microRNAs (miRNAs), que podem induzir silenciamento genético através da sua associação direta com o RNA mensageiro (mRNA). Numerosos estudos publicados relatam que muitos miRNAs são expressos de maneira tecido-específica, sendo bastante promissores para o campo forense na identificação de fluidos biológicos como sangue, sêmen, saliva e secreções vaginais. Os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) se valem de diversos mecanismos para regular a expressão gênica. Diversos estudos têm demonstrado o potencial uso dos lncRNAs como marcadores biológicos, no entanto, devido ao grande número de lncRNAs existentes, ainda precisam ser mais bem caracterizados para avaliar o seu possível uso no campo forense. As aplicações epigenéticas nas ciências forenses são relativamente novas e atualmente limitadas, entretanto, o mundo da epigenética tem o potencial de melhorar as investigações criminais, aumentando a quantidade de informações que podem ser obtidas de materiais biológicos obtidos nas cenas de crimes, contribuindo assim, no que diz respeito as evidências criminais para o sistema judicial.

*Palavras-Chave:* Epigenética; Epigenômica; Metilação; RNA não codificante.

---



## ANEXO VII

### Artigo submetido

# ANÁLISE DA QUALIDADE DE AMOSTRAS DE CRIMES SEXUAIS PROCESSADAS PELO LABORATÓRIO FORENSE DA POLÍCIA TÉCNICO- CIENTÍFICA DO AMAPÁ, ENTRE OS ANOS DE 2008 E 2021

De Souza, M. P. M.<sup>1</sup> Cáceres-Durán, M. A.<sup>1,2</sup>  
Amaral, T. M.<sup>1,2</sup> Brito, A. F. S.<sup>1,3</sup> Oliveira, T. A. C.<sup>1</sup> Francez, P. A. C.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Perícias e Ciências Forense (INFOR), Belém (PA), Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Genética Humana e Médica, UFPA, Belém (PA), Brasil.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus (AM), Brasil.

<sup>4</sup> Laboratório Forense da Polícia Técnico-Científica (POLITEC-AP), Macapá (AP), Brasil.

### Resumo

No Brasil, crimes sexuais são muito frequentes, e a devida coleta, acondicionamento, transporte e processamento de amostras biológicas é de suma importância para o prosseguimento da investigação e solucionamento de casos. A formulação de leis específicas e a implementação dos bancos de perfis genéticos, fizeram com que perfis genéticos oriundos de amostras encontradas em vítimas, vestígios e de condenados fossem submetidos aos bancos genéticos para realizar confrontos genéticos. Diante disso, este artigo teve como objetivo analisar amostras de DNA provenientes de crimes sexuais, atendidos pelo Laboratório Forense da POLITEC-AP, armazenadas entre os anos de 2008 e 2021, avaliando a qualidade das amostras ao longo desse período. Um total de 860 amostras foram processadas, o qual compreenderam amostras coletadas de região vaginal, vulvar, anal, oral e outras (crimes sexuais sem identificação da amostra, preservativos, vestimentas, etc). Desse total, 12,91% apresentaram DNA degradado, sendo o ano de 2009, com o de maior percentual de degradação, em relação ao total de amostras armazenadas para cada ano, com 47,06%, e o ano de 2018 com o menor percentual, correspondendo a 1,35%. As amostras de origem vaginal foram as que apresentaram maior porcentagem de degradação para nove dos quatorze anos avaliados. Contudo, apenas as amostras coletadas da região vulvar tiveram uma correlação positiva com as variáveis ano, média de misturas e média de amostras degradadas. Um total de 318 amostras (36,98%) tiveram seus perfis genéticos depositados no BNPG, sendo o ano de 2010 o de maior porcentagem de perfis genéticos depositados, correspondendo a 60,52%. Perfis genéticos depositados no BNPG podem ajudar na resolução e investigação de crimes sexuais e de outras vertentes, contribuindo assim para a redução de crimes.

