

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 19/06/2025.

NATÁLIA FRANCISCO SCARAMELE

**Modulação gênica de neutrófilos humanos após infecção
in vitro com *Leishmania infantum***

Araçatuba – SP

2023

NATÁLIA FRANCISCO SCARAMELE

**Modulação gênica de neutrófilos humanos após infecção
in vitro com *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 obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal)

Orientadora: Pesquisadora Flávia Lombardi Lopes

Araçatuba – SP

2023

S285m	<p>Scaramele, Natalia Francisco</p> <p>Modulação gênica de neutrófilos humanos após infecção in vitro com <i>Leishmania infantum</i> / Natalia Francisco Scaramele. -- Araçatuba, 2023</p> <p>142 f.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba</p> <p>Orientadora: Flavia Lombardi Lopes</p> <p>1. Leishmaniose. 2. RNA Mensageiro. 3. MicroRNAs. 4. RNA Longo não Codificante. 5. Neutrófilos. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA


Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

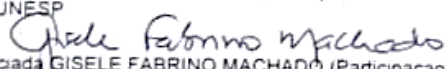
Título Modulação gênica de neutrófilos humanos após infecção in vitro com *Leishmania infantum*

AUTORA: NATÁLIA FRANCISCO SCARAMELE
ORIENTADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES

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


Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Presencial)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Profa. Associada VALERIA MÁRÇAL FELIX DE LIMA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP


Profa. Titular SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP

Pesquisadora SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia / Instituto de Ciências Biomédicas/USP

Araçatuba, 19 de junho de 2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Modulação gênica de neutrófilos humanos após infecção in vitro com *Leishmania infantum*

AUTORA: NATÁLIA FRANCISCO SCARAMELE

ORIENTADORA: FLÁVIA LOMBARDI LOPES

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

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Presencial)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Profa. Associada VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Profa. Titular SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba/UNESP

Pesquisadora SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)
Departamento de Fisiologia / Instituto de Ciências Biomédicas/USP



Araçatuba, 19 de junho de 2023.

Aos meus pais, Osvaldo Scaramele
e Lázara Francisco Scaramele.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais (*in memoriam*), que sempre incentivaram meus estudos e muito se esforçaram para que eu chegasse até aqui.

Ao amor da minha vida, Guilherme Bruno da Silva, por toda serenidade, e por sua paciência em me manter firme durante nossos anos juntos.

As amigas que a faculdade e a ciência me deram: Amanda, Beatriz, Daniela, Jéssica, Juliana, Maria Fernanda, Maria Sara, Mariana. Obrigada pelas discussões científicas, por toda a ajuda laboratorial, e pela amizade que espero perdurar para além da universidade.

A todos os colegas que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, em especial ao pessoal do laboratório de Imunologia da FMVA, por toda paciência e ajuda, sem as quais este trabalho não seria realizado.

A minha orientadora, Flávia Lombardi Lopes, que me aguentou por mais quatro anos de doutorado no melhor laboratório, apelidado recentemente de EpiHome, pela confiança e companheirismo construídos ao longo destes anos, e por todo conhecimento que me proporcionou experimentar junto ao mundo científico.

À UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da FMVA (Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba) pela oportunidade de realização do doutorado.

