

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora,

o texto completo desta

TESE

será

disponibilizado somente a partir

de

21/06/2020.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
Campus de Araçatuba

LARISSA MARTINS MELO

**O PAPEL DOS MIRNA NA INFECÇÃO DE LEUCÓCITOS
ESPLÊNICOS DE CÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM***

Araçatuba

2018

LARISSA MARTINS MELO

**O PAPEL DOS MIRNA NA INFECÇÃO DE LEUCÓCITOS
ESPLÊNICOS DE CÃO POR *LEISHMANIA INFANTUM***

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Área de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Prof.^a Ass. Valéria Marçal Felix de Lima

Araçatuba

2018

M528p

MELO, LARISSA MARTINS

O PAPEL DOS MIRNA NA INFECÇÃO DE
LEUCÓCITOS ESPLÊNICOS DE CÃO POR LEISHMANIA
INFANTUM / LARISSA MARTINS MELO. -- , 2018

73 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,

Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima

1. Leishmaniose canina. 2. Imunologia. 3. Epigenética. 4.
microRNAs. 5. Transfecção. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: O papel dos miRNA na infecção dos leucócitos esplênicos de cão por *Leishmania infantum*

AUTORA: LARISSA MARTINS MELO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Valéria M. F. de Lima

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Flávia Lombardi Lopes

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Gisele Fabrino Machado

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Sandra Helena P. Oliveira

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Silvana

Dra. SILVANA DE CÁSSIA PAULAN
Doutora em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Araçatuba, 20 de dezembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família e aos meus amigos, que me ajudaram nos momentos difíceis e que sabem importância desse trabalho na minha vida. Amo vocês!!!

A minha orientadora Valéria Marçal Félix de Lima que me propiciou essa oportunidade, compartilhando momentos de aprendizados, alegrias, festas, viagens e tristezas, me incentivando, me ouvindo nas horas das dúvidas, me fazendo ter empolgação pelo trabalho, mesmo após algum tropeço. Obrigada por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Imunologia, sempre companheiros e inteligentes. A técnica Flavia Mari Yamamoto pela ajuda com os experimentos.

A turma do Laboratório Clínico pela ajuda e companheirismo. Aos colegas do Laboratório de Ornitopatologia pelo companheirismo e ajuda em todas as horas.

A minha banca de qualificação, Prof^a Flávia Lopes e Prof^a Gisele Machado que me servem de exemplo profissional pela dedicação e comprometimento, obrigada pelas considerações dadas ao meu trabalho.

Agradeço a todos os professores que de alguma forma me ajudaram e me deram apoio nessa minha jornada. Obrigada!

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal e a Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba pela oportunidade, por toda a infraestrutura oferecida e por ser tão bem recebida por todos.

O apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processos nº 2015/16101-6, nº 2015/16972-7 que financiou a pesquisa que deu origem ao artigo científico.

E a CAPES por financiar a discente por um período.

