

ATENÇÃO

Por solicitação da Autora,
a versão completa dessa
TESE estará disponível a
partir do dia 07/08/2023

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

JAQUELINE POLETO BRAGATO

**miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na
Leishmaniose Visceral Canina**

**ARAÇATUBA
2021**

JAQUELINE POLETO BRAGATO

**miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na
Leishmaniose Visceral 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 Doutora em Ciência Animal.

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

ARAÇATUBA
2021

B813m Bragato, Jaqueline Poletto
miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na
Leishmaniose Visceral Canina / Jaqueline Poletto Bragato. --
Araçatuba, 2021
59 p. : il., tabs., fotos

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

1. Leishmaniose Canina. 2. miRNA-21. 3. Resposta Imune.
4. CD69. 5. IL-10. 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: miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na Leishmaniose Visceral Canina

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Valéria M. F. de Lima

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

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

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)

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

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)

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

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)

Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE BARBOSA REIS (Participação Virtual)

Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


Título: miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na Leishmaniose Visceral Canina

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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


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

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

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE BARBOSA REIS (Participação Virtual)
Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na Leishmaniose Visceral Canina

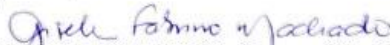
AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

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


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

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE BARBOSA REIS (Participação Virtual)
Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na Leishmaniose Visceral Canina

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

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

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

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

Prof. Dr. ALEXANDRE BARBOSA REIS (Participação Virtual)
Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na Leishmaniose Visceral Canina

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA


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

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

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Campus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Campus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP


Prof. Dr. ALEXANDRE BARBOSA REIS (Participação Virtual)
Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre guiar meus passos, me ajudando a ser uma pessoa melhor a cada dia e aprender com cada erro que apareceu no meu caminho. Mesmo em meio a uma pandemia Ele me deu força e saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais Luiz e Neusa, as pessoas que mais amo no mundo, e que sempre apoiaram todas as minhas decisões e nunca mediram esforços para me ajudar em qualquer situação. Devo a eles tudo que sou pessoal e profissionalmente.

Aos meus irmãos Luiz e Luan, minhas cunhadas Adelita e Viviane, meus sobrinhos Victor e Ravi (que ainda nem chegou) e meu namorado João Victor, que sempre me apoiam e estão presentes em todas as minhas conquistas. Amo vocês de todo o meu coração.

A minha orientadora Prof.^a Valéria Marçal Felix de Lima, que desde a graduação aceitou me orientar na iniciação científica, posteriormente no mestrado, e por fim no doutorado. Sou muito grata pela oportunidade e pela confiança depositada em mim.

Aos amigos do laboratório: Gabriela Rebech, Gabriela Venturin, Flávia, Marilene, Jéssica, Sidnei e Matheus, que sempre estavam prontos para ajudar com os experimentos e tornaram o ambiente do laboratório mais feliz. Foram minha família em Araçatuba todos esses anos.

A minha banca do exame geral de qualificação e defesa, Prof.^a Gisele Fabrino Machado, Prof.^a Flavia Lombardi Lopes, Prof.^a Sandra Helena Penha de Oliveira e Prof. Alexandre Barbosa Reis, por todas as considerações que contribuíram muito para melhorar meu trabalho.

Ao CNPQ por conceder bolsa de doutorado e a FAPESP pelo financiamento do projeto e por conceder bolsa de doutorado.

“Nós, seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar.”

Chico Xavier

Bragato, JP. **miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na Leishmaniose Visceral Canina**. 2021. 60 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

A Leishmaniose Visceral (LV) no homem é uma doença crônica e frequentemente fatal se não tratada. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a doença está em expansão e apresenta alta taxa de mortalidade. A região de Araçatuba/SP concentra grande número de casos de LV no estado. A Leishmaniose Canina (LCan) constitui um grave problema de Saúde Pública, pois os animais infectados são potentes transmissores do parasito para humanos pelo vetor flebotomíneo. Também, a doença canina é mais prevalente que a doença humana e normalmente os casos caninos precedem os casos humanos. O cão é, portanto, um alvo importante nas medidas de controle da doença. A progressão da infecção canina é acompanhada por falha na imunidade celular com redução de linfócitos circulantes e citocinas que suprimem a função dos macrófagos. A função da célula T na indução da resposta celular é determinante para a eliminação do parasito no interior dos macrófagos. Embora a supressão imunológica já esteja caracterizada, os fatores determinantes são pouco conhecidos. Na última década, estudos mostraram que a regulação da função efetora dos macrófagos e células T parece depender de miRNAs. Existem muitas evidências da função dos miRNAs na regulação da expressão de proteínas que são fundamentais para o desenvolvimento, função e diferenciação de vários tipos celulares do sistema imunológico. O miRNA-21 tem sua expressão aumentada em leucócitos esplênicos de cães com LCan e possui como alvo o mRNA de diversas proteínas relacionadas à resposta imune. Nosso objetivo foi avaliar a expressão das proteínas FAS, FASL, CD69, CCR7 e IL-10 em leucócitos esplênicos após a transfecção utilizando ferramentas moleculares para aumentar ou diminuir miR-21. Nossos resultados irão melhorar a compreensão da patogênese da LCan no hospedeiro, e como tal, revelar novos caminhos que possam constituir alvos terapêuticos.

