

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 23/03/2025.

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

SIDNEI FERRO COSTA

**MicroRNA-194 regula a carga parasitária e a produção de
óxido nítrico dependente de IL-1 β em células
mononucleares do sangue periférico de cães com
leishmaniose**

Araçatuba

2023

SIDNEI FERRO COSTA

**MicroRNA-194 regula a carga parasitária e a produção de
óxido nítrico dependente de IL-1 β em células
mononucleares do sangue periférico de cães com
leishmaniose**

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 (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientador: Prof. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima

Araçatuba

2023

C837m	Costa, Sidnei Ferro MicroRNA-194 regula a carga parasitária e a produção de óxido nítrico dependente de IL-1 em células mononucleares do sangue periférico de cães com leishmaniose / Sidnei Ferro Costa. -- Araçatuba, 2023 96 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba Orientador: Valéria Marçal Felix de Lima 1. Leishmaniose visceral. Cães. MicroRNAs. Genes. Imunologia. 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-194 regula a carga parasitária e a produção de óxido nítrico dependente de IL-1 β em células mononucleares do sangue periférico de cães com leishmaniose

AUTOR: SIDNEI FERRO COSTA

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Valéria M. F. de Lima

Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Presencial)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Flávia Lombardi Lopes

Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Presencial)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Paulo César Ciarlina

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Presencial)

Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Cristiane Furuse

Profa. Dra. CRISTIANE FURUSE (Participação Presencial)

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Dra. SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)

Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas/USP

Araçatuba, 23 de março de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: MicroRNA-194 regula a carga parasitária e a produção de óxido nítrico dependente de IL-1 β em células mononucleares do sangue periférico de cães com leishmaniose

AUTOR: SIDNEI FERRO COSTA

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciência Animal, 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. FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Presencial)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Prof. Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI (Participação Presencial)
Departamento de Clínica Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. CRISTIANE FURUSE (Participação Presencial)
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/UNESP

Dra. SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)
Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas/USP

gov.br
Documento assinado digitalmente
SANDRA MARCIA MUXEL
Data: 29/03/2023 15:06:53 -0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Araçatuba, 23 de março de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família e aos meus amigos, que sempre me apoiaram principalmente nos momentos difíceis, somente vocês sabem a importância e o significado desse título na minha vida. Amo vocês!

A minha orientadora Valéria Marçal Felix de Lima que me propiciou essa oportunidade, sempre muito receptiva e atenciosa, me ouvindo nas horas de dúvidas, me ensinando sempre a melhor maneira de conduzir os experimentos e a escrever da melhor forma. Tenha certeza que encerro esse ciclo sendo uma pessoa muito melhor do que quando comecei. Muito obrigado por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Marilene Oliveira dos Santos Maciel, Gabriela Lovizutto Venturin, Jaqueline Poletto Bragato, Gabriela Torres Rebech, Jéssica Henrique Freitas e Matheus Fuji Soares, sempre companheiros, e dispostos a ajudar. Esse trabalho não é somente meu, mas nosso.

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

Agradeço a todos os professores que de alguma forma me ajudaram e me deram apoio ao longo dessa caminhada. Obrigado!

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

O apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2019/14894-0 que financiou a pesquisa que deu origem ao artigo científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por financiar o discente por um período.

***“Que maravilha é ninguém precisar esperar um
único momento para melhorar o mundo”***

Anne Frank

COSTA, S.D. **MicroRNA194 regula a carga parasitária e a produção de óxido nítrico dependente de IL-1 β em células mononucleares do sangue periférico de cães com leishmaniose**. 2023. 96 f. Tese (Doutorado) Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Os cães domésticos são os principais reservatórios urbanos de *Leishmania infantum*, o agente causador da leishmaniose visceral (LV). Na leishmaniose canina (CanL), a modulação da resposta imune do hospedeiro pode estar associada à expressão de pequenos RNAs não codificantes denominados microRNA (miR). A expressão do miR-194 aumenta em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de cães com leishmaniose com correlação positiva com a carga parasitária. Estudamos CMSP de 5 cães saudáveis e 28 cães com leishmaniose. A expressão basal do miR-194 foi analisada utilizando qPCR. As CMSP foram transfectadas com Mimic e Inibidor sintéticos do miR-194 e cultivadas a 37° C, 5% de CO₂ por 48 horas. A expressão de possíveis alvos do miR-194 foi analisada: iNOS, NO, T-Bet, GATA3 e FoxP3 foram analisadas por citometria de fluxo; a expressão gênica de TRAF6 foi analisada por qPCR, e o nível das citocinas IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e TGF- β no sobrenadantes de cultura celular foi mensurada por Ensaio Imunoenzimático de Captura (ELISA). A carga parasitária foi analisada por citometria e qPCR. Ensaio funcional com Inibidor do miR-194 e bloqueio de IL-1 β e avaliação da produção de NO também foram realizados. Transfecção com o mimic do miR-194 promoveu um aumento da carga parasitária. Não houve alterações significativas na expressão de T-bet, GATA3 ou FoxP3 com aumento ou inibição do miR-194. A inibição de miR-194 aumentou IL-1 β e NO em CMSP de cães doentes, e o bloqueio de IL-1 β após a inibição de miR-194 diminuiu os níveis de NO. Esses achados sugerem que o miR-194 é regulado positivamente em CMSP de cães com leishmaniose e regula positivamente a carga parasitária, possivelmente diminuindo a produção de NO dependente da IL-1 β . Esses resultados aumentam nossa compreensão dos mecanismos moleculares de evasão da resposta imune pelo parasita e a identificação de possíveis alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Cães. MicroRNAs. Genes. Imunologia

COSTA, S.F. **MicroRNA-194 regulates parasitic load and IL-1 β -dependent nitric oxide production in the peripheral blood mononuclear cells of dogs with leishmaniasis.** 2023. 96 f. Tese (Doutorado) Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Domestic dogs are the primary urban reservoirs of *Leishmania infantum*, the causative agent of visceral leishmaniasis. In canine leishmaniasis (CanL), modulation of the host's immune response may be associated with the expression of small non-coding RNAs called microRNA (miR). MiR-194 expression increases in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of dogs with leishmaniasis with a positive correlation with parasite load. We studied PBMCs from 5 healthy dogs and 28 dogs with leishmaniasis. Basal expression of miR-194 was measured using qPCR. PBMCs were transfected with synthetic miR-194 mimic and inhibitor, and cultured at 37 °C, 5% CO₂ for 48 hours. Expression of possible targets iNOS, NO, T-Bet, GATA3, and FoxP3 were measured using flow cytometry; gene expression of TRAF6 was measured using qPCR, and level of cytokines IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , and TGF- β in cell culture supernatants was measured using capture enzyme-linked immunosorbent assays. Parasite load was measured using cytometry and qPCR. Functional assays followed by IL-1 β blockade and assessment of NO production were also performed. Transfection with miR-194 mimic promoted an increase in the parasite load. There were no significant changes in T-bet, GATA3, or FoxP3 expression with miR-194 enhancement or inhibition. Inhibition of miR-194 increased IL-1 β and NO in PBMCs from diseased dogs, and blockade of IL-1 β following miR-194 inhibition decreased NO levels. These findings suggest that miR-194 is upregulated in PBMCs from dogs with leishmaniasis and increases parasite load, possibly decreasing NO production via IL-1 β . These results contribute to our understanding of the mechanisms of immune evasion by the parasite and the identification of possible therapeutic targets.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Dogs. MicroRNA. Genes. Immunology

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral	13
1.2 Leishmaniose Canina	14
1.3 Resposta imunológica na Leishmaniose Canina	15
1.4 MicroRNA (miRs)	18
1.5 MicroRNA (miRs) na Leishmaniose Canina	21
2 CAPÍTULO 1 - MicroRNA-194 regulates parasitic load and IL-1 β -dependent nitric oxide production in the peripheral blood mononuclear cells of dogs with leishmaniasis	25
2.1 Resumo	26
2.2 Abstract	26
2.3 Author summary	27
2.4 Introduction	28
2.5 Methods	30
2.5.1 Canine screening and sample collection	30
2.5.2 PBMC isolation	31
2.5.3 DNA extraction and determination of <i>Leishmania</i> species in dogs with leishmaniasis	31
2.5.4 PBMC miRNA extraction and miR-194 expression	31
2.5.5 Transfection with miR-194 mimic and inhibitor in PBMCs	32
2.5.6 DNA extraction and <i>Leishmania infantum</i> parasitic load quantification	32
2.5.7 Quantification of parasite load, NO, iNOS, T-bet, GATA3, and FoxP3 using flow cytometry	33
2.5.8 Quantification of cytokines IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , and TGF- β by capture ELISA	34
2.5.9 Relative gene expression of TRAF6	34
2.5.10 Functional assay with IL-1 β blockade after transfection with miR-194 inhibitor in PBMCs from dogs with leishmaniasis	35
2.5.11 Statistical analysis	36
2.6 Results	36
2.6.1 All dogs with leishmaniasis were infected with <i>Leishmania infantum</i>	36
2.6.2 Clinical and laboratory findings	36
2.6.3 miR-194 is increased in PBMCs from dogs with leishmaniasis	37