A todos os funcionários e colaboradores, sempre solícitos e dispostos.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SCARAMELE, N. F. **Modulação gênica de neutrófilos humanos após infecção *in vitro* com *Leishmania infantum***. 2023. 139 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A leishmaniose é uma zoonose tropical negligenciada com altas taxas de morbidade e mortalidade. É causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida durante o repasto sanguíneo das fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*. Uma das manifestações clínicas da doença é a leishmaniose visceral, causada principalmente pela espécie *L. infantum* (syn. *chagasi*) nas Américas. Os sintomas da leishmaniose visceral incluem febre, anorexia, perda de peso, distensão abdominal, fraqueza e um aumento abdominal significativo, decorrente de hepato e esplenomegalia. Apesar da disponibilidade de medicamentos para tratar a doença, nenhuma vacina está comercialmente disponível para humanos. O papel dos neutrófilos como parte da resposta imune inata à *Leishmania* spp. infecção é dubio e varia de acordo com a espécie causadora da infecção. Ainda, a expressão global de RNAs codificantes, microRNAs e RNAs longos não codificantes muda como parte da resposta imune contra patógenos. No presente trabalho buscamos entender os padrões de expressão gênica de transcritos (codificantes e não codificantes) em neutrófilos humanos infectados *in vitro* com *L. infantum*. Isolamos neutrófilos de sangue total de doadores saudáveis do sexo masculino (n=5) e dividimos em grupos: 1) infectados com *L. infantum* (MOI = 5:1) e 2) controles não infectados. No grupo infectado as promastigotas não internalizadas foram removidas após 3 horas e, ao tempo de 20 horas pós-infecção o RNA total foi extraído das células dos grupos controle e infectado. Posteriormente foram realizadas duas técnicas: 1) sequenciamento de RNA total, e 2) microarranjo de microRNA. Observamos mudanças na expressão de 212 transcritos ($\log_2(FC) \pm 0,58$, $FDR \leq 0,05$), sendo classificados: 202 RNAs mensageiros, seis RNAs longos não-codificantes, um RNA “miscellaneous”, um RNA nuclear pequeno, um pseudogene não processado e um pseudogene processado. E na expressão de 289 microRNAs ($FC \pm 2$, $FDR \leq 0,01$). Com o auxílio de ferramentas bioinformáticas, pudemos ainda predizer funções biológicas aos nossos achados, e com isso inferimos que as mudanças observadas tanto na expressão de RNAs codificadores como dos não codificadores de neutrófilos estão associadas ao prejuízo na fagocitose, produção de óxido nítrico e de citocinas pró-inflamatórias após a infecção com *L. infantum*, favorecendo a persistência do parasito. Nosso trabalho lança luz sobre vários mecanismos utilizados pela *L. infantum* para controlar a resposta imune mediada por neutrófilos e identifica vários alvos para futuros estudos funcionais, visando o desenvolvimento de tratamentos preventivos ou curativos para esta prevalente zoonose.

Palavras-chave: Leishmaniose. RNA Mensageiro. MicroRNAs. RNA Longo não Codificante. Neutrófilos. Imunidade Inata.

SCARAMELE, N. F. **Gene modulation of human neutrophils after *in vitro* infection with *Leishmania infantum***. 2023. 139 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical zoonosis with high morbidity and mortality rates. It is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted during the blood meal of female *Lutzomyia longipalpis*. One of the clinical manifestations of the disease is visceral leishmaniasis, caused mainly by the species *L. infantum* (syn. *chagasi*) in the Americas. Symptoms of visceral leishmaniasis include fever, anorexia, weight loss, abdominal distention, weakness, and significant abdominal enlargement due to hepatomegaly and splenomegaly. Despite the availability of drugs to treat the disease, no vaccine is commercially available for humans. The role of neutrophils as part of the innate immune response to *Leishmania* spp. infection is dubious and varies according to the species causing the infection. Furthermore, the global expression of coding RNAs, microRNAs and long non-coding RNAs changes as part of the immune response against pathogens. In the present work, we aimed to understand the gene expression patterns of coding and non-coding transcripts of human neutrophils infected *in vitro* with *L. infantum*. We isolated neutrophils from whole blood of healthy male donors (n=5) and divided them into groups: 1) infected with *L. infantum* (MOI = 5:1) and 2) uninfected controls. In the infected group, the non-internalized promastigotes were removed after 3 hours and at the time of 20 hours post-infection, total RNA was extracted from control and infected neutrophils. Subsequently, two techniques were performed: 1) total RNA sequencing, and 2) microRNA microarray. We observed changes in the expression of 212 transcripts ($\log_2(\text{FC}) \pm 0.58$, $\text{FDR} \leq 0.05$), being classified as: 202 messenger RNAs, six long non-coding RNAs, one miscellaneous RNA, one small nuclear RNA, one unprocessed pseudogene and one processed pseudogene. We also observed changes in the expression of 289 microRNAs ($\text{FC} \pm 2$, $\text{FDR} \leq 0.01$). With the aid of bioinformatics tools, we were also able to predict biological functions to our findings, inferring that the changes observed in the expression of both coding and non-coding RNAs are associated with impaired phagocytosis, production of nitric oxide and pro-inflammatory cytokines expression after neutrophils infection with *L. infantum*, favoring the persistence of the parasite. Our work sheds light on several mechanisms used by *L. infantum* to control the neutrophil-mediated immune response and identifies several targets for future functional studies, aiming at the development of preventive or curative treatments for this prevalent zoonosis.

