

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 18/01/2025.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA**

JÉSSICA HENRIQUE DE FREITAS

**MicroRNA-21 e microRNA-148a regulam PTEN, NO e ROS
na leishmaniose canina**

Araçatuba

2023

JÉSSICA HENRIQUE DE FREITAS

**MicroRNA-21 e microRNA-148a regulam PTEN, NO e ROS
na leishmaniose canina**

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
Doutor em Ciência Animal

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal
Felix de Lima

Araçatuba

2023

F866m

Freitas, Jéssica Henrique de

MicroRNA-21 e microRNA-148a regulam PTEN, NO e ROS na
leishmaniose canina / Jéssica Henrique de Freitas. -- Araçatuba, 2023
97 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima

1. microRNA. 2. PTEN. 3. NO. 4. ROS. 5. Nitrito. I. Título.

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: **microRNA-21 e microRNA-148a regulam PTEN, NO e ROS na leishmaniose canina**

AUTORA: JÉSSICA HENRIQUE DE FREITAS

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara

Dr. LEANDRO ENCARNÇÃO GARCIA (Participação Virtual)
Doutor em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Araçatuba, 18 de janeiro de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: **microRNA-21 e microRNA-148a regulam PTEN, NO e ROS na leishmaniose canina**

AUTORA: JÉSSICA HENRIQUE DE FREITAS

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara

Dr. LEANDRO ENCARNAÇÃO GARCIA (Participação Virtual)
Doutor em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Araçatuba, 18 de janeiro de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: **microRNA-21 e microRNA-148a regulam PTEN, NO e ROS na leishmaniose canina**

AUTORA: JÉSSICA HENRIQUE DE FREITAS

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara

Dr. LEANDRO ENCARNAÇÃO GARCIA (Participação Virtual)
Doutor em Ciência Animal pela Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Araçatuba, 18 de janeiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Eu agradeço a Deus por tudo e por mais essa conquista que é a conclusão desse trabalho e realização de um sonho, além de estar presente em todos os momentos.

Aos meus pais Ismail e Maria, e meu irmão Tiago, pelo apoio e incentivo para durante todo esse período da pós-graduação e por compreenderem os meus objetivos.

Ao meu querido namorado Nilton, que sempre foi muito compreensivo comigo e apoiou minhas decisões, além de ser muito companheiro.

À professora Valéria, que contribuiu muito no meu aprendizado e me deu essa grande oportunidade de realizar esse sonho, além de ser muito paciente. Muito obrigada por toda dedicação e serei sempre muito grata por tudo que fez por mim.

Aos professores titulares e suplentes que aceitaram o convite de participação. E agradeço pela colaboração e disposição de todos.

À todos os meus amigos do laboratório que contribuíram muito na minha pesquisa e no meu aprendizado, meus grandes amigos Gabi Rebech, Jaqueline Bragato, Sidnei, Matheus, Mari, Flavinha, Gabi Venturin, Mariana e a todos os estagiários e ICs.

Aos meus outros grandes amigos que a vida presenteou-me, Carol e Daniele que sempre foram muito companheiras, além de estarem presentes e me apoiarem durante essa minha caminhada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E também gostaria de agradecer pelo apoio da Fapesp na pesquisa.

***“Entregue seu caminho ao Senhor;
confie nele, e ele agirá”***

Salmos 37:5

FREITAS, J. H. **MicroRNA-21 e microRNA-148a regulam PTEN, NO e ROS na leishmaniose canina.** 2023. 97 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (CanL) representa uma grave ameaça à saúde pública em vários países. A progressão da doença depende do grau de supressão da resposta imune. Os microRNAs (miRs) modulam a tradução do mRNA em proteínas e regulam várias funções celulares e vias associadas às respostas imunes. MiR-21 e miR-148a podem alterar a carga parasitária e os macrófagos M1 são as principais células na atividade leishmanicida de cães. Um estudo anterior encontrou aumento de miR-21 e miR-148a em leucócitos esplênicos (LE) de cães com CanL usando a análise de microarranjo, e a análise *in silico* identificou alvos da via PTEN. PTEN está envolvido na regulação imune de macrófagos. Medimos PTEN e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) após transfecção com mimic e inibidor de miR-21 e miR-148a em LE de cães com CanL. Os níveis de PTEN aumentaram, NO e ROS diminuíram em LEs de cães com CanL. A inibição do miRNA-21 resultou em aumentos de PTEN; em contraste, o PTEN diminuiu após a inibição do miR-148a. Os níveis de nitrito aumentaram após a transfecção com o inibidor de miR-21, mas diminuíram com o inibidor de miR-148a. O aumento de miR-21 promoveu redução nos níveis de ROS e NO. Esses achados sugerem que miR-21 e miR-148a modulam a resposta imune em cães com CanL por meio de PTEN, NO e ROS.

Palavras-chave: microRNA. ROS. NO. PTEN. Nitrito. *Leishmania infantum*. Leucócitos esplênicos.

FREITAS, J. H. **MicroRNA-21 and microRNA-148a regulates PTEN, NO and ROS in canine leishmaniasis.** 2023. 97 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Canine Visceral leishmaniasis (CanL) poses a severe public health threat in several countries. Disease progression depends on the degree of immune response suppression. MicroRNAs (miRs) modulate mRNA translation into proteins and regulate various cellular functions and pathways associated with immune responses. MiR-21 and miR-148a can alter the parasite load and M1 macrophages are the principal cells in dog's leishmanicidal activity. A previous study found increased miR-21 and miR-148a in splenic leukocytes (SL) of dogs with CanL using microarray analysis and in silico analysis, identified PTEN pathway targets. PTEN is involved in the immune regulation of macrophages. We measured PTEN and the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) after transfection SL of dogs with CanL with mimic and inhibition of miR-21 and miR-148a. PTEN levels increased, NO and ROS decreased in SLs from dogs with CanL. Inhibition of miRNA-21 resulted in PTEN increases; in contrast, PTEN decreased after miR-148a inhibition. Nitrite levels increased after transfection with miR-21 inhibitor but were decreased with miR-148a inhibitor. The increase in miR-21 promoted a reduction in ROS and NO levels. These findings suggest that miR-21 and miR-148a modulate the immune response in dogs with CanL through PTEN, NO, and ROS.

Keywords: microRNA. ROS. NO. PTEN. Nitrite. *Leishmania infantum*. Splenic leukocytes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Fatores epidemiológicos da LV	12
1.2 Resposta imunológica na LV	14
1.2.1 Resposta inata.....	14
1.2.2 Resposta imunológica adaptativa	16
1.2.3 Expressão de mir-21 e mir-148a na LV	18
1.2.4. Expressão de PTEN na LV.....	22
2 CAPÍTULO 1 - MICRORNA-21 AND MICRORNA-148A REGULATES PTEN, NO AND ROS IN CANINE LEISHMANIASIS	27
2.1 Resumo	28
2.2 Abstract.....	29
2.3 Introduction.....	30
2.4 Methods.....	32
2.4.1 Ethics committee approval.....	32
2.4.2 Animals	32
2.4.3 Blood and spleen samples	33
2.4.4 Obtaining SLs	33
2.4.5 ELISA and DPP	34
2.4.6 DNA Extraction	34
2.4.7 Determining the species of <i>Leishmania</i>	34
2.4.8 Transfection of miR-21 and miR-148a	34
2.4.9 Detection of NO and ROS in SLs from infected and control dogs	35

2.4.10 Nitrite determination	35
2.4.11 Dosage protein and PTEN analysis	36
2.4.12 Statistical analysis	36
2.5 Results	37
2.5.1 PTEN concentration in SLs of dogs with CanL	37
2.5.2 NO and ROS concentrations in SLs of dogs with CanL.....	37
2.5.3 Effect of miR-21 and miR-148a on PTEN concentration in SLs of dogs with CanL	38
2.5.4 Effect of miR-21 and miR-148a on NO concentration in SLs of dogs with CanL	39
2.5.5 Effect of miR-21 and miR-148a on nitrite production in SLs of dogs with CanL	40
2.5.6 ROS concentration and the effect of miR-21 and miR-148a on the regulation of its production in SLs of dogs with CanL	41
2.6 Discussion	43
2.7 Conflict of Interest.....	46
2.8 Funding	46
2.9 Acknowledgments	46
2.10 References	47
2.11 Supporting information.....	56
APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	68
ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO.....	82
ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	97

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Fatores Epidemiológicos da LV

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença distribuída em diversos continentes e a maior incidência dessa doença estão localizadas em países como Índia, Bangladesh, Brasil, Sudão e Etiópia (ALVAR *et al.*, 2012). Trata-se de uma doença zoonótica que apresenta como vetor um flebotomíneo e que pode transmitir algumas espécies de parasitas, como a *Leishmania infantum*. O parasito é capaz de se apresentar em duas formas, sendo a forma promastigota e a amastigota (ALCOLEA *et al.*, 2016). Essa doença tem grande destaque em sua expansão e apresenta relevância para o cenário público de saúde em diversos lugares do mundo. Portanto, é fundamental o diagnóstico clínico precoce com base na perspectiva epidemiológica da região acometida e diagnósticos por testes moleculares são um dos métodos de confirmação (ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

Os cães infectados podem desenvolver quadros assintomáticos e sintomáticos (MORENO; ALVAR, 2002). Exames laboratoriais são importantes para a confirmação da doença e para identificação da severidade do caso, alterações podem ser observadas em níveis de concentração de enzimas hepáticas, além do quadro clínico de hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e anemia (CIARAMELLA *et al.*, 1997). Os sintomas que podem surgir são hiporexia, linfadenopatia, onicogrifose, alopecia, descamação da pele e entre outros. Com o avanço da doença torna-se necessário uma constante vigilância epidemiológica de áreas com o foco da doença, sendo através de testes sorológicos e de inquéritos entomológicos (SAKAMOTO *et al.*, 2007). E existem meios de prevenção para minimizar a expansão de novas infecções através da vacinação em cães (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2017). O uso de coleiras impregnadas de inseticidas ou dispositivos com imunoestimuladores e a quimioterapia em animais infectados podem também contribuir para o controle da doença (REGUERA *et al.*, 2016).