2.6.4 Mimic miR-194 increased parasite load in PBMCs from dogs with leishmaniasis	37
2.6.5 Inhibitor miR-194 increased NO levels in PBMCs from dogs with leishmaniasis	38
2.6.6 miR-194 did not regulate the expression of transcription factors T-bet, GATA3, or FoxP3 in PBMCs from dogs	39
2.6.7 miR-194 Inhibitor increased production of IL-1 β in the supernatants of PBMC culture from dogs with leishmaniasis but did not alter the production of IL-6, IL-4, TNF- α , IFN- γ , TGF- β , or IL -10	41
2.6.8 miR-194 did not regulate expression of the TRAF6 in dog PBMC	44
2.6.9 IL-1 β blockade decreases NO after miR-194 inhibition in PBMCs from dogs with leishmaniasis	45
2.7 Discussion	46
2.8 Acknowledgments	50
2.9 References	50
2.10 Supporting information	59
APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	69
ANEXO A NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASE	84

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Epidemiologia da Leishmaniose Visceral

Leishmanioses são doenças zoonóticas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidos para animais e humanos por meio de insetos da família *Psychodidae* (1). As diferentes espécies do protozoário causam um conjunto de síndromes clínicas em humanos que podem comprometer a pele (Leishmaniose Cutânea - LC), membranas mucosas (Leishmaniose Mucocutânea - LM) e vísceras (Leishmaniose Visceral - LV) (2). A LV é a forma mais severa das leishmanioses e causada pelas espécies *Leishmania (L.) donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) no novo mundo (2). A LV é caracterizada por episódios irregulares de febre, anemia, aumento do baço e fígado (1,2), com uma letalidade de mais de 90% dos casos em que os pacientes não são submetidos a nenhum tipo de tratamento (1–3).

A ocorrência da LV é amplamente distribuída no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que de 50.000 a 90.000 novos casos da infecção ocorram anualmente em todo mundo, sendo que apenas de 25 a 45% dos casos são reportados a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2). Nas américas, uma média de 3.500 casos de LV são reportados anualmente com uma taxa de mortalidade de 7% (1). Ainda nas américas, a LV é reportada em 13 países (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Mexico, Nicaragua, Paraguai, Uruguai e Venezuela) (1).

O Brasil é o principal país endêmico para LV nas américas (2) e concentra 90% dos casos registrados na região (4). Dados do Ministério da Saúde do Brasil demonstram que em 2021 foram registrados 1683 casos de LV no país com 165 óbitos, sendo a maioria dos casos registrados na região Nordeste (46%), seguido das regiões Norte (16%), Sudeste (14%), Centro Oeste (5%) e Sul (1%) (4). Dos casos de LV registrados no Brasil no ano de 2021, 61 foram no estado de São Paulo, com 10 mortes (4). No estado de São Paulo, a doença foi notificada pela primeira vez no município de Araçatuba no ano de 1999, quando foi confirmado o primeiro caso canino autóctone no município (5) e desde de então, entre 1999 a 2019 foram 8.553 casos registrado no estado com 266 óbitos (6).

A transmissão de *L. infantum* no Brasil ocorre pela picada da fêmea do flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis* (7), embora outras espécies de flebotomíneo já tenham sido identificadas como vetores do protozoário (8). Mesmo com a dispersão dos flebotomíneos para quase todas as regiões do país, a ausência do vetor em áreas onde existem casos de LV sugere a existência de outros modos de transmissão do parasita (9). Outros artrópodes que se alimentam de sangue, como carrapatos (10,11) ou pulgas (10) também já foram descritos como possíveis transmissores de *L. Infantum*, entretanto, não há uma conclusão sobre o papel desses ectoparasitas no ciclo transmissão da doença (12). Já foi descrito também a ocorrência de transmissão venérea (13), vertical (14–16) e por transfusão sanguínea (17).

Os cães domésticos (*Canis familiaris*) são os principais reservatórios de *L. infantum* em áreas urbanas (18) e em áreas endêmicas há uma correlação entre a prevalência de cães soropositivos e o número de casos da doença em humanos (19,20). Essa relação entre cães soropositivos e LV humana acontece devido à proximidade dos cães com os humanos, pelo alto parasitismo na pele de cães infectados, principalmente em regiões ulceradas (21), pela alta prevalência de cães infectados em áreas endêmicas e poucos apresentarem a forma sintomática da doença (22) e pela dificuldade de diagnóstico no grande número de cães doentes assintomáticos (23). Portanto, devido à importância dos cães na manutenção do ciclo epidemiológico da LV, sugere-se que o controle da infecção e/ou doença no cão pode contribuir para o controle efetivo da doença no homem (24).

1.2 Leishmaniose Canina

A infecção canina por *L. infantum*, tem início após a inoculação de formas promastigotas metacíclicas na pele durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo. Embora não existam evidências diretas de todas as etapas do processo de instalação da doença no cão, no homem ou mesmo no modelo murino, o cenário geral parece ser o descrito a seguir. As promastigotas de *L. infantum* são fagocitadas por células fagocíticas residentes ou recrutadas como macrófagos e neutrófilos (25). No interior das células fagocíticas, as promastigotas (que exibem flagelo aparente) se aderem aos fagossomos e transformam-se em formas amastigotas (que possuem flagelo restrito à bolsa flagelar) (26). Neutrófilos contendo leishmania podem sofrer

apoptose e serem fagocitados por macrófagos, transferindo assim a sua carga parasitária. Os macrófagos produzem óxido nítrico (NO) para eliminação do parasita (27), no entanto, nesse primeiro momento a ativação de mecanismos leishmanicidas dos macrófagos não é suficiente para evitar a propagação do parasita (28).

Sem uma contenção apropriada, as amastigotas se multiplicam por divisão binária dentro dos macrófagos e são transportadas para o linfonodo drenante e a partir daí, no interior dos macrófagos, disseminam-se para diversos órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (29) como o baço, fígado e a medula óssea (25). Nesses órgãos, as leishmanias continuam a proliferar no interior dos macrófagos até ocasionar a ruptura da célula e dessa forma infectar outros macrófagos (30), processo que induz a uma inflamação crônica, frequentemente granulomatosa, que promove alterações funcionais e estruturais nos órgãos afetados (31,32) e dessa maneira, causar a doença.

A Leishmaniose Canina (CanL em inglês), termo utilizado devido a infecção por *L. infantum* nos cães poder afetar tanto a pele quanto as vísceras (22) é manifestada por lesões e sintomas característicos. Os sinais clínicos mais frequentes da CanL são lesões na pele, linfadenopatia, onicogribose, perda de peso, caquexia, febre e doença renal (33). Alterações laboratoriais como anemia não regenerativa, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, trombocitopenia, proteinúria, azotemia renal e aumento de enzimas hepáticas também são encontradas nos cães doentes (34). O número e a intensidade dos sinais clínicos são determinados por um conjunto de fatores que envolvem a cepa do protozoário, a genética e principalmente o estado imunológico do hospedeiro (23). Desta maneira, alguns cães controlam a infecção por um período de tempo sem o aparecimento de sinais (estado subclínico ou assintomático) (22,35), enquanto outros apresentam evolução aguda ou progressiva da doença (estado clínico ou sintomático) (23).

1.3 Resposta imunológica na Leishmaniose Canina

A resposta imunológica desenvolvida pelo cão frente à infecção por *L. infantum* é complexa e determinante para a resistência ou susceptibilidade a doença (27,36). A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra o protozoário. Após a inoculação na derme pela picada do flebotômíneo, a maioria das promastigotas de leishmania

são mortas pela ação do sistema complemento (27), embora a saliva do flebotomíneo possa inibir a ação do complemento e consequentemente induzir a falha da resposta imune já no momento da inoculação (37). Moléculas das leishmanias sobreviventes à ação do complemento são detectadas por receptores da imunidade inata presentes em células residentes como células de Langerhan, dendríticas, natural killer e células recrutadas como monócito/macrófagos e neutrófilos (26,38). Entre os receptores imunes inatos estão os receptores Toll-like (TLRs), que utilizam proteínas adaptadoras como o MyD88 para desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-12, bem como moléculas coestimuladoras B7-1/B7-2 e CD40 em macrófagos que se ligam respectivamente com o CD28 e CD40L de células T e ativam momentaneamente mecanismos leishmanicidas dos macrófagos infectados e induzem a resposta imune adaptativa (39,40).

Outro mecanismo da imunidade inata envolvido nas infecções por *Leishmania* spp. é a ativação dos inflamossomas (38,41). Os inflamossomas podem ser ativados por duas vias diferentes: a partir da ativação do receptor NODlike (NLR) NLRP3, um receptor intracelular que reconhece PAMPS (Padrões Moleculares Associados aos Patógenos) do parasita e também pela ativação de receptores da família de TNF e IL-1 β (38). A ativação de NLRP3 leva a ativação da caspase-1 e clivagem da pré-IL-1 β em IL-1 β ativa, citocina importante na resposta imune inata contra o parasito (41). Além disso, parasitos do gênero *Leishmania* podem ativar também a via não-canônica do inflamassoma por meio da caspase-11 (42). A ativação do inflamassoma aumenta a ativação de mecanismos leishmanicidas contra espécies de *Leishmania*, entre elas a *L. infantum* (41,43).