Keywords: Leishmaniasis. RNA, Messenger. MicroRNAs. RNA, Long Noncoding. Neutrophils. Immunity, Innate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	9
1.2 Objetivos	15
1.2.1 Objetivo Geral	15
1.2.2 Objetivos Específicos	15
2 CAPÍTULO 1 - <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> INFECTION MODULATES MESSENGER RNA, MICRORNA AND LONG NON-CODING RNA EXPRESSION IN HUMAN NEUTROPHILS <i>IN VITRO</i>	16
2.1 Resumo	17
2.2 Abstract	18
2.3 Author Summary	19
2.4 Introduction.....	20
2.5 Results	21
2.5.1 Transcriptome expression profile is modulated during <i>in vitro</i> infection of human neutrophils by <i>L. infantum</i>	21
2.5.2 Microtranscriptome expression profile is modulated during <i>in vitro</i> infection of human neutrophils by <i>L. infantum</i>	25
2.5.3 Changes in microtranscriptome expression profile following <i>L. infantum</i> infection of neutrophils affects immunological pathways	27
2.5.4 Long non-coding RNAs expressed in neutrophils, following <i>in vitro</i> infection with <i>L. infantum</i> , have <i>cis</i> and <i>trans</i> action	30
2.5.5 Network analysis of DE mRNAs, DE lncRNAs and enriched pathways.....	32
2.5.6 Leishmaniasis pathway is regulated by mRNAs, miRNAs and lncRNAs	34
2.6 Discussion	37
2.7 Materials and Methods	40
2.7.1 Maintenance of parasites	40
2.7.2 Neutrophil purification.....	41
2.7.3 <i>In vitro</i> infection	41

2.7.4 Total RNA extraction and quantification	42
2.7.5 RNA Sequencing (RNA-Seq) and functional enrichment analysis of differentially expressed transcripts	42
2.7.6 Microtranscriptome array, target prediction and functional enrichment analysis	43
2.7.7. Long non-coding RNA classification, mRNA/lncRNA co-expression and network interaction.....	43
2.8 References	44
2.9 Supporting information	52
APÊNDICE A – Referências da Introdução Geral	124
ANEXO A – Normas da Revista PLOS Neglected Tropical Diseases	130
ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	136

APÊNDICE A – Referências da Introdução Geral

- 1 PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, London, v. 69, p. S10-S18, nov. 2014. Supl. 1. DOI: 10.1016/j.jinf.2014.07.016.
- 2 ABDELLAHI, L.; IRAJI, F.; MAHMOUDABADI, A.; HEJAZI, S. H. Vaccination in leishmaniasis: a review article. **Iranian Biomedical Journal**, Tehran, v. 26, n. 1, p. 1-35, 2022. DOI: 10.52547/ibj.26.1.35.
- 3 MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians**, Oxford, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014. DOI: 10.1093/qjmed/hct116.
- 4 SERAFIM, T. D.; COUTINHO-ABREU, I. V.; DEY, R.; KISSINGER, R.; VALENZUELA, J. G.; OLIVEIRA, F.; KAMHAWI, S. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 11, p. 976-987, 2021. DOI: 10.1016/j.pt.2021.07.003.
- 5 ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 281-289, 2018. DOI: 10.1590/1806-9282.64.03.281.
- 6 WORD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Genebra, 2023. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 5 jun. 2023.
- 7 VOLPEDO, G.; PACHECO-FERNANDEZ, T.; HOLCOMB, E. A.; CIPRIANO, N.; COX, B.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of immunopathogenesis in cutaneous leishmaniasis and Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 11, artigo 685296, 16 p., 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.685296.
- 8 OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and economic burden of human leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 94, n. 3, p. 489-493, 2016. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0408.
- 9 MANN, S.; FRASCA, K.; SCHERRER, S.; HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; NEWMAN, S.; RAMANAN, P.; SUAREZ, J. A. A review of leishmaniasis: current knowledge and future directions. **Current Tropical Medicine Reports**, Cham, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021. DOI: 10.1007/s40475-021-00232-7.
- 10 SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Visceral leishmaniasis. In: PONTE-SUCRE, A.; DIAZ, E.; PADRON-NIEVES, M. (Eds.). **Drug resistance in leishmania parasites: consequences, molecular mechanisms and possible treatments**. Cham: Springer, 2012. p. 159-176.
- 11 PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniases**: epidemiological report on the region of the Americas. Washington, DC: PAHO, 2022. 12 p. (Informe epidemiológico das Américas, v. 11).