Palavras-chave: Leishmaniose Canina. miRNA-21. Resposta imune. CD69. IL-10.

Bragato, JP. **miRNA-21 in the regulation of immune response in Canine Visceral Leishmaniasis**. 2021. 60 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis (VL) in humans is a chronic and often fatal disease if left untreated. According to World Health Organization, the disease is expanding with a high mortality rate. The Araçatuba/SP region concentrating a large number of cases in the state. Canine Leishmaniasis (CanL) is a serious public health problem because infected animals are powerful transmitters of the parasite to humans by phlebotomine vector, canine disease is more prevalent than human disease and usually canine cases precede human cases. Dogs are therefore an important target in the control measures of the disease. The progression of canine infection is accompanied by failure of cellular immunity with reduction of circulating lymphocytes and cytokines that suppress the function of macrophages. The function of T cell in the induction of cellular response is determinant for the elimination of the parasite inside the macrophages. Although immune suppression is already characterized, the determining factors are poorly understood. In the last decade, studies have shown that the regulation of the effector function of macrophages and T cells seems to depend on miRNAs. There are many evidences of the role of miRNAs in regulating the expression of proteins that are critical for the development, function, and differentiation of various cellular types of the immune system. miRNA-21 has increased expression in splenic leukocytes of dogs with CanL and targets mRNA of several proteins related to the immune response. Our objective was to evaluate the expression of FAS, FASL, CD69, CCR7 and IL-10 proteins in splenic leukocytes after transfection using molecular tools to increase or decrease miR-21. Our results will improve understanding of the pathogenesis of CanL in the host, and as such, reveal new pathways that may be therapeutic targets.

Keywords: Canine Leishmaniasis. miRNA-21. Immune response. CD69. IL-10.

APÊNDICE A- REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

1. World Health Organization (WHO). Control of the leishmaniasis. 2010; 22–26. doi:10.1038/nrmicro1766
2. Colmenares M, Kar S, Goldsmith-Pestana K, McMahon-Pratt D. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96 Suppl 1: S3-7.
3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE.* 2012. p. 35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
4. Pan American Health Organization (PAHO). Epidemiological Report of the Americas. US11. 2017; 2–5. Available: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34112>
5. Araújo VEM de, Pinheiro LC, Almeida MC de M, Menezes FC de, Morais MHF, Reis IA, et al. Relative Risk of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Spatial Analysis in Urban Area. Kamhawi S, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7: e2540. doi:10.1371/journal.pntd.0002540
6. González C, Paz A, Ferro C. Predicted altitudinal shifts and reduced spatial distribution of *Leishmania infantum* vector species under climate change scenarios in Colombia. *Acta Trop.* 2014;129: 83–90. doi:10.1016/j.actatropica.2013.08.014
7. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology.* 2011. pp. 403–409. doi:10.1016/j.pt.2011.04.001
8. Lara-Silva F de O, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza V de OP, Pessanha JEM, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 2015;148: 128–136. doi:10.1016/j.actatropica.2015.04.002
9. Oliveira AM, Vieira CP, Dibo MR, Guirado MM, Rodas LAC, Chiaravalloti-Neto F. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. *Acta Trop.* 2016;164: 233–242. doi:10.1016/j.actatropica.2016.09.014