**Palavras-Chave:** BNPG; RIBPG; Perfis Genéticos; Crimes Sexuais, Degradação do DNA.

## ANEXO VIII

### Artigo submetido

#### Potencial do uso de cianobactérias da Amazônia brasileira na recuperação de áreas degradadas pela mineração ilegal

<sup>1</sup> Mayque Paulo Miranda de Souza - Doutorando no PPGBPA, UEPA, Belém, Pará, Brasil  
[mmirand7@kent.edu](mailto:mmirand7@kent.edu)

<sup>2</sup> Miguel Ángel Cáceres Durán - Doutorando no PPGBM, UFPA, Belém, Pará, Brasil  
[macdur@gmail.com](mailto:macdur@gmail.com)

<sup>3</sup> Pablo Abdon da Costa Francez - Professor do INFOR e Perito Criminal na POLITEC-AP, Macapá, Amapá, Brasil  
[pabdon37@mail.com](mailto:pabdon37@mail.com)

*Submetido XX/XX/2023 – Aceito XX/XX/2023 – Publicado on-line XX/XX/2023*

#### Resumo

A mineração é uma atividade de extrema importância para um país, e ajuda a refletir na melhora da qualidade socioeconômica da população, com a geração de bens de consumo. Por outro lado, o não-cuidado com as áreas exploradas, como acontece geralmente em crimes ambientais, como a mineração ilegal, pode gerar graves consequências para o meio ambiente, afetando não somente a flora e fauna da região, mas também poluindo recursos hídricos importantes. Pensando nisso, formas alternativas e ecologicamente mais corretas, precisam ser consideradas. Neste contexto, a utilização de microrganismos com características de resistência a metais pesados, tais como a bioacumulação e bioissorção, presentes em cianobactérias, pode ser uma alternativa eficaz e com menor impacto ambiental. O objetivo deste trabalho foi identificar espécies/gêneros de cianobactérias reportados na literatura, como sendo capazes de remover metais pesados, e a partir disso, evidenciar cianobactérias da região amazônica com potencial de biorremediação de áreas contaminadas com metais. Para o desenvolvimento do trabalho de revisão, foram selecionados 33 artigos científicos, dentre os anos de 1998 e 2021, e identificou-se os gêneros *Nostoc*, *Anabaena* e *Microcystis*, como sendo os gêneros mais representativos de cianobactérias encontrados na região da Amazônia brasileira, com grande potencial de utilização na recuperação de ambientes contaminados com metais pesados.

**Palavras-Chave:** Cianobactéria, Biorremediação, Bioacumulação, Bioissorção e Ambiente Amazônico

## ANEXO IX

### Artigo em preparação

#### **ncRNAs: an unexplored cellular defense mechanism in leprosy**

Santana-da-Silva, Mayara Natália<sup>1,2</sup>; Sena-dos-Santos, Camille<sup>1</sup>; Cáceres-Durán, Miguel Ángel<sup>1</sup>; Gobbo, Angelica Rita<sup>3</sup>; Pinto, Pablo<sup>1,3</sup>; Salgado, Claudio Guedes<sup>3</sup>; Santos, Sidney Emanuel Batista dos Santos<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia e Eletrofisiologia Celular, Seção de Parasitologia (SAPAR), Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Dermato-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Pará (UFPA), Marituba, Brasil

#### **Introduction**

Leprosy (also known as Hansen's disease) is a dermatoneurological disease that progresses to deformities and incapacities if not diagnosed and treated correctly (Britton and Lockwood, 2004). The causative agent of leprosy, *Mycobacterium leprae*, is known for a tropism for the upper respiratory tract, skin macrophages and Schwann cells (SCs) of peripheral nerves, conferring neurodermatological manifestations, including hypopigmented or erythematous cutaneous patches, sensorimotor loss and thickened peripheral nerves (1,2,3).

