



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus Araçatuba

GIULIA GONÇALVES JUSSIANI

**EXPRESSÃO DE MICRORNAS NO CÉREBRO DE CÃES
COM LEISHMANIOSE**

Araçatuba

2024

GIULIA GONÇALVES JUSSIANI

**EXPRESSÃO DE MICRORNAS NO CÉREBRO DE CÃES
COM LEISHMANIOSE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientadora: Prof. Dra. Gisele Fabrino Machado

Araçatuba

2024

J96e

Jussiani, Giulia Gonçalves

Expressão de microRNAs no cérebro de cães com leishmaniose /
Giulia Gonçalves Jussiani. -- Araçatuba, 2024

74 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Gisele Fabrino Machado

1. Leishmania infantum. 2. miRNA. 3. Neuroinflamação. 4.
Neuropatologia. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE GIULIA GONÇALVES JUSSIANI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 14 dias do mês de junho do ano de 2024, às 08:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de GIULIA GONÇALVES JUSSIANI, intitulada **Expressão de microRNAs no cérebro de cães com leishmaniose**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Profa. Titular VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Pesquisador GUILHERME DIAS DE MELO (Participação Virtual) do(a) Unité Lyssavirus Epidemiologie et Neuropathologie / Instituto Pasteur de Paris. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO

CONFERE COM O ORIGINAL
Seção Técnica de Pós-Graduação
14 JUN. 2024
LUCILA MAKO KAVANO
Supervisora Técnico de Seção

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos,

À minha orientadora Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado, pela paciência, confiança e incentivo, pelas muitas oportunidades e por todo o acolhimento e compreensão durante todos os anos da minha formação.

Aos meus pais, Aléssia e Kleber, pela confiança na minha capacidade, suporte e amor incondicional.

Às minhas amigas, Daniela Borges Pádua e Naomi Takinami, por tornarem todos os meus dias mais felizes.

Aos meus cachorros Apolo e Cristal, que mesmo de longe são fontes de inspiração e motivação.

Aos meus colegas pós-graduandos e alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Patologia Aplicada (FMVA/UNESP), em especial, à Karen Santos Março e Ednilson Doná Frigério, por compartilharem conhecimentos essenciais para minha formação e pela amizade.

Ao Laboratório de Imunologia (FMVA/UNESP) e toda sua equipe, em especial ao Lucas Takeshi Ito por toda a ajuda e amizade.

Ao Laboratório de Epigenômica (FMVA/UNESP), em especial à doutoranda Amanda Furlan pelos ensinamentos essenciais para este trabalho.

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes e Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima pelo incentivo e por todas às considerações para o aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da banca da Defesa da Dissertação, Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima e Dr. Guilherme Dias de Melo, pela disponibilidade, compreensão, considerações e conselhos.

Ao Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação (FMVA/UNESP), em especial à bibliotecária Cristina Godoy, pelo apoio com a formatação da dissertação.

Aos membros da Seção Técnica de Pós-Graduação (FMVA/UNESP), pelos esclarecimentos, disponibilidade e ajuda.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa (2022/06858-6) e concessão de bolsa de mestrado (2022/08163-5).

E, por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional durante este período.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica e progressiva de alta variabilidade clínica, que pode incluir manifestações neurológicas. Em virtude das alterações inflamatórias encefálicas, sabe-se atualmente que cães infectados cronicamente podem apresentar déficits neurológicos significativos. Apesar da importância clínica desta desordem, são escassos os relatos que caracterizam lesões neurológicas na LVC. Estudos prévios realizados em cães com LVC evidenciaram a presença de inflamação encefálica pela observação de infiltração de linfócitos T, ativação de células da glia, alterações degenerativas de neurônios, meningite, coroidite, além da ativação de metaloproteinases e alteração na expressão gênica de quimiocinas e de citocinas pró-inflamatórias. É sabida a função de microRNAs (miRNAs) na regulação da expressão de proteínas fundamentais para a função, a diferenciação e o desenvolvimento de tipos celulares do sistema imunológico; e a desregulação da atividade de miRNAs está envolvida em diversas enfermidades. No sistema nervoso, o equilíbrio entre diferentes estados fenotípicos da micróglia e dos astrócitos pode promover inflamação ou reparo tecidual e influenciam a progressão dos distúrbios inflamatórios. Os miRNA operam ativando ou modulando os genes expressos por células da glia e astrócitos, e podem exacerbar ou restringir a sinalização de um processo inflamatório. Ainda, na LVC, em virtude de a supressão imunológica celular ser determinante para a sua progressão, sabe-se que os miRNAs e sua regulação imunológica são essenciais para a mudança do padrão da resposta. Assim, o presente estudo buscou a melhor compreensão da patogênese das alterações neurológicas causadas pela LVC, por meio da avaliação da expressão de miRNA em cérebro de cães com leishmaniose.