10. Paiva BR, Oliveira AG, Dorval MEMC, Galati EAB, Malafronte RS. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Acta Trop.* 2010;115: 126–130. doi:10.1016/j.actatropica.2010.02.013
11. Romero GAS, Boelaert M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. Louzir H, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e584. doi:10.1371/journal.pntd.0000584
12. Brasil Ministério da Saúde. Casos confirmado de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. 2016. Available: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf>
13. Marcondes M, Rossi CN. Leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Assoc Med Bras.* 2013;4: 222–236. doi:10.11606/issn.2318-3659.v50i5p341-352
14. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366: 1561–1577. doi:10.1016/S0140-6736(05)67629-5
15. de Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, 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 Trop.* 2008;107: 66–69. doi:10.1016/j.actatropica.2008.04.015
16. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasit Vectors.* 2009;2: S1. doi:10.1186/1756-3305-2-S1-S1
17. Otranto D, Dantas-Torres F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: Caution is needed. *Vet Parasitol.* 2010;168: 173–174. doi:10.1016/j.vetpar.2009.11.016
18. Dantas-Torres F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. *Trends Parasitol.* 2011;27: 155–159. doi:10.1016/j.pt.2010.12.006
19. Silva FL, Oliveira RG, Silva TMA, Xavier MN, Nascimento EF, Santos RL. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;160: 55–59. doi:10.1016/j.vetpar.2008.10.079
20. Rosypal AC, Lindsay DS. Non-sand fly transmission of a north american isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected balb/c mice. *J Parasitol.* 2005;91: 1113–1115. doi:10.1645/GE-586R.1
21. Pangrazio KK, Costa EA, Amarilla SP, Cino AG, Silva TMA, Paixão TA, et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected

- fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. *Vet Parasitol.* 2009;165: 327–331. doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.013
22. Boggiatto PM, Gibson-Corley KN, Metz K, Gallup JM, Hostetter JM, Mullin K, et al. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. Boelaert M, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e1019. doi:10.1371/journal.pntd.0001019
 23. Owens SD, Oakley DA, Marryott K, Hatchett W, Walton R, Nolan TJ, et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2001;219: 1076–83. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700704>
 24. Ministério da Saúde B. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2006. Available: <http://www.saude.gov.br/editora>
 25. Dantas-Torres F, Miró G, Baneth G, Bourdeau P, Breitschwerdt E, Capelli G, et al. Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerg Infect Dis.* 2019;25: E1–E4. doi:10.3201/eid2512.190164
 26. Abranches P, Silva-Pereira MCD, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG. Canine leishmaniasis: Pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J Parasitol.* 1991;77: 557–561. doi:10.2307/3283159
 27. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002;18: 399–405. doi:10.1016/S1471-4922(02)02347-4
 28. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24: 324–330. doi:10.1016/j.pt.2008.04.001
 29. Coura-Vital W, Marques MJ, Veloso VM, Roatt BM, Aguiar-Soares RD de O, Reis LES, et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e1291. doi:10.1371/journal.pntd.0001291
 30. Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Filho JG, Perri SHV. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol.* 2010;170: 131–133. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.044
 31. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis

- following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82: 566–7.
32. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi M, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2011;4: 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86
 33. Mir F, Fontaine E, Reyes-Gomez E, Carlus M, Fontbonne A. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. *J Small Anim Pract.* 2012;53: 419–422. doi:10.1111/j.1748-5827.2012.01224.x
 34. Diniz SA, Silva FL, Carvalho Neta AC, Bueno R, Guerra RMSNC, Abreu-Silva AL, et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J Infect Dev Ctries.* 2008;2: 24–33.
 35. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;112: 102–116. doi:10.1016/j.vetimm.2006.02.001
 36. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994;62: 229–35.
 37. Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Feitosa MM. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36: 485–489.
 38. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006;81: 68–75. doi:10.1016/j.rvsc.2005.09.011
 39. Lopes EG, Sevá AP, Ferreira F, Nunes CM, Keid LB, Hiramoto RM, et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. *Epidemiol Infect.* 2017;145: 2436–2444. doi:10.1017/S0950268817001443
 40. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2006;28: 329–337. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x
 41. Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163: 94–102. doi:10.1016/j.vetimm.2014.11.011