Apesar de todos os mecanismos da resposta inata para o controle do parasita, a ativação da resposta imune adaptativa é essencial para o controle da infecção. Como demonstrado na figura 1, tanto a resposta imune celular (Th1) quanto a resposta imune humoral (Th2) são ativadas na CanL, e a progressão da doença depende do balanço entre as respostas Th1 e Th2 (24,35,36,44). O recrutamento eficiente de células apresentadoras de antígenos (APCs) na resposta inata pode resultar em uma ativação bem sucedida da resposta imune celular (Th1), essencial para resistência à *L. infantum* nos cães infectados e predominante em cães em estados subclínicos e/ou assintomático da infecção (36,44) (Figura 1). Durante resposta Th1, células apresentadoras de antígeno, incluindo células dendríticas, capturam leishmanias, ou

fragmentos delas na derme e migram para região T do linfonodo de drenagem (25,45). Durante essa migração, as células dendríticas amadurecem e desenvolvem a capacidade de expressar moléculas coestimulatórias e produzir IL-12 (46). Já no linfonodo, após o processamento do antígeno, as células dendríticas que expressam peptídeos de leishmania acoplados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC classe I e classe II), expressam moléculas coestimulatórias membros da família B7 (CD80 e CD86) (47) e produzem IL-12 (48), são capazes de estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos T naíve em linfócitos T efetores Th1 (T CD4+ e T CD8+). As células T CD4+ Th1 migram para os tecidos afetados pela infecção e produzem IFN- γ e TNF- α e essas citocinas ativam mecanismos leishmanicidas, incluindo a produção de óxido nítrico, e espécies reativas de oxigênio (H₂O₂ e íon superóxido) nos macrófagos infectados pelo protozoário (48–50). Além disso, linfócitos T CD8+ também podem produzir IFN- γ ou exercer atividade citotóxica sobre células infectadas pela leishmania (51).

No entanto, a susceptibilidade à infecção por *L. infantum* nos cães e progressão da CanL é associada a uma acentuada resposta imune humoral (Th2) (52) com produção das citocinas IL-4 e IL-10 (53–55) que inibem a resposta imune celular Th1 específica ao parasita promovendo assim o aumento da carga parasitária (24) (Figura 1). As células B, que na doença subclínica produzem baixos níveis de anticorpos específicos contra *L. infantum* começam a produzir maiores níveis de anticorpos não específicos ao parasita, levando ao quadro de hipergamaglobulinemia (56). A produção exacerbada de anticorpos não específicos ao parasito leva a formação de imunocomplexos (56,57) que se depositam em órgãos como os rins, podendo levar à insuficiência renal crônica em estágios mais avançados da doença no cão (58). Além disso, os imunocomplexos induzem a produção de IL-10 por macrófagos diminuindo assim a ativação de mecanismos leishmanicidas (30,56,57). Recentemente têm-se estudado o desenvolvimento e o papel das células B reguladoras na progressão da doença. As células B regulatórias são capazes de produzir IL-10 em doenças autoimune e doenças crônicas, inclusive na CanL (59,60) onde a proporção de células B que produz IL-10 é maior em cães com leishmaniose e sintomáticos, sugerindo um papel importante dessas células na progressão da doença (60).

Portanto, conhecer os mecanismos moleculares pelos quais o parasita regula as respostas imunológicas, de maneira favorável à sua sobrevivência, é fundamental para entender a progressão da doença e também identificar possíveis alvos terapêuticos para a CanL.

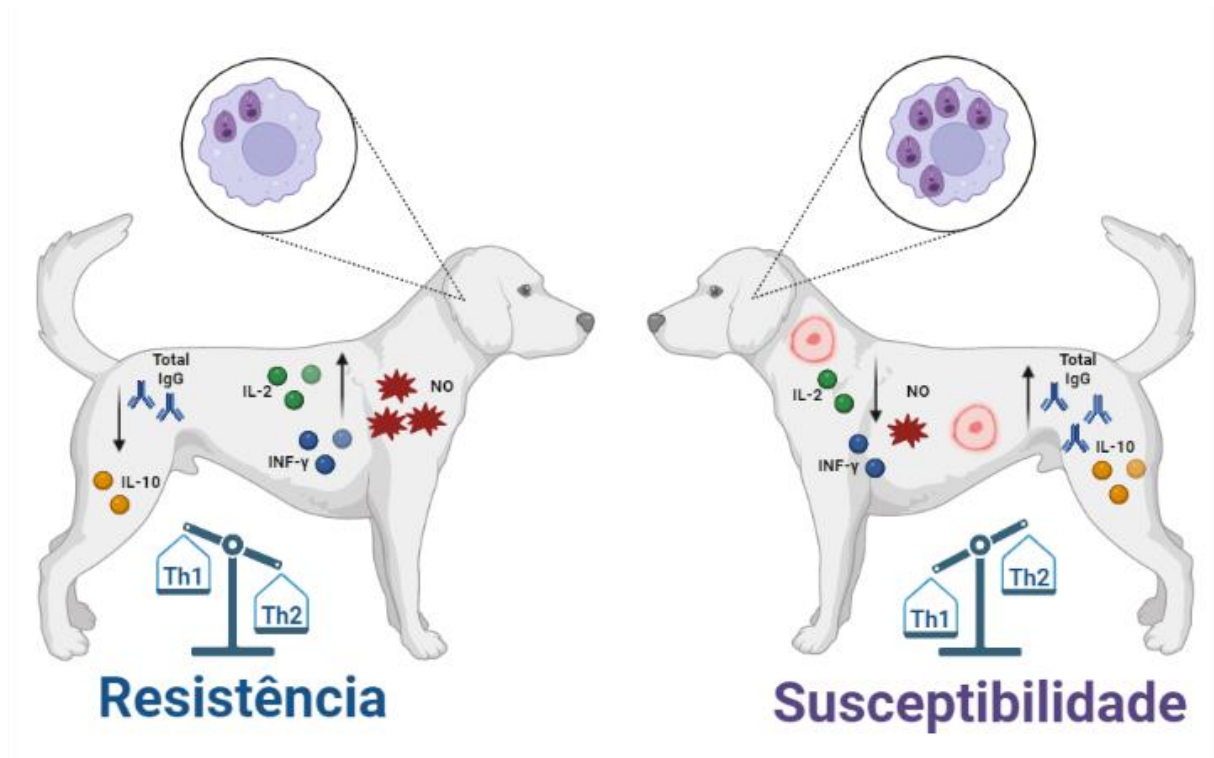


Figura 1. Na leishmaniose canina tanto a resposta imune celular Th1 quanto a resposta imune humoral Th2 são ativadas e o balanço entre as duas respostas determina a resistência ou progressão da doença. Cães resistentes à infecção e assintomáticos desenvolvem uma eficiente resposta imune celular (Th1) em detrimento a resposta imune humoral (Th2) com produção das citocinas IL-2, INF-γ e ativação de NO nas células infectadas para o controle da proliferação do parasita. Em contrapartida, cães suscetíveis e sintomáticos desenvolvem uma exacerbada resposta Th2 em detrimento a resposta Th1, com alta produção de anticorpos e produção da citocina IL-10 que inibe a ativação de mecanismos leishmanicidas e promove a replicação do parasita. (Figura criada pelo aplicativo BioRender, baseadas em 24,35,36,44).

1.4 MicroRNA (miRs)

Existem muitas evidências da função dos microRNAs (miRNAs) na regulação da expressão gênica e da tradução de proteínas que são fundamentais para o

desenvolvimento, função e diferenciação de vários tipos celulares do sistema imunológico (61,62).

MicroRNAs são RNAs pequenos, não codificadores, envolvidos na regulação do RNA mensageiro (mRNA) em nível pós-transcricional, muitas vezes atuando como inibidores da tradução e consequentemente, regulando a atividade celular. Os miRNAs se ligam ao 3'UTR do RNA mensageiro (mRNA) alvo, resultando na maioria dos casos, na inibição da tradução ou degradação direcionada do próprio mRNA (63).

Os genes que codificam os miRNAs estão localizados em várias partes do genoma como regiões intergênicas, introns e exons (64). A biogênese dos miRNAs tem início com a transcrição dos miRNAs, principalmente pela RNA polimerase II em um RNA de fita dupla, formando uma estrutura de stem-loop, um tronco (stem) com terminal em forma de alça (loop), denominado de primary microRNA (pri-miRNA) (65). Após a transcrição do pri-miRNA, ele é clivado por um complexo formado principalmente por pelas enzimas Drosha e DGCR8, em precursor microRNA (pre-miRNA), que possui o formato de "grampo de cabelo" (66).