No continente americano, existem 12 países endêmicos e entre o período de 2001-2017 foram relatados o total de 59.769 casos de Leishmaniose visceral em humanos (OMS, 2019). Em alguns países africanos os casos de leishmaniose visceral

podem se agravar pela coinfecção pelo vírus HIV ou se o houver histórico de doenças crônicas (KONE *et al.*, 2019).

A origem da Leishmaniose no Brasil começou na região nordeste e depois se dispersou para as demais regiões no país (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008). E alguns países próximos como Bolívia, Paraguai e Argentina podem ter contribuído para a expansão. A expansão dos vetores têm aumentado em regiões como São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Diante desse cenário atual, novos estudos e alternativas que contribuem para o controle dessa dispersão é essencial (PASQUALI *et al.*, 2019). Um outro fator determinante para a proliferação seria a facilidade de adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* em regiões urbanas que são diferentes ao meio ambiente de origem e a dificuldade de encontrar os focos de criação do vetor (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008).

O parasito apresenta dois estágios de vida, sendo uma das fases conhecida como promastigota, conhecida como a forma anterior ao processo de fagocitose pelas células de defesa. E a outra fase é a amastigota, no qual reside no interior de macrófagos (LIU; UZONNA, 2012).

A *Leishmania* é caracterizada como um parasito intracelular e sua replicação acontece no interior de macrófagos. Após a infecção, os macrófagos passam a produzir substâncias como as espécies reativas de oxigênio (ROS) como forma de defesa (LIMA-JUNIOR *et al.*, 2017). Outras células como os eosinófilos, também já foram encontrados níveis elevados de ROS e óxido nítrico (NO) em cães infectados com a *L. infantum* (COSTA *et al.* 2018). Os neutrófilos polimorfonucleares são os primeiros a serem recrutados e a realizar o processo de fagocitose quando se inicia a infecção (PETERS *et al.*, 2008) porém os macrófagos são as células que hospedam de forma definitiva o parasito (PEREIRA *et al.*, 2019).

O diagnóstico pode ser feito por meio de testes sorológicos, histopatologia, identificação por microscopia ou testes moleculares, como o PCR que apresenta alta sensibilidade e utiliza o DNA do parasito. É recomendado realizar mais de um teste para confirmação do diagnóstico e também a identificação da espécie para constatar qual tipo de tratamento é o mais indicado ao paciente (ARONSON *et al.*, 2017).

No Brasil, os exames mais comuns são para o diagnóstico canino são o TR-DPP®, testes moleculares, sorológicos e parasitológicos. Apesar do amplo uso desses testes, existem limitações e ocorrências de falso-positivo (PESSOA-E-SILVA *et al.*, 2019), Portanto, é importante apresentar um bom critério de escolha dos testes

para diagnosticar essa doença e também de novas ferramentas para melhores resultados.

1.2 Resposta imunológica na LV

1.2.1 Resposta Inata

Células como os macrófagos são essenciais para combater o parasito *Leishmania* na resposta imune inata. Porém, esse parasito desenvolveu um mecanismo de defesa capaz de se hospedar dentro dessas células e sobreviver em um ambiente hostil (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013). Assim como os macrófagos, os neutrófilos também atuam no papel de células hospedeiras da *Leishmania* na fase inicial e as células Natural Killer (NK) podem aparecer após 24 horas da infecção (MÜLLER *et al.*, 2001). Os neutrófilos participam na defesa do organismo e através de processos de estresse oxidativo, apoptose e no aumento da atividade da enzima mieloperoxidase, sendo essa enzima importante na produção de espécies reativas de oxigênio (OUALHA *et al.*, 2019).

O parasito quando está dentro do organismo do hospedeiro pode entrar em contato com o sistema complemento logo na fase inicial. Após a ativação do complemento, o complexo de ataque à membrana (MAC) C5b-C9 irá contribuir na lise do parasito. Porém, a *Leishmania* tem a capacidade de inibir a atividade da MAC através do Fator de Virulência lipofosfoglicano (LPG) que atua na superfície da *Leishmania*. Além disso, a inativação de C3b e do Complexo MAC também ocorre pela ação da molécula GP63 que fica localizada na superfície do parasito (GURUNG; KANNEGANTI, 2015)

A *Leishmania* para conseguir se manter no hospedeiro é capaz de modular a resposta imune no hospedeiro. O parasito utiliza como alternativa a mudança na produção substâncias antimicrobianas, tais como óxido nítrico. E com isso, a resposta imune inata ficará prejudicada e assim ocorrerá a progressão da doença (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). Cães infectados podem expressar níveis altos de IFN- γ em locais de maior proliferação, levando a ativação da resposta Th1 que responde contra a infecção. E o aumento de TGF- β no linfonodo de cães, pode ser um indicativo da atuação de uma resposta imune reguladora (SANTOS *et al.*, 2019).

Os inflamassomas são compostos por complexos proteicos que são ativados na presença do patógeno (SHIO *et al.*, 2015). Esse complexo proteico é formado por três componentes como: molécula adaptadora, caspase inflamatória e uma proteína sensora (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015). Na presença do parasito, a proteína NLRP3 é ativada em resposta à infecção contribuindo na inibição da replicação da *Leishmania* (MENDONÇA *et al.*, 2020). Inflamassomas são capazes de controlar a maturação e aumentar os níveis de IL-1 β e IL-18, desencadeia o processo inflamatório celular para conter o avanço da doença e promover a piroptose (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). A ativação e o reconhecimento dos inflamassomas também estão presentes em infecções de parasitas intracelulares como *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium spp.* e a *Leishmania* (ZAMBONI; LIMA-JUNIOR, 2015).

A expressão de Metaloprotease GP63 é um fator de virulência de espécies do grupo de *Leishmania* e que pode contribuir para inibição da função de macrófagos, e com isso também resultará na diminuição da concentração da citocina IL-1 β e na clivação dos componentes do inflamassoma NLRP3. Essa redução inibi a disponibilidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SHIO *et al.*, 2015) que é gerado a partir de NADPH oxidase (LAMBETH, 2004). Além dos macrófagos, os eosinófilos também desempenham um papel importante no controle da leishmaniose através da produção de ROS e NO (COSTA *et al.*, 2018).

A polarização de macrófagos para o perfil M1 está relacionada com a geração de substâncias como ROS, NO, IL-12, IL-1 β , TNF- α , NADPH oxidase-1 e iNOS que diminuem a carga parasitária. Enquanto a polarização para o perfil M2 pode levar ao aumento da expressão de marcadores como IL-10, CD163, CD206, TGF- β e arginase-1, contribuindo na sobrevivência da *Leishmania* (KUMAR *et al.*, 2018). O parasito do gênero *L. donovani* pode exercer influência na inibição da ativação de NF- κ B, prejudicar a produção de ROS e interferir negativamente na ativação de inflamassomas NLRP3. E dessa forma, ocorrer a progressão da doença (GUPTA *et al.*, 2017).

Durante a infecção pela *Leishmania donovani*, há o importante processo da explosão oxidativa de macrófagos em resposta à fagocitose e levando a produção de ROS (SAHA *et al.*, 2019), mas o parasito tenta se adaptar às diferentes condições que dificultam a sua sobrevivência como a presença de Oxigênio reativo e espécies de nitrogênio (ROS e RNS) que também são produzidos durante o processo de fagocitose de macrófagos (SARDAR *et al.*, 2013). A produção de ROS pode ser

considerada como forma de ameaça à integridade do parasito, e como forma de defesa a *Leishmania* desenvolveu um sistema de reparo do próprio DNA (MISHRA *et al.*, 2018).

As espécies de *Leishmania* são afetadas pela presença de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio durante a explosão oxidativa. O Óxido nítrico desempenha um papel tóxico e pode dar origem a outros metabólitos como H_2O_2 e $ONOO^-$, e esses metabólitos também apresentam toxicidade. No estresse oxidativo, a ativação de NADPH oxidase e iNOS geram a produção de compostos como ROS e NO (ASSCHE *et al.*, 2011).

Na leishmaniose visceral, o sucesso da atividade leishmanicida com a produção de NO por macrófagos (LIEW, 1995) tem sua importância já comprovada no homem (PANARO *et al.*, 2001), camundongo (BOGDAN, 2001) e cão (SERARSLAN; YILMAZ; SOGUT, 2005). E em amostras de PBMC de cães com Leishmaniose, os níveis de NO estão aumentados em comparação com o grupo controle (MARTINI *et al.*, 2018). Conclui-se que ROS e NO são fundamentais para o controle da doença.

1.2.2 Resposta imunológica Adaptativa

A leishmaniose é uma doença que se não tratada pode levar o animal a morte e levar a progressão devido a diversos fatores, onde o parasito consegue usar como forma de defesa a inibição de citocinas anti-inflamatórias, a exaustão de células T ou prejuízo na estrutura do linfonodo e na resposta humoral. É importante realizar uma compreensão e mais estudos sobre os mecanismos de defesa do hospedeiro e do parasito para realizar uma melhor abordagem no tratamento da doença (RODRIGUES *et al.*, 2016)

Macrófagos infectados são capazes de desencadear a resposta imune adaptativa e são consideradas como células apresentadoras de antígenos (APCs). A estimulação do MHC de classe II permite a ligação com o receptor da célula T (ROY *et al.*, 2014) e as moléculas coestimuladoras são importantes para ativar a resposta dessas células (GANNAVARAM *et al.*, 2016). Moléculas acessórias B7-1 e B7-2 podem se ligar ao CD28 (CAUX *et al.*, 1994) resultando em uma regulação positiva, porém quando ligada ao CTLA-4 a ligação é caracterizada como negativa (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005).

No experimento com células de sangue periférico mononucleadas humanas e *in vitro*, foi comprovado a importância de CD80 e CD86 na Leishmaniose. Após o bloqueio de ambas moléculas, houve uma redução de citocinas IL-5 e IFN- γ que levou na progressão da doença (BRODSKYN; DEKREY; TITUS, 2001).