42. Mendes-Sousa AF, Nascimento AAS, Queiroz DC, Vale VF, Fujiwara RT, Araújo RN, et al. Different Host Complement Systems and Their Interactions with Saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* Promastigotes. PLoS One. 2013;8: e79787. doi:10.1371/journal.pone.0079787
43. Zamboni DS, Lima-Junior DS. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. Immunol Rev. 2015;265: 156–171. doi:10.1111/imr.12291
44. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. Mol Biochem Parasitol. 2003;130: 65–74.
45. Carrada G, Cañeda C, Salaiza N, Delgado J, Ruiz AS, Gutiérrez-Kobeh L, et al. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. Parasite Immunol. 2007;29: 117–126. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00924.x
46. HJ A, DA M. The inflammasomes in kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2011;22: 1007–1018. doi:10.1681/ASN.2010080798
47. Esch KJ, Schaut RG, Lamb IM, Clay G, Morais Lima ÁL, do Nascimento PRP, et al. Activation of Autophagy and Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat-Containing-Like Receptor Family, Pyrin Domain-Containing 3 Inflammasome during *Leishmania infantum*-Associated Glomerulonephritis. Am J Pathol. 2015;185: 2105–2117. doi:10.1016/j.ajpath.2015.04.017
48. Abi Abdallah DS, Denkers EY. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. Frontiers in Immunology. Front Immunol; 2012. doi:10.3389/fimmu.2012.00382
49. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106: 6748–6753. doi:10.1073/pnas.0900226106
50. Almeida BFM, Narciso LG, Melo LM, Preve PP, Bosco AM, Lima VMF, et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. Vet J. 2013;198: 599–605. doi:10.1016/j.tvjl.2013.08.024
51. Almeida BFM, Narciso LG, Bosco AM, Pereira PP, Braga ET, Avanço S V., et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. Vet Parasitol. 2013;196: 6–12. doi:10.1016/j.vetpar.2013.02.016

52. Faria MS, Reis FCG, Lima APCA. Toll-Like Receptors in Leishmania Infections: Guardians or Promoters? *J Parasitol Res.* 2012: 1–12. doi:10.1155/2012/930257
53. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 713-58. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942
54. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog.* 2012;8. doi:10.1371/journal.ppat.1002536
55. Thalhofer CJ, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan leishmania infantum chagasi. *Infect Immun.* 2011;79: 108–117. doi:10.1128/IAI.00338-10
56. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. kinetics of DC activation. 2000;1: 311–316.
57. Pinelli E, Rutten VPMG, Bruysters M, Moore PF, Joost Ruitenber E. 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. *Infect Immun.* 1999;67: 237–243.
58. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev.* 2004;201: 239–253. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x
59. Murray HW, Cartelli DM. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest.* 1983;72: 32–44. doi:10.1172/JCI110972
60. Panaro MA, Fasanella A, Lisi S, Mitolo V, Andriola A, Brandonisio O. Evaluation of Nitric Oxide production by *Leishmania Infantum*-infected dog macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 1998;20: 147–158. doi:10.3109/08923979809034814
61. Belosevic M, Nacy CA. Interleukin-2, anti-interleukin-2 receptor antibody, and activation of macrophages. *Cell Immunol.* 1990;128: 635–640. doi:10.1016/0008-8749(90)90055-V
62. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999;112 Pt 18: 2993–3002.

63. Corrêa APFL, Dossi ACS, de Oliveira Vasconcelos R, Munari DP, de Lima VMF. Evaluation of transformation growth factor $\beta 1$, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Parasitol.* 2007;143: 267–274. doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.023
64. Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115: 135–145. doi:10.1016/j.vetimm.2006.10.001
65. Boggiatto PM, Ramer-Tait AE, Metz K, Kramer EE, Gibson-Corley K, Mullin K, et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17: 267–73. doi:10.1128/CVI.00456-09
66. Liu G, Abraham E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33: 170–177. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300068
67. El Gazzar M, Church A, Liu T, McCall CE. MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- during TLR4-induced gene reprogramming. *J Leukoc Biol.* 2011;90: 509–519. doi:10.1189/jlb.0211074
68. Graff JW, Dickson AM, Clay G, McCaffrey AP, Wilson ME. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *J Biol Chem.* 2012;287: 21816–21825. doi:10.1074/jbc.M111.327031
69. Pandey RK, Sundar S, Prajapati VK. Differential expression of miRNA regulates T cell differentiation and plasticity during visceral leishmaniasis infection. *Front Microbiol.* 2016;7: 1–9. doi:10.3389/fmicb.2016.00206
70. Tiwari N, Kumar V, Gedda MR, Singh AK, Singh VK, Gannavaram S, et al. Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection: delineation of their roles in macrophage dysfunction. *Front Microbiol.* 2017;8: 314. doi:10.3389/fmicb.2017.00314
71. Diotallevi A, De Santi M, Buffi G, Ceccarelli M, Vitale F, Galluzzi L, et al. *Leishmania* infection induces MicroRNA hsa-miR-346 in human cell line-derived macrophages. *Front Microbiol.* 2018;9. doi:10.3389/fmicb.2018.01019
72. Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM, et al.