Após a maturação do pre-miRNA, ele é transportado para o citoplasma das células pela formação de um complexo com a proteína Exportin-5 (66). No citoplasma, o "grampo de cabelo" do pre-miRNA é incorporado ao complexo proteico de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde é processado pela ribonuclease tipo III Dicer em um duplex miRNA/miRNA* (67). Em seguida, uma dessas fitas formadas, denominada "fita-guia", desempenhará suas funções juntamente com o complexo RISC (68). Um dos principais componentes do complexo RISC são as proteínas Argonautas (AGO), principalmente AGO2 (68,69). Para melhor entendimento, toda a biogênese de miRNAs é demonstrada na figura 2.

Desde a descoberta dos miRNAs, eles sempre foram relacionados negativamente com seus mRNA-alvo onde o aumento da expressão de um miRNA específico está relacionado com a diminuição na quantidade de proteína traduzida a partir do mRNA-alvo desse miRNA (70). No entanto, funções opostas dos miRNAs como promoção da transcrição e aumento da eficiência da tradução também já foram demonstradas em situações específicas (71,72). miRNAs como let-7i que se liga especificamente com o motifs TATA-box do gene da IL-2 e eleva a produção de mRNA e proteína de IL-2 em linfócitos T CD4(+) (72). Já o miR-396-3 aumenta a tradução de TNF- α por interagir com elementos ricos em AU (71).

A expressão desregulada de miRNAs ocorre em vários tipos de doenças e muitas vezes é associada à progressão e agravamento dessas doenças como na doença de Alzheimer (73), artrite reumatoide (74), doenças renais (75), doenças cardiovasculares (76), infecções virais (77–79) e em vários tipos de cânceres (80). Sendo assim, vários estudos são conduzidos na tentativa de identificar a expressão diferencial de miRNAs em várias doenças e dessa maneira utiliza-los como meios de diagnóstico, prognósticos e possíveis alvos terapêuticos.

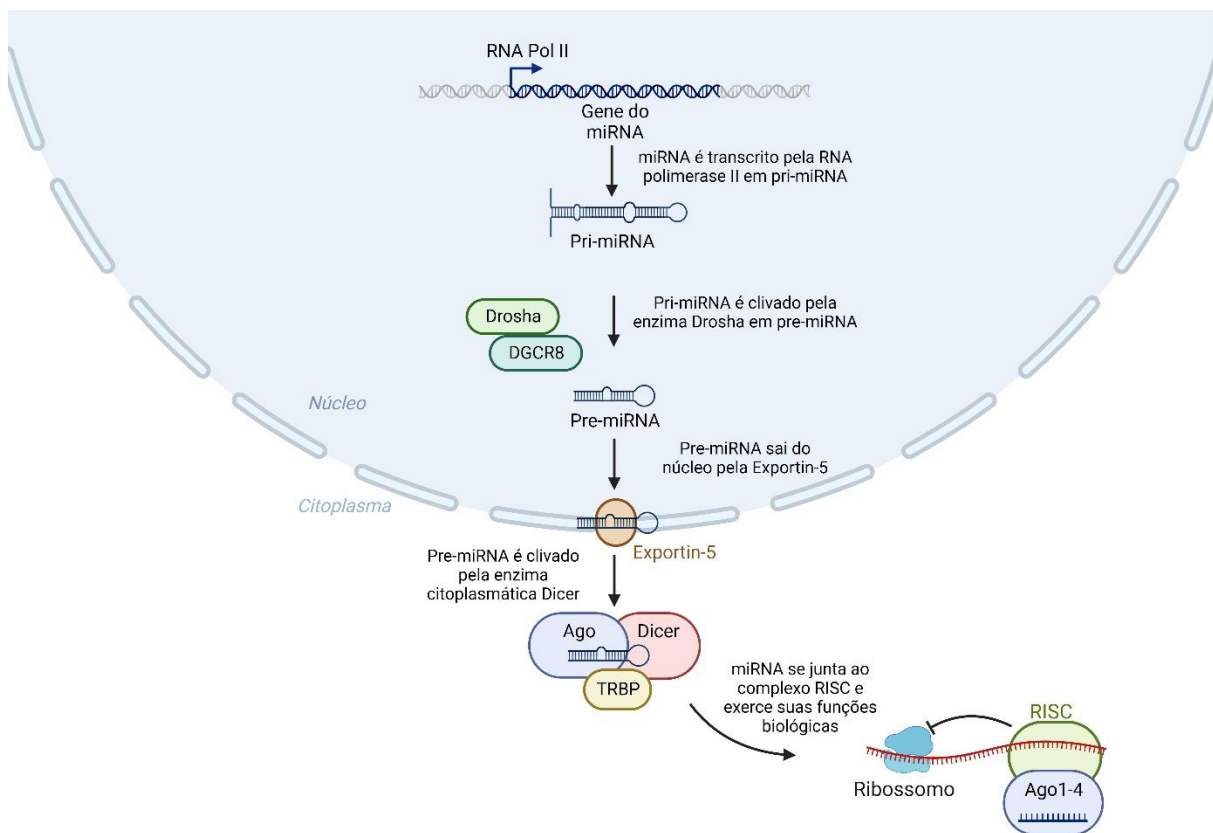


Figura 2. Via canônica da biogênese dos miRNAs. A RNA polimerase II (RNA Pol II) sintetiza o primary miRNA (pri-miRNA) a partir do seu gene. O pri-miRNA é então clivado pelo complexo Drosha/DGCR8, formando o precursor-miRNA (pre-miRNA). O pre-miRNA é então exportado para fora do núcleo pela proteína Exportin-5. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pela ribonuclease Dicer, juntamente com proteínas acessórias, em duas fita-simples de miRNA (duplex miRNA/miRNA*). Uma dessas fitas simples, chamada de "fita-guia" se une ao complexo RISC, onde exerce suas funções biológicas (figura retirada da dissertação de mestrado "MIR-150 regula a carga parasitária de *Leishmania infantum* e os níveis de GZMB nas PBMCS de cães com leishmaniose visceral canina". Soares et al., 2023).

1.5 MicroRNA (miRs) na Leishmaniose Canina

Nas infecções por *Leishmania spp.*, vários estudos demonstram os miRNAs como reguladores chave das respostas celulares em células murinas, humanas e caninas (81–87), com papel importante na regulação da resposta imune celular (Th1) (85,88), sugerindo portanto, os miRNAs como alvo terapêutico na leishmaniose (84,88,89).

A expressão de um repertório de diferentes miRNAs já foi descrita pelo nosso grupo de pesquisa no baço e sangue de cães naturalmente infectados por *L. infantum* quando comparado com cães saudáveis (90,91). Análises do microarranjo e validação por PCR demonstraram aumento da expressão dos miR-21, miR-148a, miR-7, miR-615 e diminuição dos miR-125a, miR-125b e miR-150 em leucócitos esplênicos (91). Já em células mononucleares do sangue periférico (CMSP), aumento na expressão dos miRNAs miR-21, miR-192, miR-194, miR-424, miR-371, miR-451 e miR-503 e menor expressão dos miRNAs miR-150 e miR-574 foi observado (90). Os dados do microarranjo foram submetidos à análise *in silico* e assim foi possível identificar possíveis vias e alvos dos miRNAs diferencialmente expressos em CMSP e validados pelo programa Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN®). Os miRNAs diferencialmente expressos nas CMSP apresentaram alvos em diversas vias canônicas relacionados a resposta imune, como por exemplo crosstalk entre células dendríticas e células NK, via STAT3, papel antiproliferativo do TOB na sinalização de células T, sinalização de PTEN e receptor de morte celular (90).

Dentre os miRNAs que tem a sua expressão alterada em CMSP de cães com leishmaniose, está o miR-194. Na análise da expressão do miR-194 por PCR em CMSP dos cães naturalmente infectados com *L. infantum*, o miR-194 mostrou-se 3,08 vezes mais expresso em CMSP de cães doentes quando comparado aos dos cães não infectados e apresentou correlação positiva com a carga parasitária nas CMSP (90). O miR-194 é conservado entre as espécies, inclusive entre cães e humanos, sendo denominado na espécie humana de miR-194-5P (92). Em cães, o miR-194 está localizado no cromossomo 38 (92).

O miR-194 está envolvido na regulação dos transcritos de genes em várias vias canônicas e dentro dessas vias, regula transcritos de genes relacionados com a resposta imunológica. Dentre eles, destacamos os transcritos de MAPK1, que aparece

regulado pelo miR-194 em 9 vias diferentes, seguidos de SOCS2, 2 vias e TRAF6 em 2 vias (90).

O gene MAPK1 codifica a proteína quinase 2 regulada por sinais extracelulares (ERK2), um membro da família das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP Quinases). A ERK2, às vezes referida como p42-MAPK, juntamente com a outra isoforma ERK1 ou p44-MAPK participam da via ERK MAPKS (93). A via ERK MAPKS é ativada em resposta a fatores de crescimento, hormônios e estímulos pró-inflamatórios (94,95). O sinal mitógeno é transmitido do citoplasma para o núcleo por meio da fosforilação de várias quinases que participam da via, o que resulta na translocação nuclear da ERK1 e ERK2 e a ativação de uma série de fatores de transcrição (93,96). As funções e regulação da via ERK MAPKS estão envolvidas em diferentes fases e componentes do sistema imunológico (97).