- 12 ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na região das Américas**. Washington, DC: OPAS, 2022. DOI: 10.37774/9789275725030.
- 13 TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 12, n. 1, artigo e0006082, 2018. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006082.
- 14 WYLIE, C. E.; CARBONELL-ANTOÑANZAS, M.; AIASSA, E.; DHOLLANDER, S.; ZAGMUTT, F. J.; BRODBELT, D. C.; SOLANO-GALLEGO, L. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally occurring canine leishmaniosis. Part II: topically applied insecticide treatments and prophylactic medications. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p.19-27, 2014. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.06.016.
- 15 JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 422, 12 p., 2015. DOI: 10.1016/j.jim.2015.03.017.
- 16 DANTAS-TORRES, F.; NOGUEIRA, F. S.; MENZ, I.; TABANEZ, P.; SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PETERSEN, C.; BANETH, G.; OLIVA, G.; SOLANO-GALLENO, L.; FERRER, L.; PENNISI, M. G.; BOURDEAU, P.; MAIA, C.; OTRANTO, D.; GRADONI, L.; COURTENAY, O.; COSTA, C. H. N. Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 50, n. 3, p. 171-176, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpara.2020.01.001.
- 17 MORENO, J. Assessment of vaccine-induced immunity against canine visceral leishmaniasis. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 6, n. 1, artigo 168, 10 p., 2019. DOI: 10.3389/fvets.2019.00168.
- 18 PARKASH, V.; KAYE, P. M.; LAYTON, A. M.; LACEY, C. J. Vaccines against leishmaniasis: using controlled human infection models to accelerate development. **Expert Review of Vaccines**, London, v. 20, n. 11, p. 1407-1418, 2021. DOI: 10.1080/14760584.2021.1991795.
- 19 LAGE, D. P.; MACHADO, A. S.; FREITAS, C. S.; VALE, D. L.; LINHARES, F. P.; CARDOSO, J. M. O.; OLIVEIRA-DA-SILVA, J. A.; RAMOS, F. F.; PEREIRA, I. A. G.; LUDOLF, F.; TAVARES, G. S. V.; BANDEIRA, R. S.; OLIVEIRA, J. S.; MENEZES-SOUZA, D.; DUARTE, M. C.; GALDINO, A. S.; CHRISTODOULIDES, M.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; ROATT, B. M.; MARTINS, V. T.; COELHO, E. A. F. Recombinant endonuclease III protein from *Leishmania infantum* associated with Th1-type adjuvants is immunogenic and induces protection against visceral leishmaniasis. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 155, p. 79-90, 2023. DOI: 10.1016/j.molimm.2023.01.011.
- 20 LARI, A.; LARI, N.; BIABANGARD, A. Immunoinformatics approach to design a novel subunit vaccine against visceral leishmaniasis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, New York, v. 28, n. 1, artigo 34, 14 p., 2022. DOI: 10.1007/s10989-021-10344-3.

21 KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical and Translational Immunology**, London, v. 3, n. 3, artigo e13, 6 p., 2014. DOI: 10.1038/cti.2014.4.

22 BRASIL. Ministério da Saúde. **Vacinação e a leishmaniose visceral**. Brasília, DF: MS, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/vacinacao-e-a-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 21 maio 2023.

23 VOLPEDO, G.; PACHECO-FERNANDEZ, T.; BHATTACHARYA, P.; OLJUSKIN, T.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; SATOSKAR, A. R.; NAKHASI, H. L. Determinants of innate immunity in visceral leishmaniasis and their implication in vaccine development. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, artigo 748325, 18 p., 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.748325.

24 ROSALES, C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 108, n. 1, p. 377-396, 2020. DOI: 10.1002/JLB.4MIR0220-574RR.

25 CARLSEN, E. D.; LIANG, Y.; SHELITE, T. R.; WALKER, D. H.; MELBY, P. C.; SOONG, L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 182, n. 2, p. 109-118, 2015. DOI: 10.1111/cei.12674.