## ANEXO X

### Artigo em preparação

#### WHOLE MITOGENOME SEQUENCING UNCOVERS A RELATION BETWEEN MITOCHONDRIAL HETEROPLASMY AND LEPROSY SEVERITY

Felipe Gouvea de Souza<sup>1</sup>, Moisés Batista da Silva<sup>2</sup>, Gilderlanio S. de Araújo<sup>1</sup>, Caio S. Silva<sup>1</sup>, Andrey Henrique Gama Pinheiro<sup>1</sup>, Miguel Ángel Cáceres-Durán<sup>1</sup>, Mayara Natália Santana-da-Silva<sup>1</sup>, Pablo Pinto<sup>1</sup>, Angélica Rita Gobbo<sup>2</sup>, Claudio Guedes Salgado<sup>2</sup>, Ândrea Ribeiro-dos-Santos<sup>1,\*</sup>, Giovanna C. Cavalcante<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Genética Humana e Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém 66075-110, PA, Brazil; felipegouveas2018@gmail.com (F.G.S.), scaio@hotmail.com (C.S.S.), gilderlanio@gmail.com (G.S.A.), andrey.biomed@gmail.com (A.H.G.P.), macdur@gmail.com (M.A.C.D.), mnsantanasilva@gmail.com (M.N.S.S.), akelyufpa@gmail.com (Â.R.S.), giovannaccavalcante@gmail.com (G.C.C.)

<sup>2</sup> Laboratório de Dermato-Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Marituba 67105-290, PA, Brazil; moises@ufpa.br (M.B.S.), angelik.gobbo@gmail.com (A.R.G.), claudioguedessalgado@gmail.com (C.G.S.)

\* Correspondence: [giovannaccavalcante@gmail.com](mailto:giovannaccavalcante@gmail.com); akelyufpa@gmail.com; Tel.: +55 91 3201-7843

#### Summary

In recent years, a mitochondria/immune system interaction has been proposed, so that variants of mitochondrial genome and levels of heteroplasmy might be deregulate important metabolic processes in the combat of infections, such as leprosy. Here, we sequenced the whole mitochondrial genome to investigate variants and heteroplasmy levels, considering patients with different clinical forms of leprosy and household contacts. We found 116 variants in at least two of the subtypes of the case group (Borderline Tuberculoid, Borderline Lepromatous, Lepromatous), suggesting a possible clinical significance to these variants. Notably, 15 variants were exclusively found in three clinical forms (m.3791T>C in *MT-ND1*, m.5317C>A in *MT-ND2*, m.8545G>A in *MT-ATP8*, m.9044T>C in *MT-ATP6* and m.15837T>C in *MT-CYB*). We found a significant number of variants and heteroplasmy levels in the leprosy patients from our cohort, suggesting for the first time that the mitogenome might be involved with the leprosy process, distinction of clinical forms and severity.

ANEXO XI

67th Brazilian Congress of Genetics

# GENÉTICA 22

12 a 15 | setembro | 2022  
Praiaamar Natal Hotel & Convention | Natal-RN

## CERTIFICADO

A Sociedade Brasileira de Genética concede a MIGUEL ÁNGEL CÁCERES DURÁN menção honrosa pela participação no Prêmio Painel Pós-Graduação com o trabalho na área de GENÉTICA HUMANA, MÉDICA E FARMACOGENÉTICA, intitulado "BLOOD TRANSCRIPTOME IN LEPROSY PATIENTS REVEALS NEW GENES INVOLVED IN THE IMMUNOPHYSIOLOGY OF THE DISEASE" autoria de Miguel Ángel Cáceres-Durán; Giordano Bruno Soares Souza; Angélica Rita Gobbo; Leandro Magalhães; Pablo Pinto; John Stewart Spencer; Cláudio Guedes Salgado; Andrea Kely Ribeiro-dos-Santos, apresentado durante o GENÉTICA 2022 – 67th Brazilian Congress of Genetics, em Natal, RN, período de 12 a 15 de Setembro de 2022.

Patrocinador: Sociedade Brasileira de Genética ID127

*Ana Miriam Benito Iseppon*  
Ana Miriam Benito Iseppon  
Presidente da SBG

*Andrea Kely Ribeiro dos Santos*  
Andrea Kely Ribeiro dos Santos  
Primeira Secretária da SBG