Melo, L.M. et al. **O papel dos mirna na infecção de leucócitos esplênicos de cão por *Leishmania Infantum***. 2018, 72 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LV) no Brasil representa um grave problema de saúde pública. Na LV a supressão imune celular é determinante da progressão da doença. Estudos mostraram que a regulação da resposta imune depende de miRNAs. O objetivo deste estudo foi a caracterização dos miRNAs em leucócitos esplênicos (LE) de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Este estudo foi realizado em Araçatuba, região endêmica para LV canina (LVC). Um grupo de 4 cães saudáveis e 8 cães com LVC foi estudado. O RNA foi extraído do LE usando o Kit Mirvana (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado usando um fluorômetro (Qubit 3.0, Invitrogen™) o grau de pureza realizado por eletroforese capilar (Bioanalyser, Agilent™), as amostras foram então armazenadas a -80°C. O miRNA foi preparado para o microarranjo usando o FlashTag Biotina HSR RNA Labeling Kit (Affymetrix™). O microarranjo foi realizado usando o Affymetrix™ miRNA 4.1 Strip de acordo com as recomendações do fabricante. A produção de cDNA foi realizada usando o kit miScript RT II (Qiagen™). Os miRNAs diferencialmente expressos foram validados por qPCR utilizando iniciadores para miRNAs de cães inventariados (Qiagen™) de acordo com recomendação do fabricante. Os miRNAs validados foram analisados no programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen™). Após a análise das vias, os LE de cães infectados foram transfectados com miR21 usando miScript miRNA Mimics e Inhibitor (Qiagen™) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a transfecção, o factor de transcrição T-bet e GATA 3 e a carga parasitária foi avaliada por citometria de fluxo e a IL-12 foi quantificada por ELISA Kit (R & D Systems™). A análise do microarray foi realizada no Expression Console, no Transcriptome Analysis Console (Affymetrix™) por ANOVA, qPCR foi analisada pelo teste de Mann-Whitney, a via canônica de miRNA diferentemente expressa em IPA com o teste de Fisher, o fator de transcrição, carga parasitária e expressão de IL-12 foi analisada pelo teste de Friedman, foi utilizado o nível de significância de $p < 0,05$. Verificou-se que 7 miRNAs tiveram

expressão alterada em cães infectados em comparação com cães saudáveis: miR-148a, miR-21, miR-7, miR-615 foram “upregulated” e miR-150, miR-125a e miR-125b foram “downregulated”. O miR148a, miR615 e miR21 validaram os resultados do microarranjo. O IPA mostrou 114 vias reguladas por esses miRNAs, incluindo vias que regulam a imunidade. Após a transfecção inibimos o miRNA 21 e observamos um aumento de IL-12, da razão Th1 e Th2 e uma diminuição da carga parasitária. Concluimos, que o miR 21 interfere na resposta imunológica de cães infectados por *L. infantum*, inibindo a resposta do tipo celular. Essas informações podem ajudar na identificação de alvos terapêuticos na LVC.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) infantum*, miRNA, transfecção.

Melo, L.M. et al. **The role of mirna in the infection of dog spleen leukocytes by *Leishmania Infantum***. 2018, 72 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2018.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (VL) in Brazil represents a serious public health problem. In VL cellular immune suppression is determinant of disease progression. Studies have shown that the regulation of the immune response depends on miRNAs. The objective of this study was the characterization of the miRNAs in spleen leukocytes (SL) from dogs naturally infected by *L. infantum*. This study was carried out in Araçatuba, an endemic region for canine LV (LVC). A group of 4 healthy dogs and 8 dogs with VL was studied. Total RNA was extracted from SL using Mirvana Kit (Invitrogen®) according to manufacturer's recommendations Total RNA was quantified using a fluorometer (Qubit 3.0, Invitrogen®) the degree of purity performed by capillary electrophoresis (Bioanalyser, Agilent®), the samples were then stored at -80°C. Total RNA was prepared for the microarray using the FlashTag Biotin HSR RNA Labeling Kit (Affymetrix®). The microarray was performed using the Affymetrix™ miRNA 4.1 Strip according to manufacturer's recommendations. cDNA production was performed using the miScript RTII kit (Qiagen®). Differentially expressed miRNAs were validated by qPCR was performed using the inventoried dog miRNAs (Qiagen®) and SYBR Green (kit miScript SYBR Green PCR, Qiagen®), according to the manufacturer's recommendation. The validated miRNAs were analyzed in the program Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen®). After analysis of the pathways, then the LS from infected dogs were transfected with miR21 using miScript miRNA Mimics and Inhibitor (Qiagen®) according to manufacturer's recommendations. After the transfection LE the transcription factor T-bet and GATA 3, parasite load were measured by flow cytometry and IL-12 was quantified by ELISA Kit (R&D Systems®). The analyses of microarray was performed on Expression Console, Transcriptome Analysis Console (Affymetrix®); ANOVA, qPCR validation data was analyzed by Mann-Whitney test, the canonical pathway of miRNA differentially expressed in IPA with the Fisher test, the transcription factor, parasite load and expression of IL-12 was analysed by Friedman test, with the level of significance of $p < 0.05$. It was found that 7 miRNAs had altered