- MicroRNA Expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7. doi:10.1371/journal.pntd.0002478
73. Singh AK, Pandey RK, Shaha C, Madhubala R. MicroRNA expression profiling of *Leishmania donovani*-infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy. Autophagy. 2016; 1–15. doi:10.1080/15548627.2016.1203500
 74. Soares MF, Melo LM, Bragato JP, Furlan A de O, Scaramele NF, Lopes FL, et al. Differential expression of miRNAs in canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) exposed to *Leishmania infantum in vitro*. Res Vet Sci. 2021;134: 58–63. doi:10.1016/j.rvsc.2020.11.021
 75. Bragato JP, Melo LM, Venturin GL, Rebech GT, Garcia LE, Lopes FL, et al. Relationship of peripheral blood mononuclear cells miRNA expression and parasitic load in canine visceral leishmaniasis. PLoS One. 2018;13: e0206876. doi:10.1371/journal.pone.0206876
 76. Melo LM, Bragato JP, Venturin GL, Rebech GT, Costa SF, Garcia LE, et al. Induction of miR 21 impairs the anti-*Leishmania* response through inhibition of IL-12 in canine splenic leukocytes. PLoS One. 2019;14: 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0226192
 77. Chamizo C, Moreno J, Alvar J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 2005;103: 67–75. doi:10.1016/j.vetimm.2004.08.010
 78. Zhang X, Ng W-L, Wang P, Tian L, Werner E, Wang H, et al. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNF α . Cancer Res. 2012;72: 4707–13. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0639
 79. Yang N, Li Y, Wang G, Ding Y, Jin Y, Xu Y. Tumor necrosis factor- α suppresses adipogenic and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell by inhibiting miR-21/Spry1 functional axis. Differentiation. 2017;97: 33–43. doi:10.1016/j.diff.2017.08.004
 80. Alves CF, de Amorim IFG, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, et al. Expression of IFN- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Immunol Immunopathol. 2009;128: 349–358. doi:10.1016/j.vetimm.2008.11.020
 81. Silva KLO, Melo LM, Perosso J, Oliveira BB, Santos PSP dos, Eugênio F de R,

- et al. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. *Vet Parasitol.* 2013;197: 470–476. doi:10.1016/j.vetpar.2013.07.012
82. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of fas ligand. *J Biol Chem.* 2010;285: 20281–20290. doi:10.1074/jbc.M110.109207
83. Wang K, Li PF. Foxo3a regulates apoptosis by negatively targeting miR-21. *J Biol Chem.* 2010;285: 16958–16966. doi:10.1074/jbc.M109.093005
84. Perosso J, Silva KLO, Ferreira SÍ de S, Avanço SV, dos Santos PSP, Eugênio F de R, et al. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2014;205: 417–423. doi:10.1016/j.vetpar.2014.09.006
85. Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, Slezak-Prochazka I, Maat H, van den Bos H, et al. Dual Role of miR-21 in CD4+ T-Cells: Activation-Induced miR-21 Supports Survival of Memory T-Cells and Regulates CCR7 Expression in Naive T-Cells. *PLoS One.* 2013;8: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0076217
86. Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol.* 2002;3: 1185–91. doi:10.1038/ni861
87. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 1999;99: 23–33.
88. Carissimi C, Carucci N, Colombo T, Piconese S, Azzalin G, Cipolletta E, et al. miR-21 is a negative modulator of T-cell activation. *Biochimie.* 2014;107: 319–326. doi:10.1016/j.biochi.2014.09.021
89. Zhang Z, Wu N, Lu Y, Davidson D, Colonna M, Veillette A. DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *J Exp Med.* 2015;212: 2165–82. doi:10.1084/jem.20150792
90. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology.* 1999;97: 159–65.
91. Nylén S, Maasho K, Söderstrom K, Ilg T, Akuffo H. Live *Leishmania*

promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol.* 2003;131: 457–67.

ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"miR 21 e miR148a na regulação da resposta imunológica de leucócitos esplênicos na Leishmaniose Visceral Canina"**, Processo FOA nº 00624-2018, sob responsabilidade de Valéria Marçal Félix de Lima apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 14 de Agosto de 2018.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Novembro de 2021.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 Dezembro de 2021.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"miR 21 e miR 148a in regulation of immune response of splenic leukocytes in Canine Visceral Leishmaniasis"**, Protocol FOA nº 00624-2018, under the supervision of Valéria Marçal Félix de Lima presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 14, 2018.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 01, 2021.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 01, 2021.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br