O PD-1 conhecido como “Programmed Cell Death protein-1”, pode desempenhar um papel importante em células leucocitárias de cães com Leishmaniose, sendo altamente expressa e participar na regulação da função de leucócitos e na inibição de citocinas. O bloqueio da molécula de PD-1 pode aumentar os níveis de NO e NO₂ e levar a redução da carga parasitária (REBECH *et al.*, 2020).

Para se obter uma resposta imune protetora é essencial a ativação de Th1 (GRADONI, 2015). Cães infectados e assintomáticos com a ativação do sistema adaptativo devido à *Leishmania*, é observada a predominância da resposta Th1 e aumento dos níveis de IFN- γ e TNF- α que colaboram para a morte do parasito da forma amastigota (CARRILLO; MORENO, 2009). E para se produzir uma vacina eficaz, também é utilizado esse modelo de estimulação da resposta Th1 e de forma duradoura em cães (GRADONI, 2015).

O resultado clínico do quadro da Leishmaniose pode variar desde os sintomas como lesões cutâneas (SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014) até um quadro mais severo com o comprometimento de vísceras e da imunidade mediada por células T (BUNN *et al.*, 2018).

Os linfócitos B são células importantes para a proteção do organismo contra diversos patógenos. Em infecções agudas a resposta humoral tem a capacidade de desempenhar um papel importante combatendo o antígeno. E em alguns casos de infecções crônicas, são induzidas ao desequilíbrio do sistema humoral em favor da sobrevivência do agente patológico (HURDAYAL *et al.*, 2017). Em um estudo realizado com células B humanas, foi avaliado o perfil específico dessas células na atuação da *Leishmania infantum*, onde revelou a identificação dessa população de células capazes de serem influenciadas pelo parasito a secretarem altos níveis de IL-10. Portanto, foi comprovado que uma das formas de defesa da *Leishmania* é a utilização de células B através da produção de citocinas (ANDREANI *et al.*, 2015).

1.2.3 Expressão de mir-21 e mir-148a na LV

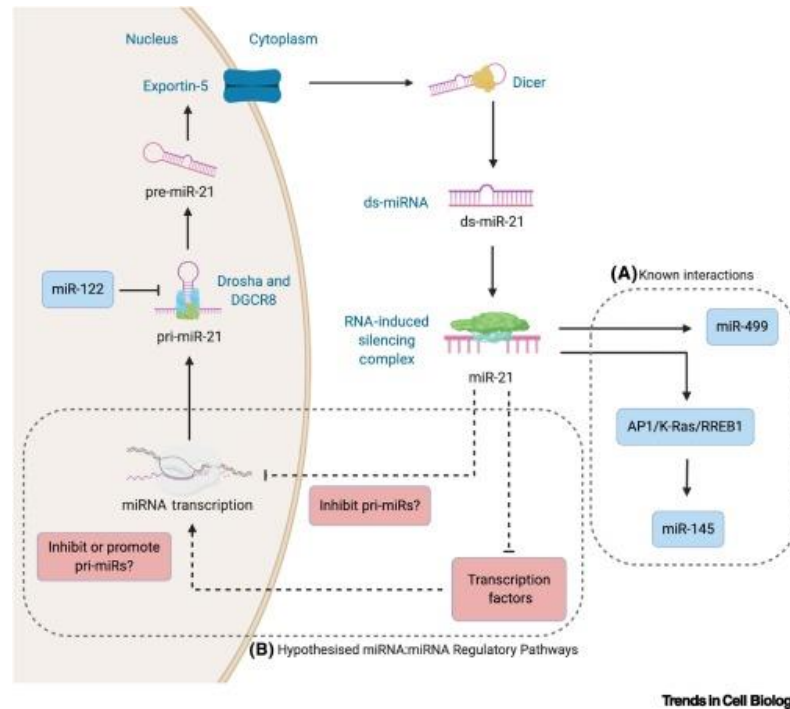
Os microRNAs são responsáveis por agir em diversos processos biológicos realizando um papel importante como mediador intracelular (SHU *et al.*, 2017). E por meio de doenças infecciosas, o agente etiológico é hábil a modular a expressão de microRNAs nos processos de regulação de genes específicos na fase pós-transcricional. Na infecção por *Leishmania amazonensis* em camundongos, a modulação de microRNAs feita pelo parasito leva a modificação da expressão da via Toll-like receptors em macrófagos e esse mecanismo resulta em prejuízo para a defesa do sistema imune (MUXEL *et al.*, 2018). Do mesmo modo que os microRNAs participam na sobrevivência do patógeno, existem outros que atuam na defesa do sistema imunológico. Em macrófagos de hospedeiros infectados por *Leishmania*, a ativação desses mecanismos de defesa podem induzir ao aumento da expressão de mRNAs que são importantes no controle da progressão da doença (VARIKUTI *et al.*, 2019).

Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes que interagem com o mRNA para levar a sua degradação e podem ser usados como alvos terapêuticos para diversas doenças (ZHANG; WANG; GEMEINHART, 2013). O microRNA primário (pri-microRNA) começa a ser processado no núcleo após a sua transcrição, onde é clivado pela ação enzimática de Drosha e DGCR8 formando o pre-microRNA (DAUGAARD; HANSEN, 2017). Em seguida, o pre-microRNA é transportado para o citoplasma pela ação de Exportin-5 para continuar o seu processo de maturação. No citoplasma, sofre clivagem pela ação da Dicer que corta a região do “loop”, formando um microRNA com duas fitas simples. E em seguida, esse microRNA interage com o “complexo de silenciamento induzido por RNA” (RISC) para levar a formação da última forma do microRNA. Na figura abaixo (Fig.1) é demonstrado como acontece a formação do microRNA e com o exemplo envolvendo miR-21:

Após a transcrição da forma primária de miR-21 no núcleo, ocorre a clivagem a partir da Dicer e DGCR8 para formar o pre-microRNA-21 que é transportado para o citoplasma pelo Exportin-5. Em seguida, sofre clivagem da Dicer para originar o microRNA-21 com fita dupla que é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). (A) Possíveis microRNAs alvos de miR-21 e outras que

miR-21 pode desempenhar, sendo representado em azul. (B) Vias hipotéticas de regulação por miR-21 representadas em vermelho.

Fig. 1. Via canônica da formação de miR-21 e seus possíveis alvos.



Fonte: HILL; TRAN, 2021

Após sua formação, os miRs passam a atuar no alvo promovendo a regulação da expressão gênica e a produção de proteínas, e dessa forma pode desempenhar importantes funções regulatórias no organismo. A expressão de miR-21 conferi um papel protetor em camundongos, pois tem como alvo os genes MARCKS e RhoB que regulam a atividade fagocítica de macrófagos, sendo importante no combate a infecções (JOHNSTON *et al.*, 2017). Na leishmaniose, a produção de proteínas, como as citocinas IL-10 e TGF- β , são moduladas pela *Leishmania* através da expressão de miRs para controlar a resposta imune no hospedeiro (HAMIDI *et al.*, 2021).

A *Leishmania* também apresenta como mecanismos de evasão a modulação do transporte intracelular de miRs no hospedeiro, como por exemplo, a restrição da entrada de miR-122 provenientes de vesículas extracelulares para reduzir a resposta inflamatória. Contudo, o parasito também atua no processo inverso, realizando a exportação de miR-146 que exerce ação anti-inflamatória em células infectadas, e esse processo acontece através da modulação da proteína HuR. E no momento que esse miR está no meio extracelular, é promovida a polarização de macrófagos

adjacentes para perfil M2, favorecendo a sobrevivência do parasito (GANGULY *et al.*, 2021).

Na Leishmaniose canina, alguns miRs apresentam sua expressão aumentada, como o miR-148a e miR-21, e a inibição de miR-21 está associada ao aumento do perfil Th1 e diminuição da carga parasitária (MELO *et al.*, 2019). De acordo com o miRBase Sequence Database, cfa-miR-21 e cfa-miR-148a estão localizados no cromossomo 9 e 14 respectivamente (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2008). Em humanos, miR-148a é considerado como membro da família miR-148a/miR-152 e pode ser encontrado nos cromossomos 7, 12 e 17 (FRIEDRICH *et al.*, 2017); enquanto hsa-miR-21 está no cromossomo 17 (GRIFFITHS-JONES *et al.*, 2008).

MiR-21 possui diversos genes alvos envolvidos na imunidade do cão com leishmaniose, como FAS, FASLG, PIK3R1, PTEN e entre outros (MELO *et al.*, 2019). O camundongo knockout de miR-21 apresenta resposta protetora em células esplênicas de com *L. donovani*, devido ao direcionamento da polarização de macrófagos para o perfil M1 e com produção de NO, IFN- γ e TNF- α no estágio ativo da infecção (VARIKUTI *et al.*, 2021). Além disso, a expressão miR-21 também regula a produção de IL-10 e a expressão de CD69 de linfócitos B em células esplênicas de cães com leishmaniose, sendo sugestivo a modulação desse miR pelo parasito (BRAGATO *et al.*, 2022).

Contudo, em células tumorais a expressão de miR-21 pode desempenhar um papel importante no controle da apoptose, e favorecer a progressão da doença através da diminuição da atividade de PTEN (LIU *et al.*, 2019). O efeito protetor acontece com a alta expressão de miR-21, pois leva ao direcionamento de macrófagos M2 em pacientes com câncer ovariano (AN; YANG, 2020), e esse efeito protetor pode ser devido à expressão de PTEN.

Em camundongos, o aumento da expressão de PTEN pode promover o controle da progressão do carcinoma hepatocelular e induzir ao estresse oxidativo (KATO *et al.*, 2021), mas na leishmaniose favorece a sobrevivência do parasito, pois não há produção de NO e ROS (MAUËL; RANSIJIN; BUCHMÜLLER-ROUILLER, 1991; SAHA *et al.*, 2019). Porém, ainda não foram feitas pesquisas a respeito dessa interação de NO e ROS com o miR-21 na patologia da Leishmaniose canina.