26 KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013. DOI: 10.1038/nri3399.

27 RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 2, artigo 59, 8 p., 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00059.

28 RIBEIRO-GOMES, F. L.; PETERS, N. C.; DEBRABANT, A.; SACKS, D. L. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-*Leishmania* response. **PLoS Pathogens**, Lausanne, v. 8, n. 2, artigo e1002536, 12 p., 2012. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002536.

29 TEIXEIRA, C. R.; TEIXEIRA, M. J.; GOMES, R. B. B.; SANTOS, C. S.; ANDRADE, B. B.; RAFFAELE-NETTO, I.; ILVA, J. S.; GUGLIELMOTTI, A.; MIRANDA, J. C.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; BARRAL-NETTO, M. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 175, n. 12, p. 8346-8353, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.175.12.8346.

30 MOURA, T. R.; OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, G. C.; CARNEIRO, M. W.; FUKUTANI, K. F.; NOVAIS, F. O.; MIRANDA, J. C.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C.; BARRAL, A.; OLIVEIRA, C. I. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 6, artigo e712, 9 p., 2010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000712.

- 31 ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, Oxford, v. 265, n. 1, p. 156-171, 2015. DOI: 10.1111/imr.12291.
- 32 MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual Review Pathology**, Palo Alto, v. 9, p. 181-218, 2014. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.
- 33 VALÉRIO-BOLAS, A.; PEREIRA, M.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SANTOS-MATEUS, D.; RODRIGUES, A.; RAFAEL-FERNANDES, M.; GABRIEL, A.; PASSERO, F.; SANTOS-GOMES, G. Intracellular and extracellular effector activity of mouse neutrophils in response to cutaneous and visceral *Leishmania* parasites. **Cellular Immunology**, New York, v. 335, p. 76-84, 2019. DOI: 10.1016/j.cellimm.2018.11.003.
- 34 BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, New York, v. 303, n. 5663, p. 1532-1535, 2004. DOI: 10.1126/science.1092385.
- 35 OKWOR, I.; MOU, Z.; LIU, D.; UZONNA, J. Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, artigo 128, 13 p., 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00128.
- 36 JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 422, 12 p., 2015. DOI: 10.1016/j.jim.2015.03.017.
- 37 VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004. DOI: 10.4049/jimmunol.173.11.6521.
- 38 LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, Amsterdam, v. 213, n. 3-4, p. 183-191, 2008. DOI: 10.1016/j.imbio.2007.11.010.
- 39 RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 25, n. 11, p. 505-510, 2009. DOI: 10.1016/j.pt.2009.08.003.
- 40 HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* species drive distinct neutrophil functions. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 392-401, 2016. DOI: 10.1016/j.pt.2016.02.003.
- 41 BUSSLINGER, M.; TARAKHOVSKY, A. Epigenetic control of immunity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 6, n. 6, artigo a019307, 26 p., 2014. DOI: 10.1101/cshperspect.a019307.

42 BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.

43 LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K.-H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V. N. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **EMBO Journal**, Oxford, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600385.

44 DEXHEIMER, P. J.; COCHELLA, L. MicroRNAs: from mechanism to organism. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 8, artigo 409, 18 p., 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.00409.

45 ZENG, Y.; YI, R.; CULLEN, B. R. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. **EMBO Journal**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 138-148, 2005. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600491.

46 O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 9, artigo 402, 12 p., 2018. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.

47 PETERSON, S. M.; THOMPSON, J. A.; UFKIN, M. L.; SATHYANARAYANA, P.; LIAW, L.; CONGDON, C. B. Common features of microRNA target prediction tools. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 5, artigo 23, 10 p., 2014. DOI: 10.3389/fgene.2014.00023.

48 ACUÑA, S. M.; FLOETER-WINTER, L. M.; MUXEL, S. M. MicroRNAs: biological regulators in pathogen-host interactions. **Cells**, Basel, v. 9, n. 1, artigo 113, 25 p., 2020. DOI: 10.3390/cells9010113.

49 FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.-H.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 19, n. 1, p. 92-105, 2009. DOI: 10.1101/gr.082701.108.