expression in infected dogs compared to healthy dogs: miR148a, miR21, miR7, miR615 were upregulated and miR150, miR125a and miR125b were downregulated. MiR148a, miR615 and miR21 validated the results of the microarray. The IPA showed 114 pathways regulated by these miRNAs, including pathways which regulate immunity. After transfection, the miR21 inhibitors increased T-bet and IL12 and decreased parasitic load. We conclude that miR 21 interferes in the immune response of dogs infected with *L. infantum*, inhibiting the cell type response. This information can assist in the identification of therapeutic targets in LVC.

Keywords: *Leishmania (L.) infantum*, miRNA, transfection.

APÊNDICE- REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.
- ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Leishmaniosis—A report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. **Microscopy Research and Technique**, v. 69, n. 4, p. 227–235, abr. 2006.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–30, 1 jul. 2008.
- BELOSEVIC, M. et al. IL-2. A cofactor for induction of activated macrophage resistance to infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 145, n. 3, p. 831–9, 1 ago. 1990.
- BHATTACHARYA, P. et al. Identification of microRNA-21 as a biomarker in live attenuated *Leishmania* vaccine induced protective immunity. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 1 Supplement, 2017.
- BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 56, n. 3–4, p. 345–51, maio 1997.
- CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite immunology**, v. 14, n. 5, p. 531–9, set. 1992.
- CARISSIMI, C. et al. miR-21 is a negative modulator of T-cell activation. **Biochimie**, v. 107, p. 319–326, 1 dez. 2014.
- CAVALCANTI, A. S. et al. Parasite Load Induces Progressive Spleen Architecture Breakage and Impairs Cytokine mRNA Expression in *Leishmania infantum*-Naturally Infected Dogs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0123009, 13 abr. 2015.
- CILLARI, E. et al. Reduction in the number of UCHL-1+ cells and IL-2 production in the peripheral blood of patients with visceral leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146, n. 3, p. 1026–30, 1 fev. 1991.
- COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae)

- in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1–2, p. 149–155, 10 mar. 2005.
- COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary parasitology**, v. 147, n. 3–4, p. 320–5, 20 jul. 2007.
- DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 537–541, jun. 2006.
- DE LIMA, V. M. F. et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 147–53, 23 mar. 2012.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, set. 2004.
- DIAZ, S. et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Veterinary parasitology**, v. 189, n. 2–4, p. 137–44, 26 out. 2012.
- DIOTALLEVI, A. et al. Leishmania Infection Induces MicroRNA hsa-miR-346 in Human Cell Line-Derived Macrophages. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1019, 17 maio 2018.
- DOS-SANTOS, W. L. C. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 123, n. 3–4, p. 251–9, 15 jun. 2008.
- EL GAZZAR, M. et al. MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- α during TLR4-induced gene reprogramming. **Journal of leukocyte biology**, v. 90, n. 3, p. 509–19, set. 2011.
- FEIJÓ, D. et al. Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1–9, 19 jan. 2016.
- FERREIRA, M. G. P. A. et al. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 150–154, 28 out. 2009.
- FISA, R. et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) The example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, v. 83, p. 87–97, 1999.
- FIUZA, J. A. et al. Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin

deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. **Vaccine**, v. 33, n. 2, p. 280–8, 3 jan. 2015.

GENARO, O. Leishmaniose visceral canina experimental. 1993.

GERACI, N. S.; TAN, J. C.; MCDOWELL, M. A. Characterization of microRNA expression profiles in *Leishmania*-infected human phagocytes. **Parasite immunology**, v. 37, n. 1, p. 43–51, jan. 2015.