Em células humanas endoteliais, a expressão do miR-21 leva a um processo de estresse, com aumento da síntese de NO e inibição da apoptose (WEBER *et al.*, 2010). MiR-21 também pode regular a expressão de KRIT1 que está envolvido na

manutenção da homeostase de ROS (SALA *et al.*, 2018), e a expressão do gene SOD3 também modula os níveis de ROS em células epiteliais humanas (ZHANG *et al.*, 2012). Portanto, miR-21 tem atuação na regulação de NO e ROS na resposta imune, e uma compreensão desse mecanismo na leishmaniose é necessário para o desenvolvimento de terapias com alvos em microRNAs.

Em processos inflamatórios, a desregulação do miR-21 por meio de fatores como PAMPs ou DAMPs induz a ação anti-inflamatória e imunossupressora. Logo, a atuação do microRNA no sistema imunológico é apto de ser influenciado por agentes infecciosos (SHEEDY, 2015). Em reações inflamatórias excessivas, induzi-lo negativamente poderá conter a inflamação e o dano ao organismo. Em um estudo com sangue periférico humano, comprovou essa capacidade do miR-21 em participar na diferenciação das células T. A diminuição em sua expressão favoreceu o aumento de células de memória, pois tem correlação com genes responsáveis pela produção dessas células (KIM *et al.*, 2018).

Além dos efeitos regulatórios desempenhados por miR-21 na leishmaniose, miR-148a possui a sua expressão também aumentada (MELO *et al.*, 2019). MiR-148a-3p é capaz de promover efeitos regulatórios na diferenciação de monócitos em macrófagos com o uso de um fator estimulante de colônia (GM-CSF). No estudo com células da medula óssea de camundongos, foi demonstrada a ação de macrófagos por meio da expressão de miR-148a-3p, de modo que apresentaram um desempenho melhor na eliminação de patógenos pela alta quantidade produzida de ROS. O aumento na expressão de miR-148a-3p, contribui no aumento da produção de ROS com o uso da via PTEN/AKT que acontece durante o processo infeccioso (HUANG *et al.*, 2017).

Essa atuação do miR-148 na regulação imune em macrófagos de camundongos infectados, também foi comprovada em outro estudo com o parasita *Schistosoma japonicum*, onde a resposta também é direcionada aos alvos PTEN e PI3K/ AKT (GIRI; CHENG, 2019).

A sinalização mediada por miR-148a-3p promove a polarização dos macrófagos para o perfil M1 e isso aumenta a sua capacidade bactericida (HUANG *et al.*, 2017). Existem estudos sobre esse microRNA que divulgaram o seu importante papel como marcador prognóstico e como alvo terapêutico para diversos perfis de patologias, sendo tumores, doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas. Esse achados sugerem que a participação do miR-148 na resposta imune inata tem

comprovação, porém foi relatado também a sua atuação na regulação de células T e B (FRIEDRICK *et al.*, 2017). Em pacientes com processos inflamatórios como a artrite reumatoide, o aumento da expressão do miR-148 estimulado por T-bet e Twist 1 pode promover uma resposta imune direcionada à resposta Th1 (HAFTMANN *et al.*, 2015). Porém, na área da leishmaniose ainda é escasso a quantidade de informações sobre esse microRNA.

MiR-148 é regulador de processos inflamatórios e modula a via de NF- κ B e citocinas inflamatórias, como a IL-1 β , onde se liga a região 3'UTR do mRNA de IL-1 β , inibindo sua expressão e a produção da proteína (DONG *et al.*, 2021). A expressão de miR-148a pode exercer um papel na regulação da resposta inflamatória na leishmaniose, contudo a sua inibição leva a redução da carga parasitária, comprovando o seu importante papel no controle da infecção (REBECH *et al.*, 2023).

O tratamento da Leishmaniose canina tem certas limitações porque o arsenal terapêutico contra esta doença é limitado e as drogas mais comumente usadas apresentam alta toxicidade (nefrotoxicidade, problemas intestinais, dores musculares), tem custo elevado e podem ser ineficazes em alguns casos (BANETH; SHAW, 2002). Falhas no tratamento têm implicações epidemiológicas uma vez que, após o tratamento, os cães tornam-se assintomáticos, mas continuam a ser um reservatório para a transmissão do parasito pelo vetor (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Devido à supressão imunológica celular ser determinante na progressão da doença, o conhecimento de fatores associados a regulação imunológica é fundamental para a mudança do padrão de resposta.

Portanto, compreender o mecanismo de ação dos miRs na resposta imunológica é fundamental para o desenvolvimento de novos tratamentos para *Leishmaniose*, e assim promover melhores condições de vida ao animal.

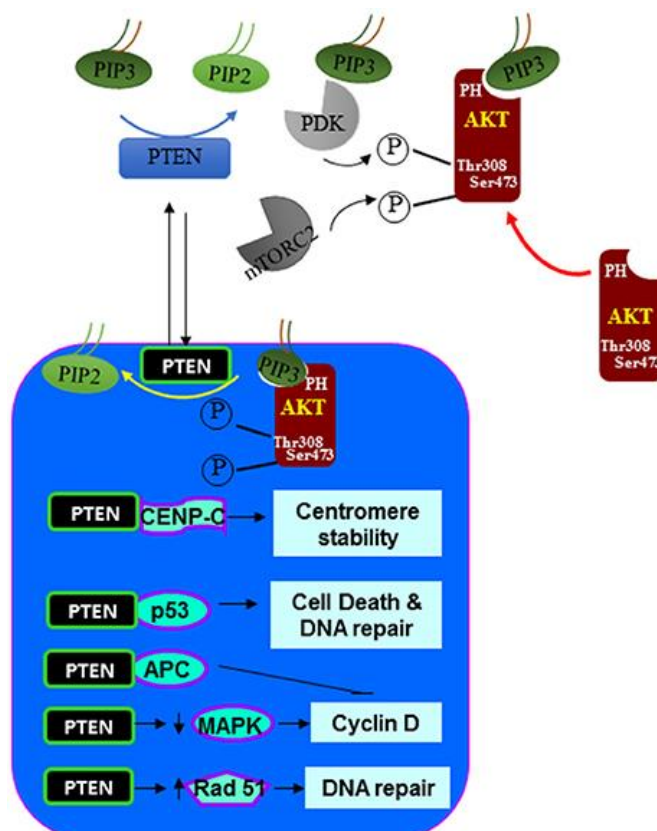
1.2.4 Expressão de PTEN na LV

PTEN é conhecido como um supressor tumoral e tem como alvos substratos lipídicos ou proteicos. A sua importância e o seu papel para tratamentos oncológicos é amplamente discutido em diversos estudos (KATO *et al.*, 2021; SHINDE; MADDIKA, 2016) e a sua deficiência pode induzir ao processo de estresse oxidativo em camundongos com carcinoma hepatocelular (KATO *et al.*, 2021). A proteína PTEN

sofre uma série de mutações em células tumorais e é considerada importante para o controle celular (FURNARI *et al.*, 1997). Contudo, essas mutações decorrentes desses processos podem reduzir a atividade catalítica de PTEN e prejudicar a sua função. O domínio C2 encontrado em PTEN está envolvido nessa atividade e contribui no seu recrutamento para a membrana, e além de ajudar na interação com o seu substrato PI(3,4,5)P3 (WORBY; DIXON, 2014). Na figura 2 está descrito os principais mecanismos de ação de PTEN, incluindo sua interação com PIP3:

PTEN realiza a desfosforilação de PIP3 na membrana plasmática, enquanto no núcleo pode inibir a atividade de AKT, como ocorre de forma semelhante na membrana plasmática. Além disso, PTEN participa na regulação de outras proteínas na região nuclear para regular a reparação do DNA, morte celular e estabilidade do centrômero.

Fig.2. Principais funções regulatórias de PTEN.



Fonte: CHEN *et al.*, 2018

A atividade de PTEN pode ser modulada em diversos níveis, como as modificações pós-traducionais (acetilação, fosforilação, SUMOilação, oxidação,

microRNAs, RNA antisense, ou por RNAs longos não codificantes) e interações entre proteínas. Essas modulações contribuem para manter a homeostase celular com níveis regulares de PTEN e PIP3 (WORBY; DIXON, 2014). Outro fator importante para a modulação de PTEN é o processo de metilação. Em camundongos com artrite reumatoide, a metilação de PTEN promove a regulação da atividade inflamatória e a produção de citocinas e quimiocinas, como IL-1 β , IL-6, CCL-2 e CCL-3 (LI *et al.*, 2021).

A redução de PTEN também é responsável por promover a ocorrência de processos apoptóticos, pois é aumentada a atividade oxidativa, onde é gerado o acúmulo de ROS em células endoteliais (WU *et al.*, 2014). Além disso, a falta de PTEN induz o aumento da atividade de PI3K/AKT, gerando falhas na reparação do DNA e comprometimento celular (HO *et al.*, 2020). Portanto, é necessário manter concentrações de PTEN/PI3K/AKT equilibradas para evitar o surgimento de doenças ou de processos apoptóticos.

PIP3 é um dos principais substratos encontrados na membrana plasmática, atuando na regulação da atividade de PTEN quando presente na membrana (MASSON; WILLIAMS, 2020). Porém, PTEN também está localizado no núcleo, exercendo papel na manutenção do DNA e evitando danos na sua estrutura (BASSI *et al.*, 2013), mas pode interagir na região da membrana quando recrutada (LIU *et al.*, 2005).

PI(3,4,5)P3 é considerado como substrato intermediário de PTEN e após a sua ativação, os níveis de AKT aumentam contribuindo nos processos de sobrevivência, proliferação e migração celular (KOTELEVETS *et al.*, 2020). Os níveis de AKT quando aumentados diminui a expressão de PTEN, onde leva a progressão de tumores em cães e gatos (ASPRONI *et al.*, 2021), além de exercer importante influência na viabilidade celular e na sobrevivência de macrófagos e monócitos (LINTON; MOSLEHI; RABAEV, 2019). Na leishmaniose, a ativação de AKT permite prevenir o processo de apoptose celular induzido pela *Leishmania* como mecanismo de sobrevivência e evasão (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ; WILKINS-RODRÍGUEZ; GUTIÉRREZ-KOBEH, 2022).