Em camundongos deficientes de ERK2, foi observado aumento na expressão de GATA3 e FoxP3 e diminuição na expressão de T-bet em células T do baço (98). O bloqueio de ERK1/2 em macrófagos peritoneais e da medula óssea de camundongos estimulados com LPS, diminuiu mRNA e proteína TNF- α (99). A regulação negativa de MAPK1 do parasita tem sido associada a resistência ao tratamento com Antimoniais na LV humana causada por *L. donovani* (100,101). Já em macrófagos de camundongos deficientes de ERK1/2 e infectados *in vitro* por *L. amazonensis*, o parasita diminui a fagocitose e a produção de TNF- α e aumenta a produção de IL-10 (102). Esses achados demonstram que a via ERK MAPK1 pode regular vários mecanismos importantes da resposta imune do cão frente a infecção por *L. infantum*, entretanto, o papel de MAPK1 e sua regulação pelo miR-194 na CanL ainda não foram demonstrados.

O gene SOCS2 codifica a proteína supressora da sinalização de citocinas 2 (SOCS2). Essa proteína é um membro da família SOCS e sua principal atividade é atenuar a transdução de sinal desencadeada por citocinas (103). A SOCS2 regula a sinalização de citocinas dependentes das vias de sinalização JAK/ STAT em células da imunidade inata e adaptativa, regulando a produção de vários mediadores como TNF- α e IL-12 (104,105) e a diferenciação de células T (106). O SOCS2 é alvo direto do miR-194, e regula negativamente a expressão de SOCS2 (107).

Nenhuma alteração na carga parasitária e produção de citocinas foi observada em células do linfonodo de camundongos Knockout para SOCS2 e infectado por *L.*

major (108). No entanto, em células T CD4⁺ de camundongos knockout para SOCS2, o aumento de mRNA e proteína IL-4 e IL-10 e de mRNA de GATA3 foi observado, favorecendo a diferenciação e a produção de citocinas Th2 (106). Em contraste, a redução da expressão de mRNA de IFN- γ e TNF- α foi observada no baço e coração de camundongos knockout para SOCS2 infectados por *Trypanossoma cruzi* (109). Juntos esses dados sugerem que a inibição de SOCS2 pode estimular a resposta imune Th2, tipo de resposta que é associada a progressão da leishmaniose em cães, no entanto o papel do SOCS2 e sua regulação por miR-194 ainda não foram estudados na CanL.

O gene TRAF6 codifica a proteína fator 6 associada ao receptor de TNF (TRAF6). Essa proteína é um membro de família TRAF e está envolvida na transdução de sinal de membros da super família dos receptores de TNF e na via de sinalização TLR, além das vias de sinalização via receptor de osteoprotegerina OPGL e CD40 (110,111). Após a estimulação dessas vias, o TRAF6 interage com várias proteínas quinases, resultando na ativação do NF- κ B e na produção de citocinas pró-inflamatórias (112,113). O TRAF6 é alvo do miR-194 e a super expressão do miR-194 diretamente diminui a expressão de TRAF6 e, conseqüentemente, diminuiu o mRNA de TNF- α , IL-1, IL-6 em células de núcleo pulposo de discos intervertebrais de camundongos (114) e os níveis de TNF- α e TGF- β em monócitos humanos de linhagem (115).

Além da regulação de citocinas pró-inflamatórias por TRAF6 e baixa expressão de iNOS também foi observada em macrófagos de camundongos knockout para TRAF6 em resposta a IL-1 (110). Em modelos murinos de infecção por *L. donovani*, o parasita inibe a ligação IRAK-1/TRAF6 prejudicando a sinalização da via TLR em macrófagos (116), e redução da morte de leishmania foi observado após o bloqueio de TRAF6 (117). Esses estudos sugerem um papel importante de TRAF6 na regulação da resposta pró-inflamatória e ativação de mecanismos leishmanicidas em células infectadas, entretanto, se os mesmos mecanismos são regulados por TRAF6 na CanL, assim como a regulação de TRAF6 pelo miR-194 ainda precisam ser elucidados na doença em cães.

Dado o envolvimento do miR-194 em diferentes componentes da resposta imunológica, como diferenciação de células T, produção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e imunorreguladoras, e a ativação de mecanismos

leishmanicidas, seria possível o miR-194 regular positivamente a carga parasitária em CMSP de cães com leishmaniose. Dessa maneira, esse estudo teve como objetivo elucidar por quais mecanismos o miR-194 pode aumentar a carga parasitária no sangue de cães doentes. Portanto, esse estudo avaliou o papel regulatório do miR-194 na expressão de fatores de transcrição T-bet, GATA3 e FoxP3, na produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ , anti-inflamatória IL-4 e imunorreguladoras IL-10 e TGF- β , a ativação de mecanismos leishmanicidas iNOS e NO e a expressão de TRAF6 em CMSP, e posteriormente a correlação com a carga parasitária, visando identificar mecanismos moleculares de evasão da resposta imune do parasita, assim como possíveis alvos terapêuticos para o tratamento da CanL.

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

1. PAN AMERICAN HEALTHY ORGANIZATION. **Visceral Leishmaniasis**. Geneva, [2023]. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/visceral-leishmaniasis>. Acesso em: 2 fev. 2023.
2. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Washington, DC, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 19 dez. 2019.
3. MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>. Acesso em: 2 fev. 2023.
5. FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZZOTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba–São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.
6. SÃO PAULO. Secretária de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN. **Leishmaniose Visceral**. São Paulo, [2022]. Disponível em: <https://saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/doenca>. Acesso em: 2 fev. 2023.
7. ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. p. 706-717.
8. PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum* chagasi in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 107, n. 1, p. 66-69, 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X0800106X>. Acesso em: 2 dez. 2022.
9. DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, London, v. 2, article S1, 8 p., 2009. Suppl. 1. Disponível em: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>. Acesso em: 2 dez. 2022.
10. OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: caution is needed. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 168, n. 1-2, p. 173-174, fev. 2010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709006943>. Acesso em: 3 dez. 2022.

11. DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of Leishmania parasites. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 27, n. 4, p. 155-159, abr. 2011. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492210002552>. Acesso em: 3 dez. 2022.
12. OLIVEIRA, V. V. G.; ALVES, L. C.; SILVA JUNIOR, V. A. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 9, p. 1622-1628, jun. 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782015000901622&lng=en&tlng=en. Acesso em: 4 dez. 2022.
13. SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, n. 1-2, p. 55-59, mar. 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401708006031>. Acesso em: 2 dez. 2022.
14. BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A. Transplacental transmission of Leishmania infantum as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 4, artigo e1019, 6 p., abr. 2011.. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0001019>. Acesso em: 4 dez. 2022.
15. PANGRAZIO, K. K.; COSTA, E. A.; AMARILLA, S. P.; CINO, A. G.; SILVA, T. M. A.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, L. F.; DENGUES, E. G.; RUIZ DIAS, A. A.; SANTOS, R. L. Tissue distribution of Leishmania chagasi and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 327-331, nov. 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709004129>. Acesso em: 5 dez. 2022.
16. ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. Non-sand fly transmission of a north american isolate of leishmania infantum in experimentally infected balb/c mice. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 91, n. 5, p. 1113-1115, out. 2005. Disponível em: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1645/GE-586R.1>. Acesso em: 5 dez. 2022.
17. OWENS, S. D.; OAKLEY, D. A.; MARRYOTT, K.; HATCHETT, W.; WALTON, R.; NOLAN, T. J.; NEWTON, A.; STEURER, F.; SCHANTZ, P.; GIGER, U.. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, out. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700704>. Acesso em: 2 dez. 2022.
18. MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 18, n. 9, p. 399-405, set. 2002.
19. TEIXEIRA-NETO, R. G.; SILVA, E. S.; NASCIMENTO, R. A.; BELO, V. S.; OLIVEIRA, C. L.; PINHEIRO, L. C.; GONTIJO, C. M. F. Canine visceral

leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites & Vectors**, London, v. 7, n. 1, p. 485, dez. 2014. Disponível em:

<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-014-0485-7>.

Acesso em: 3 dez. 2022.

20. COSTA, D. N. C. C.; BERMUDI, P. M. M. B.; RODAS, L. A. C.; NUNES, C. M.; HIRAMOTO, R. M.; TOLEZANO, J. E.; CIPRIANO, R. S.; CARDOSO, G. C. D.; CODEÇO, C. T.; CHIARAVOLLOTTI-NETO, F. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 52, p. 92, nov. 2018. Disponível em:

<http://www.revistas.usp.br/rsp/article/view/151810>. Acesso em: 3 dez. 2022.

21. SILVA, F. M. F.; SANTOS, E. M. S.; TORRES, S. M.; YAMASAK, E. M.; RAMOS, R. A. N.; ALVES, L. C. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 127-130, mar. 2016. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612016000100127&lng=en&tling=en)

[29612016000100127&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612016000100127&lng=en&tling=en). Acesso em: 5 dez. 2022.

22. BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, Cambridge, v. 24, n. 7, p. 324-330, jul. 2008. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492208001323>. Acesso em: 5 dez. 2022.

23. RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; SILVA, M. E.; SANTOS, C. C. P.; FRÉZARD, F. J. G.; SILVA, S. M. Canine Leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control. **Biomed Research International**, New York, v. 2018, artigo 3296893, 12 p., 2018. Disponível em:

<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3296893/>. Acesso em: 10 dez. 2022.

24. ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, n. 4, p. 1-88, 2004.

25. THALHOFER, C. J.; CHEN, Y.; SUDAN, B.; LOVE-HOMAN, L.; WILSON, M. E. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan leishmania infantum chagasi. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 79, n. 1, p. 108-117, 2011.

26. RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 7, p. 292-297, 2000.

27. PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to Leishmania infantum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 163, n. 3-4, p. 94-102, fev. 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165242714002682>. Acesso em: 6 dez. 2022.

28. HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, Cambridge, v. 144, n. 1, p. 95-115, jan. 2017. Disponível em: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S003118201600055X/type/journal_article. Acesso em: 3 dez. 2022.
29. LASSER, A. The mononuclear phagocytic system: a review. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 14, n. 2, p. 108-126, fev. 1983. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6339357>. Acesso em: 5 dez. 2022.
30. BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 121-134, jan. 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504340>. Acesso em: 4 dez. 2023.
31. SANTANA, C. C.; VASSALLO, J.; FREITAS, L. A. R.; OLIVEIRA, G. G. S.; PONTES-DE-CARVALHO, L. C.; DOS-SANTOS, W. L. C. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 30, n. 10, p. 515-524, 2008.
32. KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 51, n. 2, p. 527-538, mar. 2014.
33. 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.
34. SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, n. 1, artigo 86, 16 p., 2011. Disponível em: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-86>. Acesso em: 6 dez. 2022.
35. SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 88, n. 1-2, p. 21-30, set. 2002.
36. BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 329-337, jul. 2006.
37. MENDES-SOUSA, A. F.; NASCIMENTO, A. A. S.; QUEIROZ, D. C.; VALE, V. F.; FUJIWARA, R. T.; ARAÚJO, R. N.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. Different host complement systems and their interactions with saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* Promastigotes. **PLoS One**, San

Francisco, v. 8, n. 11, artigo e79787, 13 p., nov. 2013. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0079787>. Acesso em: 4 dez. 2022.

38. ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, Oxford, v. 265, n. 1, p. 156-171, maio 2015. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12291>. Acesso em: 2 dez. 2022.

39. BECKER, I.; SALAIZA, N.; AGUIRRE, M.; DELGADO, J.; CARRILLO-CARRASCO, N.; KOBEH, L. G.; RUIZ, A.; CERVANTES, R.; PÉREZ TORRES, A.; CABRERA, N.; GONZÁLEZ, A.; MALDONADO, C.; ISIBASI, A. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p. 65-74, ago. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12946842>. Acesso em: 5 dez. 2022.

40. CARRADA, G.; CAÑEDA, C.; SALAIZA, N.; DELGADO, J.; RUIZ, A.; SANCHEZ, B.; GUTIÉRREZ-KOBEHG, L.; AGUIRRE, M.; BECKER, I. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 117-126, mar. 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3024.2006.00924.x>. Acesso em: 10 dez. 2022.

41. LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L. N.; MINEO, T. W. P.; GUTIERREZ, F. R. S.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FALVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, New York, v. 19, n. 7, p. 909-915, 9 jul. 2013. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nm.3221>. Acesso em: 10 dez. 2022.

42. CARVALHO, R. V. H.; ANDRADE, W. A.; LIMA-JUNIOR, D. S.; DILUCCA, M.; OLIVEIRA, C. V.; WANG, K.; NOGUEIRA, P. M.; RUGANI, J. N.; SOARES, R. P.; BEVERLEY, S. M.; SHAO, F.; ZAMBONI, D. S. *Leishmania* Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the non-canonical activation of the NLRP3 inflammasome. **Cell Reports**, Cambridge, v. 26, n. 2, p. 429-437, jan. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124718319776>. Acesso em: 2 dez. 2022.

43. LEFÈVRE, L.; LUGO-VILLARINO, G.; MEUNIER, E.; VALENTIN, A.; OLAGNIER, D.; AUTHIER, H.; DUVAL, C.; DARDENNE, C.; BERNARD, J.; LEMESRE, J. L.; AUWERX, J.; NEYROLLES, O.; PIPY, B.; COSTE, A. The C-type Lectin receptors Dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. **Immunity**, Cambridge, v. 38, n. 5, p. 1038-1049, maio 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761313001957>. Acesso em: 4 dez. 2022.

44. PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 62, n. 1, p. 229-235, jan. 1994.

45. 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**, San Francisco, v. 8, n. 2, artigo e1002536, 12 p., fev. 2012.
46. LANGENKAMP, A.; MESSI, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. **Nature Immunology**, New York, v. 1, n. 4, p. 311-316, out. 2000.
47. PINELLI, E.; RUTTEN, V. P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P. F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on Leishmania infantum-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 67, n. 1, p. 237-243, jan. 1999.
48. KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, Oxford, v. 201, p. 239-253, out. 2004.
49. MURRAY, H. W.; CARTELLI, D. M. Killing of intracellular Leishmania donovani by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 72, n. 1, p. 32-44, 1983.
50. PANARO, M. A.; FASANELLA, A.; LISI, S.; MITOLO, V.; ANDRIOLA, A.; BRANDONISIO, O. Evaluation of nitric oxide production by Leishmania Infantum-infected dog macrophages. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, London, v. 20, n. 1, p. 147-158, jan. 1998. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/08923979809034814>. Acesso em: 5 dez. 2022.
51. TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 54, n. 2, p. 139-146, jun. 2005.
52. GRADONI, L. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine Leishmania vaccine. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 100, n. 1-2, p. 87-103, set. 2001.
53. MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, abr. 1986. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article/136/7/2348/14115/Two-types-of-murine-helper-T-cell-clone-I>. Acesso em: 4 dez. 2022.
54. COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W. P.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D. D.; CHRISTIANSEN, J. A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H. M.; SVELKOU, H. F. J.; FINKELMAN, F. D.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. The role of helper T Cell products in mouse B Cell differentiation and isotype regulation. **Immunological**

Reviews, Oxford, v. 102, n. 1, p. 5-28, abr. 1988. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-065X.1988.tb00739.x>. Acesso em: 6 dez. 2022.

55. SOLANO-GALLEGU, L.; MONTSERRAT-SANGRÀ, S.; ORDEIX, L.; MARTÍNEZ-ORELLANA, P. Leishmania infantum -specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, London, v. 9, artigo 317, 10 p., 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1598-y>. Acesso em: 5 dez. 2022.

56. TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 130, p. 19-25, jun. 2020. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528818303345>. Acesso em: 5 dez. 2022.

57. MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M. B.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 201, n. 5, p. 747-754, mar. 2005. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/201/5/747/40211/A-role-for-IgG-immune-complexes-during-infection>. Acesso em: 10 dez. 2022.

58. COSTA, F. A. L.; GOTO, H.; SALDANHA, L. C. B.; SILVA, S. M. M. S.; SINHORINI, I. L.; SILVA, T. C.; GUERRA, J. L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 40, n. 6, p. 677-384, nov. 2003. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1354/vp.40-6-677>. Acesso em: 3 dez. 2022.

59. WANG, R.-X.; YU, C.-R.; DAMBUZA, I. M.; MAHDI, R. M.; DOLINSKA, M. B.; SERGEEV, Y. V.; WINGFIELD, P. T.; KIM, S.-H.; EGWUAGU, C. E. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. **Nature Medicine**, New York, v. 20, n. 6, p. 633-641, 17 jun. 2014. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nm.3554>. Acesso em: 6 dez. 2022.

60. SCHAUT, R. G.; LAMB, I. M.; TOEPP, A. J.; SCOTT, B.; MENDES-AGUIAR, C. O.; COUTINHO, J. F. V.; JERONIMO, S. M. B.; WILSON, M. E.; HARTY, J. T.; WALDSCHMIDT, T. J.; PETERSEN, C. A. Regulatory IgD^{hi} B cells suppress T Cell function via IL-10 and PD-L1 during progressive visceral Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 196, n. 10, p. 4100-4109, maio 2016. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1502678>. Acesso em: 7 dez. 2022.

61. BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 281-297, jan. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744438>. Acesso em: 5 dez. 2022.

62. LIU, G.; ABRAHAM, E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v. 33, n. 2, p. 170-177, fev. 2013. Disponível em:

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/ATVBAHA.112.300068>. Acesso em: 11 dez. 2022.

63. AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, New York, v. 431, n. 7006, p. 350-355, set. 2004. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature02871>. Acesso em: 8 dez. 2022.

64. OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. **Journal of Cell Physiology**, Philadelphia, v. 222, n. 3, p. 481-768, mar. 2010. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.21993>. Acesso em: 8 dez. 2022.

65. 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. **The EMBO Journal**, Heidelberg, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, out. 2004. Disponível em: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/sj.emboj.7600385>. Acesso em: 4 dez. 2022.

66. LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S.; KIM, V. N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. **Nature**, New York, v. 425, n. 6956, p. 415-419, set. 2003. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature01957>. Acesso em: 15 dez. 2022.

67. KETTING, R. F.; FISCHER, S. E. J.; BERNSTEIN, E.; SIJEN, T.; HANNON, G. J.; PLASTERK, R. H. A. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 20, p. 2654-2659, 15 out. 2001. Disponível em: <http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.927801>. Acesso em: 14 dez. 2022.

68. KOBAYASHI, H.; TOMARI, Y. RISC assembly: coordination between small RNAs and Argonaute proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, Amsterdam, v. 1859, n. 1, p. 71-81, jan. 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939915001844>. Acesso em: 8 dez. 2022.

69. CHENDRIMADA, T. P.; GREGORY, R. I.; KUMARASWAMY, E.; NORMAN, J.; COOCH, N.; NISHIKURA, K.; SHIEKHATTAR, R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, New York, v. 436, n. 7051, p. 740-744, 22 ago. 2005. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nature03868>. Acesso em: 12 dez. 2022.

70. BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 215-233, jan. 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409000087>. Acesso em: 12 dez. 2022.

71. VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. **Science**, New York, v. 318, n. 5858, p. 1931-1934, 21 dez. 2007. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1149460>. Acesso em: 4 dez. 2022.

72. ZHANG, Y.; FAN, M.; ZHANG, X.; HUANG, F.; WU, K.; ZHANG, J.; LIU, Z.; HUANG, Z.; LUO, H.; TAO, L.; ZHANG, H. Cellular microRNAs up-regulate transcription via interaction with promoter TATA-box motifs. **RNA**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 12, p. 1878-1889, dez. 2014. Disponível em: <http://rnajournal.cshlp.org/lookup/doi/10.1261/rna.045633.114>. Acesso em: 6 dez. 2022.
73. SU, L.; LI, R.; ZHANG, Z.; LIU, J.; DU, J.; WEI, H. Identification of altered exosomal microRNAs and mRNAs in Alzheimer's disease. **Ageing Research Reviews**, Amsterdam, v. 73, artigo 101497, 14 p., jan. 2022. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1568163721002440>. Acesso em: 6 dez. 2022.
74. LIU, W.; SHENG, L.; NIE, L.; WEN, X.; MO, X. Functional interaction between long non-coding RNA and microRNA in rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Hoboken, v. 34, n. 12, artigo e23489, 6 p., dez. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.23489>. Acesso em: 1 dez. 2022.
75. MAHTAL, N.; LENOIR, O.; TINEL, C.; ANGLICHEAU, D.; THARAUX, P.-L. MicroRNAs in kidney injury and disease. **Nature Reviews Nephrology**, London, v. 18, n. 10, p. 643-662, 16 out. 2022. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41581-022-00608-6>. Acesso em: 30 nov. 2022.
76. WOJCIECHOWSKA, A.; BRANIEWSKA, A.; KOZAR-KAMIŃSKA, K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. **Advances in Clinical Experimental Medicine**, Wroclaw, v. 36, n. 5, p. 868-874, 31 ago. 2017. Disponível em: <http://www.advances.umed.wroc.pl/en/article/2017/26/5/865/>. Acesso em: 30 nov. 2022.
77. JOPLING, C. L.; YI, M.; LANCASTER, A. M.; LEMON, S. M.; SARNOW, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. **Science**, New York, v. 309, n. 5740, p. 1577-1581, 2 set. 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16141076>. Acesso em: 1 dez. 2022.
78. JOPLING, C. L.; SCHÜTZ, S.; SARNOW, P. Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. **Cell Host and Microbe**, Cambridge, v. 4, n. 1, p. 77-85, 17 jul. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18621012>. Acesso em: 29 nov. 2022.
79. SHIMAKAMI, T.; YAMANE, D.; WELSCH, C.; HENSLEY, L.; JANGRA, R. K.; LEMON, S. M. Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 86, n. 13, p. 7372-7383, jul. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22532678>. Acesso em: 3 dez. 2022.
80. SYEDA, Z. A.; LANGDEN, S. S. S.; MUNKHZUL, C.; LEE, M.; SONG, S. J. Regulatory mechanism of MicroRNA expression in cancer. **International Journal of**

Molecular Sciences, Basel, v. 21, n. 5, artigo 1723, 18 p., 3 mar. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/5/1723>. Acesso em: 28 nov. 2022.

81. LEMAIRE, J.; MKANNEZ, G.; GUERFALI, F. Z.; GUSTIN, C.; ATTIA, H.; SGHAIER, R. M.; SYSCO-CONSORTIUM; DELLAGI, K.; LAOUINI, D.; RENARD, P. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania* major infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 10, artigo e2478, 13 p., 3 out. 2013. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002478>. Acesso em: 6 dez. 2022.

82. GHOSH, J.; BOSE, M.; ROY, S.; BHATTACHARYYA, S. N. *Leishmania donovani* Targets Dicer1 to Downregulate miR-122, Lower Serum Cholesterol, and Facilitate Murine Liver Infection. **Cell Host & Microbe**, Cambridge, v. 13, n. 3, p. 277-288, mar. 2013. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312813000711>. Acesso em: 12 dez. 2022.

83. GERACI, N. S.; TAN, J. C.; MCDOWELL, M. A. Characterization of microRNA expression profiles in *Leishmania* -infected human phagocytes. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 43-51, jan. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pim.12156>. Acesso em: 13 dez. 2022.

84. SINGH, A. K.; PANDEY, R. K.; SHAHA, C.; MADHUBALA, R. MicroRNA expression profiling of *Leishmania donovani* -infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy. **Autophagy**, Philadelphia, v. 12, n. 10, p. 1817-1831, 2 out. 2016. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2016.1203500>. Acesso em: 27 nov. 2022.

85. TIWARI, N.; KUMAR, V.; GEDDA, M. R.; SINGH, A. K.; SINGH, V. K.; SINGH, S. P.; SINGH, R. K. Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection: delineation of their roles in macrophage dysfunction. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, artigo 314, 11 p., 2 mar. 2017. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00314/full>. Acesso em: 1 dez. 2022.

86. 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., 24 mar. 2022. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0265192>. Acesso em: 1 dez. 2022.

87. 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. Almeida IC, editor. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 17, n. 1, artigo e0011039, 19 p., 31 jan. 2023. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0011039>. Acesso em: 1 dez. 2022.

88. VARIKUTI, S.; NATARAJAN, G.; VOLPEDO, G.; SINGH, B.; HAMZA, O.; MESSICK, G. V.; GUERAU-DE-ARELLANO, M.; PAPENFUSS, T. L.; 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, artigo e00307-19, 11 p., ago. 2019. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/IAI.00307-19>. Acesso em: 12 dez. 2022.

89. PANDEY, R. K.; SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Differential expression of miRNA regulates T Cell differentiation and plasticity during Visceral Leishmaniasis infection. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, artigo 206, 9 p., fev. 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00206/abstract>. Acesso em: 7 dez. 2022.

90. BRAGATO, J. P.; MELO, L. M.; VENTURIN, G. L.; REBECH, G. T.; GARCIA, L. E.; LOPES, F. L.; LIMA, V. M. F. Relationship of peripheral blood mononuclear cells miRNA expression and parasitic load in canine visceral leishmaniasis. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 12, artigo e0206876, 16 p., 5 dez. 2018. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0206876>. Acesso em: 25 nov. 2022.

91. 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, 19 p., 11 dez. 2019. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0226192>. Acesso em: 25 nov. 2022.

92. KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 47, n. D1, p. D155-D162, 8 jan. 2019. Disponível em: <https://academic.oup.com/nar/article/47/D1/D155/5179337>. Acesso em: 28 nov. 2022.

93. HUANG, C.; LIU, L.-Y.; LI, Z.-F.; WANG, P.; NI, L.; SONG, L.-P.; XU, D.-H.; SONG, T.-S. Effects of small interfering RNAs targeting MAPK1 on gene expression profile in HeLa cells as revealed by microarray analysis. **Cell Biology International**, Chichester, v. 32, n. 9, p. 1081-1090, set. 2008. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.cellbi.2008.04.019>. Acesso em: 29 nov. 2022.

94. OWENS, D. M.; KEYSE, S. M. Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. **Oncogene**, Basingstoke, v. 26, n. 22, p. 3203-3213, maio 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1210412>. Acesso em: 10 dez. 2022.

95. KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian Mitogen-Activated Protein Kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 81, n. 2, p. 807-869, 1 abr. 2001. Disponível em: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.2.807>. Acesso em: 10 dez. 2022.