50 FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 9, n. 2, p. 102-114, 2008. DOI: 10.1038/nrg2290.

51 FERNANDES, J. C. R.; ACUÑA, S. M.; AOKI, J. I.; FLOETER-WINTER, L. M.; MUXEL, S. M. Long non-coding RNAs in the regulation of gene expression: physiology and disease. **Non-coding RNA**, Basel, v. 5, n. 1, artigo 17, 25 p., 2019. DOI: 10.3390/ncrna5010017.

52 NOJIMA, T.; PROUDFOOT, N. J. Mechanisms of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 23, n. 6, p. 389-406, 2022. DOI: 10.1038/s41580-021-00447-6.

53 GUTTMAN, M.; AMIT, I.; GARBER, M.; FRENCH, C.; LIN, M. F.; FELDSER, D.; HUARTE, M.; ZUK, O.; CAREY, B. W.; CASSADY, J. P.; CABILI, M. N.; JAENISCH, R.; MIKKELSEN, T. S.; JACKS, T.; HACOEN, N.; BERNSTEIN, B. E.; KELLIS, M.; REGEV, A.; RINN, J. L.; LANDER, E. S. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. **Nature**, London, v. 458, n. 7235, p. 223-227, 2009. DOI: 10.1038/nature07672.

- 54 ZHENG, G. X. Y.; DO, B. T.; WEBSTER, D. E.; KHAVARI, P. A.; CHANG, H. Y. Dicer-microRNA-Myc circuit promotes transcription of hundreds of long noncoding RNAs. **Nature Structural and Molecular Biology**, New York, v. 21, n. 7, p. 585-590, 2014. DOI: 10.1038/nsmb.2842.
- 55 QUINN, J. J.; CHANG, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 17, n. 1, p. 47-62, 2016. DOI: 10.1038/nrg.2015.10.
- 56 KORNIENKO, A. E.; GUENZL, P. M.; BARLOW, D. P.; PAULER, F. M. Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. **BMC Biology**, London, v. 11, artigo 59, 2013. DOI: 10.1186/1741-7007-11-59.
- 57 GEISLER, S.; COLLIER, J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 14, n. 11, p. 699-712, 2013. DOI: 10.1038/nrm3679.
- 58 QUAN, M.; CHEN, J.; ZHANG, D. Exploring the secrets of long noncoding RNAs. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, n. 3, p. 5467-5496, 2015. DOI: 10.3390/ijms16035467.
- 59 ARD, R.; TONG, P.; ALLSHIRE, R. C. Long non-coding RNA-mediated transcriptional interference of a permease gene confers drug tolerance in fission yeast. **Nature Communications**, London, v. 5, n. 1, artigo 5576, 9 p., 2014. DOI: 10.1038/ncomms6576.
- 60 SCHOENBERG, D. R.; MAQUAT, L. E. Regulation of cytoplasmic mRNA decay. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 13, n. 4, p. 246-259, 2012. DOI: 10.1038/nrg3160.
- 61 SEBASTIAN-DELACRUZ, M.; GONZALEZ-MORO, I.; OLAZAGOITIA-GARMENDIA, A.; CASTELLANOS-RUBIO, A.; SANTIN, I. The role of lncRNAs in gene expression regulation through mRNA stabilization. **Non-coding RNA**, Basel, v. 7, n. 1, artigo 3, 13 p., 2021. DOI: 10.3390/ncrna7010003.
- 62 MARUYAMA, S. R.; FUZO, C. A.; OLIVEIRA, A. E. R.; ROGERIO, L. A.; TAKAMIYA, N. T.; PESSENDA, G.; MELO, E. V.; SILVA, A. M.; JESUS, A. R.; CARREGARO, V.; NAKAYA, H. I.; ALMEIDA, R. P.; SILVA, J. S. Insight into the long noncoding RNA and mRNA coexpression profile in the human blood transcriptome upon *Leishmania infantum* infection. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 13, artigo 784463, 18 p., 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.784463.
- 63 FERNANDES, J. C. R.; GONÇALVES, A. N. A.; FLOETER-WINTER, L. M.; NAKAYA, H. I.; MUXEL, S. M. Comparative transcriptomic analysis of long noncoding RNAs in *Leishmania*-infected human macrophages. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 13, artigo 1051568, 17 p., 2023. DOI: 10.3389/fgene.2022.1051568.