Em células dendríticas, a *Leishmania* pode ter como alvos a via PI3K/AKT e o fator de transcrição NF- κ B para manipulação da resposta inflamatória, sendo crucial para a sua multiplicação no hospedeiro (NEVES *et al.*, 2010). Além disso, o parasito pode produzir a proteína AKT-like que apresenta similaridades com a AKT humana,

além de ser encontrada em todas as espécies de *Leishmania* e pode facilitar a modulação da resposta imune no hospedeiro (TIRADO-DUARTE *et al.*, 2018).

A *Leishmania* apresenta um grande arsenal de mecanismos para promover a sua replicação e conseguir sobreviver no hospedeiro. E fatores epigenéticos podem estar envolvidos nesse processo, como modificações em histonas e alterações na expressão gênica (AFRIN; KHAN; HEMEG, 2019).

Alguns genes têm sua expressão alterada na leishmaniose, como PTEN que pode exercer importante papel durante o estágio da infecção. Em pacientes com leishmaniose visceral, pode ser observado a diminuição de mRNA para PTEN, além do aumento da produção de citocinas, como IFN- γ e IL-10 (SUDARSHAN *et al.*, 2016), ambas de perfil Th1 e Th2 respectivamente. Já em camundongos, macrófagos deficientes em PTEN ocorreu a diminuição da capacidade de eliminação do parasito (KURODA *et al.*, 2008), porém mais estudos são necessários para confirmar a sua função na modulação da resposta imune na leishmaniose.

A expressão de PTEN pode ser modulada por microRNAs através da interação com o mRNA de PTEN na região 3' UTR (LIU *et al.*, 2019). Na Leishmaniose canina, a expressão de miR-21 e miR-148a estão aumentados, e na análise *in Silico*, mostrou que PTEN participa como alvo desses microRNAs (MELO *et al.*, 2019). PTEN é capaz de promover mudanças na polarização do perfil de macrófagos M2 para M1, alterando para um resposta inflamatória (LIU *et al.*, 2020). Contudo, macrófagos de perfil M2 podem conter alta expressão de miR-21 que é responsável por modular negativamente a expressão de PTEN (ZHENG *et al.*, 2017).

Na leishmaniose, a polarização da resposta para um perfil M1 é importante para a eliminação do parasito, devido a produção de substâncias como ROS e NO (CHOW *et al.*, 2022; VAROTTO-BOCCAZZI *et al.*, 2020). O efeito da polarização de macrófagos desempenha um papel importante porque exerce influência na atividade microbicida e na função fagocítica (CHOW *et al.*, 2022)

No estudo com melanomas humano, mostrou que a presença de NO é capaz de modular negativamente a atividade de PTEN, além de aumentar a expressão da via PI3K/AKT (DING *et al.*, 2021). Resultado similar foi encontrado em pacientes com doenças degenerativas, onde NO ocasionou a degradação de PTEN, portanto, NO desempenha um papel importante para regulação da atividade de PTEN (KWAK *et al.*, 2010), e sugerimos que tenha participação desse mecanismo na leishmaniose.

ROS também pode levar a inativação da expressão de PTEN e ativar o mecanismo da via PI 3-kinase em macrófagos de murinos que é importante para o controle dos mecanismos de apoptose dos macrófagos e na produção de outros compostos durante a explosão oxidativa (LESLIE *et al.*, 2003). Porém, na literatura ainda não há estudos demonstrando o envolvimento na expressão de PTEN com a regulação de ROS na leishmaniose canina e mais estudos são necessários. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi de melhorar a nossa compreensão sobre a patogênese da LV no hospedeiro, e como tal, contribuir como alvos terapêuticos para futuros estudos.

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AFRIN, F.; KHAN, I.; HEMEG, H. A. Leishmania-host interactions — an epigenetic paradigm. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, artigo 492, 9 p., mar. 2019.

ALBUQUERQUE, A.; CAMPINO, L.; CARDOSO, L.; CORTES, S. Evaluation of four molecular methods to detect *leishmania* infection in dogs. **Parasites and Vectors**, London, v. 10, n. 1, artigo 57, 5 p., 2017. DOI: 10.1186/s13071-017-2002-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5346836/>. Acesso em: 30 set. 2019.

ALCOLEA, P. J.; ALONSO, A.; DOMÍNGUEZ, M.; PARRO, V.; JIMÉNEZ, M.; MOLINA, R.; LARRAGA, V. Influence of the microenvironment in the transcriptome of *Leishmania infantum* promastigotes: sand fly versus culture. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 5, artigo e0004693, 14 p., 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004693. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004693>. Acesso em: 04 abr. 2020.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, artigo e35671, 12 p., 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035671>. Acesso em: 30 set. 2019.

AN, Y.; YANG, Q. MiR-21 modulates the polarization of macrophages and increases the effects of M2 macrophages on promoting the chemoresistance of ovarian cancer. **Life Sciences**, Amsterdam, v. 242, artigo 117162, 10 p. 2020. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117162.

ANDREANI, G.; OUELLET, M.; MENASRIA, R.; GOMEZ, A. M.; BARAT, C.; TREMBLAY, M. J. *Leishmania infantum* amastigotes trigger a subpopulation of human B cells with na immunoregulatory phenotype. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 2, artigo e0003543, 17 p., 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003543. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003543>. Acesso em: 28 mar. 2020.

ARONSON, N.; HERWALDT, B. L.; LIBMAN, M.; PEARSON, R.; LOPEZ-VELEZ, R.; WEINA, P.; CARVALHO, E.; EPHROS, M.; JERONIMO, S.; MAGILL, A. Diagnosis and treatment of Leishmaniasis: clinical practice guidelines by the infectious diseases society of américa (IDSA) and the american society of tropical medicine and hygiene (ASTMH). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 96, n. 1, p. 24-45, 2017. DOI: 10.4269/ajtmh.16-84256. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5239701/>. Acesso em: 19 mar. 2020.

ASSCHE, T. V.; DESCHACHT, M.; LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology Medicine**, Tarrytown, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011. DOI:

10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584911003133?via%3Dihub>.
 Acesso em: 7 out. 2019.

ASPRONI, P.; MILLANTA, F.; RESSEL, L.; PODESTÀ, F.; PARISI, F.; VANNOZZI, I.; POLI, A. An immunohistochemical study of the PTEN/AKT pathway involvement in canine and feline mammary tumors. **Animals**, Basel, v. 11, n. 2, artigo 365, 15 p., fev. 2021.

BANETH, G.; SHAW, S. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 106, n. 4, p. 315-324, jul. 2002. DOI: 10.1016/s0304-4017(02)00115-2. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702001152?via%3Dihub>.
 Acesso em: 31 mar. 2020.

BASSI, C.; HO, J.; SRIKUMAR, T.; DOWLING, R. J. O.; GORRINI, C.; MILLER, S. J.; MAK, T. W.; NEEL, B. G.; RAUGHT, B.; STAMBOLIC, V. Nuclear PTEN controls DNA repair and sensitivity to genotoxic stress. **Science**, New York, v. 341, n. 6144, p. 395-399, jul. 2013.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, New York, v. 2, n. 10. p. 907-916, 2001. DOI: 10.1038/ni1001-907. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/ni1001-907#rightslink>. Acesso em: 20 mar. 2020.

BRAGATO, J. P.; REBECH, G. T.; FREITAS, J. H.; SANTOS, M. O.; COSTA, S. F.; EUGÊNIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; LIMA, V. M. F. miRNA-21 regulates CD69 and IL-10 expression in canine leishmaniasis. **PloS One**, San Francisco, v.17, n. 3, artigo e0265192, 15 p., 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0265192. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8947396/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

BRODSKYN, C. I.; DEKREY, G. K.; TITUS, R. G. Influence of coestimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by humans cells in vitro. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 69, n. 2, p. 665-672, feb. 2001. DOI: 10.1128/IAI.69.2.665-672.2001. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11159953/>. Acesso em: 26 mar. 2020.

BUNN, P. T.; OCA, M. M.; RIVERA, F. L.; KUMAR, R.; NG, S. S.; EDWARDS, C. L.; FALEIRO, R. J.; SHEEL, M.; AMANTE, F. H.; FRAME, T. C. M.; MULLER, W.; HAQUE, A.; UZONNA, J. E.; HILL, G. R.; ENGWERDA, C. R. Distinct roles of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells and IL-10-mediated immunoregulatory mechanisms during experimental visceral leishmaniasis caused by *leishmania donovani*. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 201, n. 11, p. 3362-3372, 2018. DOI: 10.4049/jimmunol.1701582. Disponível em:
<https://www.jimmunol.org/content/201/11/3362.long>. Acesso em: 13 abr. 2020.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 67-70, 2008. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.10.310. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19054573/>. Acesso em: 13 abr. 2020.

CAUX, C.; MASSACRIER, C.; VANBERVLIET, B.; DUBOIS, B.; VAN KOOTEN, C.; DURAND, I.; BANCHEREAU, J. Activation of human dendritic cell through DC40 cross-linking. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, n. 4, p. 1263-1272, out. 1994. DOI: 10.1084/jem.180.4.1263. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/180/4/1263/25409/Activation-of-human-dendritic-cells-through-CD40>. Acesso em: 26 mar. 2020.

CHEN, C. Y.; CHEN, J.; HE, L.; STILES, B. L. PTEN: tumor suppressor and metabolic regulator. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, artigo 338, 12 p. jul. 2018.

CHOW, L.; SOONTARARAK, S.; WHEAT, W.; AMMONS, D.; DOW, S. Canine polarized macrophages express distinct functional and transcriptomic profiles. **Frontiers in Veterinary Science**, Lausanne, v. 9, artigo 988981, 17 p., nov. 2022.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R. D.; GRADONI, L.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, London, v. 141, n. 21, p. 539-543, nov. 1997. DOI: 10.1136/vr.141.21.539. Disponível em: <https://veterinaryrecord.bmj.com/content/141/21/539.short>. Acesso em: 5 out. 2019.

COSTA, S. F.; TRIVELLATO, G. F.; REBECH, G. T.; MACIEL, M. O. S.; MELO, L. M.; LUVIZOTTO, M. C. R.; LIMA, V. M. F. Eosinophilic inflammation in lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite immunology**, Oxford, v. 40, n. 8, artigo e12567, 6 p., 2018. DOI: 10.1111/pim.12567. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/pim.12567>. Acesso em: 06 out. 2019.