96. SOARES-SILVA, M.; DINIZ, F. F.; GOMES, G. N.; BAHIA, D. The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway: role in immune evasion by trypanosomatids. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, artigo 183, 9 p., fev. 2016. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00183/abstract>. Acesso em: 12 dez. 2022.
97. DONG, C.; DAVIS, R. J.; FLAVELL, R. A. MAP kinases in the immune response. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 20, n. 1, p. 55-72, abr. 2002. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.20.091301.131133>. Acesso em: 13 dez. 2022.
98. CHANG, C.-F.; D'SOUZA, W. N.; CH'EN, I. L.; PAGES, G.; POUYSSEGUR, J.; HEDRICK, S. M. Polar opposites: erk direction of CD4 T cell subsets. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 189, n. 2, p. 721-731, 15 jul. 2012. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1103015>. Acesso em: 14 dez. 2022.
99. DUMITRU, C. D.; CECI, J. D.; TSATSANIS, C.; KONTOYIANNIS, D.; STAMATAKIS, K.; LIN, J.-H.; PATRIOTIS, C.; JENKINS, N. A.; COPELAND, N. G.; KOLLIAS, G.; TSICHLIS, P. N. TNF- α induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-Dependent pathway. **Cell**, Cambridge, v. 103, n. 7, p. 1071-1083, dez. 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400002105>. Acesso em: 15 dez. 2022.
100. ASHUTOSH; GARG, M.; SUNDAR, S.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H. L.; GOYAL, N. Downregulation of Mitogen-Activated Protein Kinase 1 of Leishmania donovani field isolates is associated with antimony resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 56, n. 1, p. 518-525, jan. 2012. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.00736-11>. Acesso em: 11 dez. 2022.
101. GARG, M.; GOYAL, N. MAPK1 of Leishmania donovani modulates antimony susceptibility by downregulating P-Glycoprotein efflux pumps. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 59, n. 7, p. 3853-3863, jul. 2015. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.04816-14>. Acesso em: 16 dez. 2022.
102. OLIVEIRA, L. G.; SOUZA-TESTASICCA, M. C.; RICOTTA, T. N. Q.; VAGO, J. P.; SANTOS, L. M.; CREPALDI, F.; LIMA, K. M.; QUEIROZ-JUNIOR, C.; SOUSA, L. P.; FERNANDES, A. P. Temporary shutdown of ERK1/2 phosphorylation is associated with activation of adaptive immune cell responses and disease progression during Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 13, artigo 762080, 15 p., 25 jan. 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.762080/full>. Acesso em: 14 dez. 2022.
103. CROKER, B. A.; KIU, H.; NICHOLSON, S. E. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, London, v. 19, n.

4, p. 414-422, ago. 2008. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952108000499>. Acesso em: 16 dez. 2022.

104. MACHADO, F. S.; JOHNDROW, J. E.; ESPER, L.; DIAS, A.; BAFICA, A.; SERHAN, C. N.; ALIBERTI, J. Anti-inflammatory actions of lipoxin A4 and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. **Nature Medicine**, New York, v. 12, n. 3, p. 330-334, 15 mar. 2006. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nm1355>. Acesso em: 7 dez. 2022.

105. RICO-BAUTISTA, E.; FLORES-MORALES, A.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, L. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 2, a protein with multiple functions. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, London, v. 17, n. 6, p. 431-439, dez. 2006. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610106000578>. Acesso em: 7 dez. 2022.

106. KNOSP, C. A.; CARROLL, H. P.; ELLIOTT, J.; SAUNDERS, S. P.; NEL, H. J.; AMU, S.; PRATT, J. C.; SPENCE, S.; DORAN, E.; COOKE, N.; JACKSON, R.; SWIFT, J.; FITZGERALD, D. C.; HEANEY, L. G.; FALLON, P. G.; KISSENPFFENNIG, A.; JOHNSTON, J. A. SOCS2 regulates T helper type 2 differentiation and the generation of type 2 allergic responses. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 208, n. 7, p. 1523-1531, 4 jul. 2011. Disponível em: <https://rupress.org/jem/article/208/7/1523/41144/SOCS2-regulates-T-helper-type-2-differentiation>. Acesso em: 9 dez. 2022.

107. DAS, R.; GREGORY, P. A.; FERNANDES, R. C.; DENIS, I.; WANG, Q.; TOWNLEY, S. L.; ZHAO, S. G.; HANSON, A. R.; PICKERING, M. A.; ARMSTRONG, H. K.; LOKMAN, N. A.; EBRAHIMIE, E.; DAVICIONI, E.; JENKINS, R. B.; KARNES, R. J.; ROSS, A. E.; DEN, R. B.; KLEIN, E. A.; CHI, K. N.; RAMSHAW, H. S.; WILLIAMS, E. D.; ZOUBEIDI, A.; GOODALL, G. J.; FENG, F. Y.; BUTLER, L. M.; TILLEY, W. D.; SELTH, L. A. MicroRNA-194 Promotes prostate cancer metastasis by Inhibiting SOCS2. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 77, n. 4, p. 1021-1034, 15 fev. 2017. Disponível em: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/77/4/1021/624399/MicroRNA-194-Promotes-Prostate-Cancer-Metastasis>. Acesso em: 10 dez. 2022.

108. BULLEN, D. V. R.; BALDWIN, T. M.; CURTIS, J. M.; ALEXANDER, W. S.; HANDMAN, E. Persistence of lesions in suppressor of cytokine Signaling-1-Deficient mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, Rockville, v. 170, n. 8, p. 4267-4272, 15 abr. 2003. Disponível em: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.170.8.4267>. Acesso em: 8 dez. 2022.

109. ESPER, L.; ROMAN-CAMPOS, D.; LARA, A.; BRANT, F.; CASTRO, L. L.; BARROSO, A.; ARAUJO, R. R. S.; VIEIRA, L. Q.; MUKHERJEE, S.; GOMES, E. R. M.; ROCHA, N. N.; RAMOS, I. P. R.; LISANTI, M. P.; CAMPOS, C. F.; ARANTES, R. M. E.; GUATIMOSIM, S.; WEISS, L. M.; CRUZ, J. S.; TANOWITZ, H. B.; TEIXEIRA, M. M.; MACHADO, F. S. Role of SOCS2 in modulating heart damage and function in a murine model of acute chagas disease. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 181, n. 1, p. 130-140, jul. 2012. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944012003318>. Acesso em: 9 dez. 2022.

110. LOMAGA, M. A.; YEH, W.-C.; SAROSI, I.; DUNCAN, G. S.; FURLONGER, C.; HO, A.; MORONY, S.; CAPPARELLI, C.; VAN, G.; KAUFMAN, S.; HEIDEN, A. V. D.; ITIE, A.; WAKEHAM, A.; KHOO, W.; SASAKI, T.; CAO, A.; PENNINGER, J. F.; PAIGE, C. J.; LACEY, D. L.; DUNSTAN, C. R.; BOYLE, W. J.; GOEDDEL, D. V.; MAK, T. W. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. **Genes & Development**, Woodbury, v. 13, n. 8, p. 1015-1024, 15 abr. 1999. Disponível em: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.13.8.1015>. Acesso em: 20 nov. 2022.

111. NAITO, A.; AZUMA, S.; TANAKA, S.; MIYAZAKI, T.; TAKAKI, S.; TAKATSU, K.; NAKAO, K.; NAKAMURA, K.; KATSUKI, M.; YAMAMOTO, T.; INOUE, J.-I. Severe osteopetrosis, defective interleukin-1 signalling and lymph node organogenesis in TRAF6 -deficient mice. **Genes to Cells**, Chichester, v. 4, n. 6, p. 353-362, jun. 1999. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2443.1999.00265.x>. Acesso em: 20 nov. 2022.

112. DENG, L.; WANG, C.; SPENCER, E.; YANG, L.; BRAUN, A.; YOU, J.; SLAUGHTER, C.; PICKART, C.; CHEN, Z. J. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. **Cell**, Cambridge, v. 103, n. 2, p. 351-361, out. 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400001264>. Acesso em: 21 nov. 2022.

113. WANG, C.; DENG, L.; HONG, M.; AKKARAJU, G. R.; INOUE, J.-I.; CHEN, Z. J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**, London, v. 412, n. 6844, p. 346-351, 19 jul. 2001. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/35085597>. Acesso em: 22 nov. 2022.

114. KONG, L.; SUN, M.; JIANG, Z.; LI, L.; LU, B. MicroRNA-194 inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc by targeting TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6). **Medical Science Monitor**, Melville, v. 24, p. 3056-67, 10 maio 2018. Disponível em: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/907280>. Acesso em: 21 nov. 2022.

115. TIAN, H.; LIU, C.; ZOU, X.; WU, W.; ZHANG, C.; YUAN, D. MiRNA-194 regulates palmitic acid-induced toll-like receptor 4 inflammatory responses in THP-1 cells. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 5, p. 3483-3496, 13 maio 2015. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2072-6643/7/5/3483>. Acesso em: 23 nov. 2022.

116. SRIVASTAV, S.; SAHA, A.; BARUA, J.; UKIL, A.; DAS, P. K. IRAK-M regulates the inhibition of TLR-mediated macrophage immune response during late in vitro Leishmania donovani infection. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 45, n. 10, p. 2787-2797, out. 2015. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.201445336>. Acesso em: 24 nov. 2022.

117. GUPTA, P.; DAS, P. K.; UKIL, A. Antileishmanial effect of 18 β -Glycyrrhetic acid is mediated by Toll-Like receptor-dependent canonical and noncanonical p38 activation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 59, n. 5, p. 2531-2539, maio 2015. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.03997-14>. Acesso em: 22 nov. 2022.