GHOSH, J. et al. *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. **Cell host & microbe**, v. 13, n. 3, p. 277–88, 13 mar. 2013.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, set. 2004.

GRAFF, J. W. et al. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 26, p. 21816–25, 22 jun. 2012.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. THE B7 FAMILY REVISITED. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 515–548, abr. 2005.

HUSEIN, A. et al. *Leishmania donovani* infection differentially regulates small G-proteins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 119, n. 9, p. 7844–7854, set. 2018.

JIANG, A. et al. miR-615-3p promotes the phagocytic capacity of splenic macrophages by targeting ligand-dependent nuclear receptor corepressor in cirrhosis-related portal hypertension. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 236, n. 6, p. 672–80, 1 jun. 2011.

LIU, G.; ABRAHAM, E. MicroRNAs in Immune Response and Macrophage Polarization. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 2, p. 170–177, fev. 2013.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 566–7, 1988.

MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. **The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals.**, 1983.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the

- experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.
- MUKHERJEE, B. et al. Antimony-Resistant *Leishmania donovani* Exploits miR-466i To Deactivate Host MyD88 for Regulating IL-10/IL-12 Levels during Early Hours of Infection. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 6, p. 2731–2742, 15 set. 2015.
- NOLI, C.; BOOTHE, D. Macrolides and lincosamides. **Veterinary Dermatology**, v. 10, n. 3, p. 217–223, 1 set. 1999.
- OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076–83, 15 out. 2001.
- PANDEY, R. K.; SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Differential expression of miRNA regulates T cell differentiation and plasticity during visceral leishmaniasis infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. FEB, p. 1–9, 2016.
- PENTCHEVA-HOANG, T. et al. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 45, p. 17765–17770, 6 nov. 2007.
- PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–35, jan. 1994.
- PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European journal of immunology**, v. 25, n. 6, p. 1594–600, jun. 1995.
- PINELLI, E. et al. Compensation for Decreased Expression of B7 Molecules on *Leishmania infantum*-Infected Canine Macrophages Results in Restoration of Parasite-Specific T-Cell Proliferation and Gamma Interferon Production. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 67, n. 1, p. 237–243, 1999.
- QUEIROZ, P. V. S. et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 267–273, abr. 2009.
- REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 15 mar. 2009.
- SADICK, M. D. et al. Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infection and immunity**, v. 59, n. 12, p. 4710–4, dez. 1991.
- SANTA ROSA I.C.A.; OLIVEIRA I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre

- uma zoonose reemergente. **Clinica Veterinária**, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.
- SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–24, out. 2008.
- SANTIAGO, M. E. B. et al. Improvement in clinical signs and cellular immunity of dogs with visceral leishmaniasis using the immunomodulator P-MAPA. **Acta Tropica**, v. 127, n. 3, p. 174–180, set. 2013.
- SEMIÃO-SANTOS, S. J. et al. Evora district as a new focus for canine leishmaniasis in Portugal. **Parasitology research**, v. 81, n. 3, p. 235–9, 1995.
- SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 450-458, 1990.
- STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 38, n. 4, p. 547–564, 30 jul. 2007.
- TIWARI, N. et al. Identification and Characterization of miRNAs in Response to *Leishmania donovani* Infection: Delineation of Their Roles in Macrophage Dysfunction. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 314, 2017.
- UCHINO, K.; OCHIYA, T.; TAKESHITA, F. RNAi Therapeutics and Applications of MicroRNAs in Cancer Treatment. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 43, n. 6, p. 596–607, jun. 2013.
- VERMA, J. K.; RASTOGI, R.; MUKHOPADHYAY, A. *Leishmania donovani* resides in modified early endosomes by upregulating Rab5a expression via the downregulation of miR-494. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 6, p. e1006459, 26 jun. 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 29 out. 2018.