DAUGAARD, I.; HANSEN, T.B. Biogenesis and function of ago-associated RNAs. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 208-219, 2017.

DING, Z.; OGATA, D.; ROSZIK, J.; QIN, Y.; KIM, S.-H.; TETZLAFF, M. T.; LAZAR, A. J.; DAVIES, M. A.; EKMEKCIOGLU, S.; GRIMM, E. A. iNOS associates with poor survival in melanoma: a role for nitric oxide in the PI3K-AKT pathway stimulation and PTEN S-Nitrosylation. **Frontiers on Oncology**, Lausanne, v. 11, artigo 631766, 10 p. fev. 2021.

DONG, W.; GAO, W.; CUI, J.; XU, T.; SUN, T. MicroRNA-148 is involved in NF- κ B signaling pathway regulation after LPS stimulation by targeting IL-1 β in miiuy croaker. **Fish and Shellfish Immunology**, Shanghai, v. 118, p. 66-1, nov. 2021. DOI: 10.1016/j.fsi.2021.08.028. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050464821002606?via%3Dihub>. Acesso em: 23 fev. 2023.

FRIEDRICH, M.; PRACHT, K.; MASHREGHI, M.-F.; JÄCK, H.-M.; RADBRUCH, A.; SELIGER, B. The role of the miR-148/-152 family in physiology and disease. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 47, n. 12, p. 2026-2038, 2017. DOI: 10.1002/eji.201747132. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201747132>. Acesso em: 1 apr. 2020.

FURNARI, F. B.; LIN, H.; HUANG, H. S.; CAVENEE, W. K. Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, DC, v. 94, n. 23, p. 12479-12484, nov. 1997.

GANNAVARAM, S.; BHATTACHARYA, P.; ISMAIL, N.; KAUL, A.; SINGH, R.; NAKHASI, H. L. Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: role of coinhibitory molecules. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 7, n. 187, 10 p., 2016. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00187. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4865500/pdf/fimmu-07-00187.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2020.

GANGULY, S.; GHOSHAL, B.; BANERJI, I.; BHATTACHARJEE, S.; CHAKRABORTY, S.; GOSWAMI, A.; MUKHERJEE, K.; BHATTACHARYYA, S. N. Leishmania hijacks microRNA import-export machinery of infected macrophage and survives by cross-communicating host miR-146a to subjugate HuR and miR-122 in neighbouring cells. Cold Spring Harbor: **BioRxiv**, 7 set. 2021. 72 p. DOI: 10.1101/2021.09.06.459146. Preprint. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.06.459146v1.full.pdf>. Acesso em: 8 fev. 2023.

GIRI, B. R.; CHENG, G. Host miR-148 regulates a macrophage mediated immune response during *Shistosoma japonicum* infection. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 49, n. 13-14, p. 993-997, dez. 2019. DOI: 10.1016/j.ijpara.2019.08.002. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751919302607?via%3Dihub>. Acesso em: 16 abr. 2020.

GRADONI, L. Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 208, n. 1-2, p. 94-100, feb. 2015. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.01.003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304401715000072?via%3Dihub>. Acesso em: 27 mar. 2020.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 23, p. 515-548, 2005. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115611.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H. K.; DONGEN, S.; ENRIGHT, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Research**, London, v. 36, p. D154-158, 2008. N. esp. Database.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Chapter five: mechanisms of immune evasion in Leishmaniasis. **Advances in Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 155-184, 2013. DOI: 10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124076792000053>. Acesso em: 9 mar. 2020.

GUPTA, A. K.; GHOSH, K.; PALIT, S.; BARUA, J.; DAS, P. K.; UKIL, A. *Leishmania donovani* inhibits inflammasome-dependent macrophage activation by exploiting the

negative. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 31, n. 11, p. 5087-5101, 2017. DOI: 10.1096/fj.201700407R. Disponível em: <https://www.fasebj.org/doi/pdf/10.1096/fj.201700407R>. Acesso em: 4 out. 2019.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T-D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 9, 1286-1294, 2015. DOI: 10.1111/cmi.12484. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/cmi.12484>. Acesso em: 16 mar. 2020.

HAFTMANN, C.; STITTRICH, A.-B.; ZIMMERMANN, J.; FANG, Z.; HRADILKOVA, K.; BARDUA, M.; WESTENDORF, K.; HEINZ, G. A.; RIEDEL, R.; SIEDE, J.; LEHMANN, K.; WEINBERGER, E. E.; ZIMMEL, D.; LAUER, U.; HÄUPL, T.; SIEPER, J.; BACKHAUS, M.; NEUMANN, C.; HOFFMANN, U.; PORSTNER, M.; CHEN, W.; GRÜN, J. R.; BAUMGRASS, R.; MATZ, M.; LÖHNING, M.; SCHEFFOLD, A.; WITTMANN, J.; CHANG, H.-D.; RAJEWSKY, N.; JÄCK, H.-M.; RADBRUCH, A. MASHREGHI, M.-F. miR-148a is upregulated by Twist1 and T-bet and promotes Th1-cell survival by regulating the proapoptotic gene Bim. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 45, n. 4, p. 1192-1205, abr. 2015. DOI: 10.1002/eji.201444633. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25486906/?dopt=Abstract>. Acesso em: 21 abr. 2020.

HAMIDI, F.; MOHAMMADI-YEGANEH, S.; HOSEINI, M. H. M.; TABAEI, S. J. S.; TAGHIPOUR, N.; LASJERDI, Z.; GHOLAMREZAEI, M.; HAGHIGHI, A. Inhibition of anti-inflammatory cytokines, IL-10 and TGF- β , in *Leishmania major* infected macrophage by miRNAs: a new therapeutic modality against leishmaniasis. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 153, artigo 104777, 8 p., 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104777. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401021000498?via%3Dihub>. Acesso em: 8 fev. 2023.

HILL, M.; TRAN, N. Global miRNA to miRNA Interactions: Impacts for miR-21. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 31, n. 1, p. 3-5, 2021. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.10.005.

HUANG, F.; ZHAO, J.-L.; WANG, L.; GAO, C. C.; LIANG, S.-Q.; AN, D.-J.; BAI, J.; CHEN, Y.; HAN, H.; QIN, H.-Y. miR-148a-3p mediates notch signaling to promote the differentiation and M1 activation of macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 8, artigo 1327, 13 p., out. 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01327. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5650608/>. Acesso em: 31 mar. 2020.

HURDAYAL, R.; NDLOVU, H. H.; REVAZ-BRETON, M.; PARIHAR, S. P.; NONO, J. K.; GOVENDER, M.; BROMBACHER, F. IL-4-producing B cells regulate T helper cell dichotomy in type 1- and type 2- controlled diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 114, n. 40, p. E8430-E8439, 2017. DOI: 10.1073/pnas.1708125114. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28916732/>. Acesso em: 14 abr. 2020.

HO, J.; CRUISE, E. S.; DOWLING, R. J. O.; STAMBOLIC, V. PTEN nuclear functions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 10, n. 5, artigo a036079, 11 p., maio 2020. DOI: 10.1101/cshperspect.a036079. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7197421/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

JOHNSTON, D. G. W.; KEARNEY, J.; ZATONA, Z.; WILLIAMS, M. A.; O'NEILL, L. A. J.; CORR, S. C. MicroRNA-21 limits uptake of *Listeria monocytogenes* by macrophages to reduce the intracellular niche and control infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 7, artigo 201, 12 p. maio 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00201. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5440467/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

KATO, T.; MURATA, D.; ANDERS, R. A.; SESAKI, H.; IJIMA, M. Nuclear PTEN and p53 suppress stress-induced liver cancer through distinct mechanisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 549, p.83-90, 2021. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.093.

KIM, C.; HU, B.; JADHAV, R. R.; JIN, J.; ZHANG, H.; CAVANAGH, M. M.; AKONDY, R. S.; AHMED, R.; WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Activation of miR-21-regulated pathways in immune aging selects against signatures characteristic of memory T cells. **Cell Reports**, Cambridge, v. 25, n. 8, p. 2148-2162.e.5, nov. 2018. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.10.074. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6371971/pdf/nihms-1515790.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2020.

KONE, A. K.; NIARÉ, D. S.; PIARROUX, M.; IZRI, A.; MARTY, P.; LAURENS, M. B.; PIARROUX, R.; THERA, M. A.; DOUMBO, O. K. Visceral Leishmaniasis in West Africa: clinical characteristics, vectors, and reservoirs. **Journal of Parasitology Research**, New York, v. 2019, artigo 9282690, 8 p., 2019. DOI: 10.1155/2019/9282690. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jpr/2019/9282690/>. Acesso em: 27 fev. 2020.

KOTELEVETS, L.; TRIFAUULT, B.; CHASTRE, E.; SCOTT, M. G. H. Posttranslational regulation and conformational plasticity of PTEN. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 10, n. 7, artigo a036095, 30 p., jul. 2020.

KUMAR, A. et al. Leishmania infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 40, n. 11, artigo 12586, 2018. DOI: 10.1111/pim.12586. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30187512/>. Acesso em: 19 mar. 2020.

KURODA, S.; NISHIO, M.; SASAKI, T.; HORIE, Y.; KAWAHARA, K.; SASAKI, M.; NATSUI, M.; MATOZAKI, T.; TEZUKA, H.; OHTEKI, T.; FÖRSTER, I.; MAK, T. W.; NAKANO, T.; SUZUKI, A. Effective clearance of intracellular *Leishmania major* in vivo requires Pten in macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 38, n. 5, p. 1331-1340, maio 2008.

KWAK, Y.-D.; MA, T.; DIAO, S.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; HSU, J.; LIPTON, S. A.; MASLIAH, E.; XU, H.; LIAO, F.-F. NO signaling and S-nitrosylation regulate PTEN

inhibition in neurodegeneration. **Molecular Neurodegeneration**, London, v. 5, artigo 49, 12 p., nov. 2010.

LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews. Immunology**, London, v. 4, p. 181-189, mar. 2004. DOI: 10.1038/nri1312. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nri1312>. Acesso em: 8 abr. 2020.

LESLIE, N. R.; BENNETT, D.; LINDSAY, Y. E.; STEWART, H.; GRAY, A.; DOWNES, C. P. Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. **EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 20, p. 5501-5510, out. 2003.

LI, X.-F.; WU, S.; YAN, Q.; WU, Y.-Y.; CHEN, H.; YIN, S.-Q.; CHEN, X.; WANG, H.; LI, J. PTEN methylation promotes inflammation and activation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 12, artigo 700373, jul. 2021. DOI: 10.3389/fphar.2021.700373. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8296842/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

LIEW, F. Y. Interactions between cytokines and nitric oxide. **Advances in Neuroimmunology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 201-209, 1995. DOI: 10.1016/0960-5428(95)00009-q. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096054289500009Q>. Acesso em: 20 mar. 2020.

LIMA-JUNIOR, D. S.; MINEO, T. W.; CALICH, V. L. G.; ZAMBONI, D. S. Dectin-1 activation during *Leishmania amazonensis* phagocytosis prompts Syk-dependent reactive oxygen species production to trigger inflammasome assembly and restriction of parasite replication. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 199, n. 6, p. 2055-2068, 2017. DOI: 10.4049/jimmunol.1700258. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/199/6/2055.long>. Acesso em: 4 out. 2019.

LINTON, M. F.; MOSLEHI, J. J.; RABAEV, V. R. Akt signaling in macrophage polarization, survival, and atherosclerosis. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 11, artigo 2703, 14 p., jun. 2019.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular Infection Microbiology**, Lausanne, v. 2, artigo 83, 8 p., 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00083. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417671/pdf/fcimb-02-00083.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2020.

LIU, J.-L.; SHENG, X.; HORTOBAGYI, Z. K.; MAO, Z.; GALLICK, G. E.; YUNG, W. K. A. Nuclear PTEN-mediated growth suppression is independent of akt down-regulation. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 25, n. 14, p. 6211-6224, jul. 2005.

LIU, H.Y.; ZHANG, Y.-Y.; ZHU, B.-L.; FENG, F.-Z.; YAN, H.; ZHANG, H.-Y.; ZHOU, B. miR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 23, n. 10, p. 4149-4155, 2019. DOI: 10.26355/eurrev_201905_17917.

LIU, W.; YU, M.; XIE, D.; WANG, L.; YE, C.; ZHU, Q.; LIU, F.; YANG, L. Melatonin-stimulated MSC-derived exosomes improve diabetic wound healing through regulating macrophage M1 and M2 polarization by targeting the PTEN/AKT pathway. **Stem Cell Research and Therapy**, London, v. 11, n. 1, artigo 259, 15 p., jun. 2020.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/csp/v24n12/24.pdf>. Acesso em: 1 out. 2019.

MARTINI, C. C.; ANDRADE, J. T.; ALMEIDA, S. K. M.; SILVA, K. L. O.; EUGENIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; LIMA, V. M. F. Cellular apoptosis and nitric oxide production in PBMC and spleen from dogs with visceral leishmaniasis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Exeter, v. 57, n. 2018, 7 p., 2018. DOI: 10.1016/j.cimid.2018.01.003.

MASSON, G. R.; WILLIAMS, R. L. Structural mechanisms of PTEN regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 10, n. 3, artigo a036152, 12 p., mar. 2020.

MAUËL, J.; RANSIJIN, A.; BUCHMÜLLER-ROUILLER, Y. Killing of Leishmania parasites in activated murine macrophages is based on an L - arginine - dependent process that produces nitrogen derivatives. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 49, n. 1, p. 73-82, 1991.

MELO, L. M.; BRAGATO, J. P.; VENTURIN, G. L.; REBECH, G. T.; COSTA, S. F.; GARCIA, L. E.; LOPES, F. L.; EUGÊNIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; LIMA, V. M.; F. Induction of miR 21 impairs the anti-leishmania response through inhibition of IL-12 in canine splenic leukocytes. **PloS One**, San Francisco, v. 14, n. 12, artigo e0226192, 11 p., 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0226192. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0226192>. Acesso em: 31 mar. 2020.

MENDONÇA, L. S. O.; SANTOS, J. M.; KANETO, C. M.; CARVALHO, L. D.; LIMA-SANTOS, J.; AUGUSTO, D. G.; CARVALHO, S. M. S.; SOARES-MARTINS, J. A. P.; SILVA-JARDIM, I. Characterization of serum cytokines and circulation microRNAs that are predicted to regulate inflammasome gene in cutaneous leishmaniasis patients. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 210, artigo 107846, 10 p., 2020. DOI: 10.1016/j.exppara.2020.107846. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448941830568X?via%3Dihub>. Acesso em: 7 abr. 2020.

MISHRA, A.; KHAN, M. I.; JHA, P. K.; KUMAR, A.; DAS, S.; DAS, P.; DAS, P.; SINHA, K. K. Oxidative Stress-mediated overexpression of Uracil DNA glycosylase in *Leishmania Donovanii* confers tolerance against antileishmanial drugs. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2018, artigo 4074357, 21 p. 2018. DOI: 10.1155/2018/4074357. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/4074357/#B16>. Acesso em: 20 mar. 2020.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002. DOI: 10.1016/s1471-4922(02)02347-4. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492202023474>. Acesso em: 3 out. 2019.

MÜLLER, K.; ZANDBERGEN, G.; HANSEN, B.; LAUFS, H.; JAHNKE, N.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, Berlin, v. 190, n. 1-2, p. 73-76, 2001. DOI: 10.1007/s004300100084. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s004300100084.pdf>. Acesso em: 9 mar. 2020.

MUXEL, S. M.; ACUÑA, S. M.; AOKI, J. I.; ZAMPIERI, R. A.; FLOETER-WINTER, L. M. Toll-like receptor and microRNA-let-7e expression after inflammatory response in *leishmania amazonensis*-infected macrophages. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 9, artigo 2792, 17 p., 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02792. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30555476/>. Acesso em: 30 mar. 2020.

NEVES, B. M.; SILVESTRE, R.; RESENDE, M.; OUAISSI, A.; CUNHA, J.; TAVARES, J.; LOUREIRO, I.; SANTARÉM, N.; SILVA, A. M.; LOPES, M. C.; CRUZ, M. T.; SILVA, A. C. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and impairment of nuclear factor-kappaB: molecular mechanisms behind the arrested maturation/activation state of *Leishmania infantum*-infected dendritic cells. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 177, n. 6, p. 2898-2911, dez. 2010. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100367. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2993270/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.2.293-305.2005. Disponível em: <https://cmr.asm.org/content/cmr/18/2/293.full.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2020.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Informe epidemiológico das américas. **Informe de Leishmanioses**, Washington, DC, n. 7, 8 p., 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/50505/2019-cde-leish-informe-epi-das-americas.pdf?sequence=2&isAllowed=y>. Acesso em: 1 out. 2019.

OUALHA, R.; BARHOUMI, M.; MARZOUKI, S.; HARIGUA-SOUIAI, E.; AHMED, M. B.; GUIZANI, I. Infection of human neutrophils with *Leishmania infantum* or *Leishmania major* strains triggers activation and differential cytokines release. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 9, artigo 153, 16 p., 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00153. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6524560/pdf/fcimb-09-00153.pdf>. Acesso em: 9 mar. 2020.

PANARO, M. A.; BRANDONISIO, O.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; LEOGRANDE, D.; FUMAROLA, L.; MITOLO, V. Nitric oxide production by

Leishmania-infected macrophages and modulation by prostaglandin E₂. **Clinical and Experimental Medicine**, Milano, v. 1, n. 3, p. 137-143, 2001. DOI: 10.1007/s10238-001-8025-0. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10238-001-8025-0>. Acesso em: 4 jan. 2023.

PASQUALI, A. K. S.; BAGGIO, R. A.; BOEGER, W. A.; GONZÁLEZ-BRITEZ, N.; GUEDES, D. C.; CHAVES, E. C.; THOMAZ-SOCCOL, V. Dispersion of *Leishmania* (*Leishmania*) infantum in central-southern Brazil: evidence from a integrative approach. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 13, n. 8, artigo e0007639, 20 p., 2019. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007639. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6715157/>. Acesso em: 4 out. 2019.

PESSOA-E-SILVA, R.; VAITKEVICIUS-ANTÃO, V.; ANDRADE, T. A. S.; SILVA, A. C. O.; OLIVEIRA, G. A.; TRJANO-SILVA, L. A. M.; NAKASONE, E. K. N.; PAIVA-CAVALCANTI, M. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Brazil: Confronting old problems. **Experimental Parasitology**, Orlando, v. 199, p. 9-16, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.02.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30796913-the-diagnosis-of-canine-visceral-leishmaniasis-in-brazil-confronting-old-problems/>. Acesso em: 2 fev. 2020.

PEREIRA, M. A.; ALEXANDRE-PIRES, G.; CÂMARA, M.; SANTOS, M.; MARTINS, C.; RODRIGUES, A.; ADRIANA, J.; PASSERO, L. F. D.; FONSECA, I. P.; SANTOS-GOMES, G. Canine neutrophils cooperate with macrophages in the early stages of *Leishmania infantum* in vitro infection. **Parasite immunology**, Oxford, v. 41, n. 4, artigo e12617, 13 p., 2019. DOI: 10.1111/pim.12617. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pim.12617>. Acesso em: 03 mar 2020.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, New York, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008. DOI: 10.1126/science.1159194. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18703742/>. Acesso em: 7 abr. 2020.

REBECH, G. T.; VENTURIN, G. L.; ITO, L. T. S.; BRAGATO, J. P.; FONSECA, B. S. C.; MELO, L. M.; COSTA, S. F.; EUGÊNIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; LIMA, V. M. F. PD-1 regulates leishmanicidal activity and IL-17 in dogs with Leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 219, artigo 109970, 6 p., 2020. DOI: 10.1016/j.vetimm.2019.109970.

REBECH, G. T.; BRAGATO, J. P.; COSTA, S. F.; FREITAS, J. H.; SANTOS, M. O.; SOARES, M. F.; EUGÊNIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; LIMA, V. M. F. miR-148a regulation interferes in inflammatory cytokine and parasitic load in canine leishmaniasis. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 17, n. 1, artigo e0011039, 19 p., jan. 2023. DOI: 10.1371/journal.pntd.0011039. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0011039>. Acesso em: 08 fev. 2023.

REGUERA, R. M.; MORÁN, M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; GARCÍA-ESTRADA, C.; BALAÑA-FOUCE, R. Current status on prevention and treatment of canine

leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 227, p. 98-114, 2016. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.07.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401716302709>. Acesso em: 4 out. 2019.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral leishmania infection. **Parasites and Vectors**, London, v. 9, n. 118, 13 p., 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1412-x. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13071-016-1412-x>. Acesso em: 24 mar. 2020.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, J.; WILKINS-RODRÍGUEZ, A. A.; GUTIÉRREZ-KOBEH, L. Involvement of Akt and the antiapoptotic protein Bcl-xL in the inhibition of apoptosis of dendritic cells by *Leishmania mexicana*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 44, n. 7, artigo e12917, mar. 2022.

ROY, K.; NASKAR, K.; GHOSH, M.; ROY, S. Class II MHC/peptide interaction in *Leishmania donovani* infection: implications in vaccine design. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 192, n. 12, p. 5873-5880, june 2014. DOI: 10.4049/jimmunol.1302970. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/192/12/5873>. Acesso em: 26 mar. 2020.

SAKAMOTO, C. A. M.; BRESCIANI, K. D. S.; SERRANO, A. C. M.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F.; KANAMURA, C. T.; COSTA, A. J. Leishmaniose visceral canina em Jaboticabal-SP: primeiro caso. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 125-128, 2007. Disponível em: <http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/viewFile/142/123>. Acesso em: 2 out. 2019.

SAHA, S.; BASU, M.; GUIN, S.; GUPTA, P.; MITTERSTILLER, A.-M.; WEISS, G.; JANA, K.; UKIL, A. *Leishmania donovani* exploits macrophage heme oxygenase-1 to neutralize oxidative burst and TLR signaling-dependent host defense. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 202, n. 3, p. 827-840, 2019. DOI: 10.4049/jimmunol.1800958. Disponível em: <https://www.jimmunol.org/content/202/3/827#ref-2>. Acesso em: 8 abr. 2020.

SALA, L. L.; MRAKIC-SPOSTA, S.; MICHELONI, S.; PRATTICHIZZO, F.; CERIELLO, A. Glucose-sensing microRNA-21 disrupts ROS homeostasis and impairs antioxidant responses in cellular glucose variability. **Cardiovascular Diabetology**, London, v. 17, n. 1, artigo 105, 14 p. 2018. DOI: 10.1186/s12933-018-0748-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6055345/>. Acesso em: 31 mar. 2020.

SANTOS, M. F.; ALEXANDRE-PIRES, G.; PEREIRA, M. A.; MARQUES, C. S.; GOMES, J.; CORREIA, J.; DUARTE, A.; GOMES, L.; RODRIGUES, A. V.; BASSO, A.; REISINHO, A.; MEIRELES, J.; SANTOS-MATEUS, D.; BRITO, M. T. V.; TAVARES, L.; SANTOS-GOMES, G. M.; FONSECA, I. P. Meglumine antimoniate and miltefosine combined with allopurinol sustain pro-inflammatory immune environments during canine leishmaniasis treatment. **Frontiers in Veterinary**

Science, Lausanne, v. 6, artigo 362, 18 p., 2019. DOI: 10.3389/fvets.2019.00362. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6813190/pdf/fvets-06-00362.pdf>. Acesso em: 7 abr. 2020.

SARDAR, A. H.; KUMAR, S.; KUMAR, A.; PURKAIT, B.; DAS, S.; SEN, A.; KUMAR, M.; SINHA, K. K.; SINGH, D.; EQUBAL, A.; ALI, V.; DAS, P. Proteome changes associated with *Leishmania donovani* promastigote adaptation to oxidative and nitrosative stresses. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 81, p. 185-199, 2013. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.01.011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391913000390?via%3Dihub>. Acesso em: 8 abr. 2020.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 61-71, 2014. DOI: 10.1111/vde.12105. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/vde.12105>. Acesso em: 13 abr. 2020.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell**, Cambridge, v. 140. n. 6, p. 821-832, 2010. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.040. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867410000759?via%3Dihub>. Acesso em: 7 abr. 2020.

SERARSLAN, G.; YILMAZ, H. R.; SOGUT, S. Serum antioxidant activities, malondialdehyde and nitric oxide levels in human cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 30, n. 3, p.267-271, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2005.01758.x.

SHEEDY, F. J. Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 6, artigo 19, 9 p., jan. 2015. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00019. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310327/pdf/fimmu-06-00019.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2020.

SHINDE, S.R.; MADDIKA, S. PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylation Rab7. **Nature Communications**, London, v. 7, artigo 10689, 11 p., fev. 2016.

SHIO, M. T.; CHRISTIAN, J. G.; JUNG, J. Y.; CHANG, K.-P.; OLIVIER, M. PKC/ROS-Mediated NLRP3 inflammasome activation is attenuated by *Leishmania* Zinc-Metalloprotease during infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 6, artigo e0003868, 14 p., 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003868. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003868>. Acesso em: 19 mar. 2020.

SHU, J.; SILVA, B. V. R.; GAO, T.; XU, Z.; CUI, J. Dynamic and modularized microRNA regulation and its implication in human cancers. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, artigo 13356, 17 p., 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-13470-5.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29042600/>. Acesso em: 14 abr. 2020.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, out. 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401709003124?via%3Dihub>. Acesso em: 31 mar. 2020.

SOLANO-GALLEGO, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; PETERSEN, C.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; MIRÓ, G.; FERRER, L.; BANETH, G. Diagnostic challenges in the Era of canine *Leishmania infantum* vaccines. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 33, n. 9, p. 706-717, 2017. DOI: 10.1016/j.pt.2017.06.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492217301538>. Acesso em: 3 out. 2019.

SUDARSHAN, M.; SINGH, T.; SINGH, B.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Suppression of host PTEN gene expression for *Leishmania donovani* survival in Indian Visceral Leishmaniasis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 18, n. 5, p. 369-372, maio 2016.

TIRADO-DUARTE, D.; MARÍN-VILLA, M.; OCHOA, R.; BLANDÓN-FUENTES, G.; SOARES, M. J.; ROBLEDO, S. M.; VARELA-MIRANDA, R. E. The Akt-like kinase of *Leishmania panamensis*: as a new molecular target for drug discovery. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 177, p. 171-178, jan. 2018. DOI: 10.1016/j.actatropica.2017.10.008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X16308154?via%3Dihub>. Acesso em: 8 fev. 2023.

VARIKUTI, S.; NATARAJAN, G.; VOLPEDO, G.; SINGH, B.; HAMZA, O.; MESSICK, G. V.; GUERAU-DE-ARELLANO, M.; PAPENFUSS, T.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. MicroRNA 155 contributes to host immunity against leishmania donovani but is not essential for resolution of infection. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 87, n. 8, p. e00307-00319, 2019. DOI: 10.1128/IAI.00307-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31182615/>. Acesso em: 14 abr. 2020.

VARIKUTI, S.; VERMA, C.; HOLCOMB, E.; JHA, B. K.; VIANA, A.; MARYALA, R.; LAMENZA, F.; McELWAIN, B. K.; DONI, N. Y.; PAPENFUSS, T.; OGHUMU, S.; GANNAVARAM, S.; NAKHASI, H.; SATOSKAR, A. R. MicroRNA-21 deficiency promotes the early Th1 immune response and resistance toward Visceral Leishmaniasis. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 207, n. 5, p. 1322-1332, set. 2021.

VAROTTO-BOCCAZZI, I.; EPIS, S.; ARNOLDI, I.; CORBETT, Y.; GABRIELI, P.; PARONI, M.; NODARI, R.; BASILICO, N.; SACCHI, L.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; TRANQUILLO, V.; BANDI, C. Boosting immunity to treat parasitic infections:

Asaia bacteria expressing a protein from *Wolbachia* determine M1 macrophage activation and killing of *Leishmania* protozoans. **Pharmacological Research**, London, v. 161, artigo 105288, 12 p. nov. 2020.

WEBER, M.; BAKER, M. B.; MOORE, J. P.; SEARLES, C. D. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 393, n. 4, p. 643-648, 2010. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.045. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X10002561>. Acesso em: 31 mar. 2020.

WORBY, C. A.; DIXON, J. E. PTEN. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 83, p. 641-669, 2014.

WU, Y.; ZHOU, H.; WU, K.; LEE, S.; LI, R.; LIU, X. PTEN phosphorylation and nuclear export mediate free fatty acid-induced oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, Larchmont, v. 20, n. 9, p. 1382-1395, 2014. DOI: 10.1089/ars.2013.5498, Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3936505/>. Acesso em: 8 fev. 2023.

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response in protozoan parasites. **Immunology Reviews**, Oxford, v. 265, n. 1, p. 156-171, 2015. DOI: 10.1111/imr.12291. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25879291/>. Acesso em: 20 mar. 2020.

ZHANG, X.; NG, W.-L.; WANG, P.; TIAN, L.; WERNER, E.; WANG, H.; DOETSCH, P.; WANG, Y. MicroRNA-21 Modulates the levels of Reactive Oxygen Species levels by targeting SOD3 and TNF- α . **Cancer Research**, Chicago, v. 72, n. 18, p. 4707-4713, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3445705/>. Acesso em: 31 mar. 2020.

ZHANG, Y.; WANG, Z.; GEMEINHART, R. A. Progress in microRNA delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 172, n. 3, p. 962-974, 2013.

ZHENG, P.; CHEN, L.; YUAN, X.; LUO, Q.; LIU, Y.; XIE, G.; MA, Y.; SHEN, L. Exosomal transfer of tumor-associated macrophage-derived miR-21 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, London, v. 36, n. 1, artigo 53, 13 p., abr. 2017.