Palavras-chaves: *Leishmania infantum*; miRNA; neuroinflamação; neuropatologia

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CanL) is a chronic and progressive disease characterized by high clinical variability, which may include neurological manifestations. Despite the clinical importance of this disorder, there are few reports characterizing neurological lesions in CanL. Previous studies conducted in dogs with CanL have demonstrated the presence of brain inflammation, manifested by T lymphocyte infiltration, glial cell activation, neuronal degeneration, meningitis, choroiditis, as well as the activation of metalloproteinases and alterations in the expression of chemokines and pro-inflammatory cytokines. MicroRNAs (miRNAs) play a crucial role in regulating protein expression, essential for the function, differentiation, and development of immune cell types. Dysregulation of miRNA activity is implicated in various diseases. In the nervous system, the balance between different phenotypic states of microglia and astrocytes can either promote inflammation or tissue repair, thereby influencing the progression of inflammatory disorders. MiRNAs operate by activating or modulating genes expressed by glial cells and astrocytes and can exacerbate or restrict the signaling of an inflammatory process. Moreover, in CanL, where cellular immunosuppression is decisive for disease progression, miRNAs and their immunoregulatory functions are essential for altering the pattern of immune responses. Thus, the present study aimed to enhance our understanding of the pathogenesis of neurological changes associated with CanL, by evaluating miRNA expression in the brains of dogs affected by leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania infantum*, miRNA, neuroinflammation, neuropathology

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
1.1	<i>Aspectos epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose</i>	10
1.2	<i>Resposta Imune na LVC.....</i>	11
1.3	<i>Leishmaniose e o Sistema Nervoso Central</i>	12
1.4	<i>MicroRNAs</i>	14
1.5	<i>MicroRNAs na Leishmaniose Canina.....</i>	16
1.6	<i>MicroRNAs na Neuroinflamação</i>	17
1.7	<i>Justificativa.....</i>	19
1.8	<i>Objetivos</i>	20
2	CAPÍTULO 1 – EXPRESSÃO DE MICRORNAS NO CÉREBRO DE CÃES COM LEISHMANIOSE	21
2.1	<i>Resumo</i>	21
2.2	<i>Abstract.....</i>	22
2.3	<i>Introdução</i>	22
2.4	<i>Métodos</i>	25
2.4.1	<i>Ética.....</i>	25
2.4.2	<i>Animais.....</i>	25
2.4.3	<i>Colheita de material.....</i>	26
2.4.4	<i>Avaliação histopatológica e imunohistoquímica do cérebro.....</i>	27
2.4.5	<i>Carga parasitária do baço.....</i>	28
2.4.7	<i>Avaliação da expressão de miRNAs.....</i>	29
2.4.8	<i>Previsão de alvos e análise de vias</i>	30
2.4.9	<i>Estatística</i>	31
2.5	<i>Resultados</i>	31
2.5.1	<i>Achados clínicos e laboratoriais</i>	31
2.5.2	<i>Lesões histopatológicas do tecido nervoso</i>	31
2.5.3	<i>Carga parasitária</i>	33
2.5.4	<i>Expressão relativa dos miRNAs</i>	33
2.5.5	<i>Previsão de alvos e vias</i>	35
2.6	<i>Discussão.....</i>	37
2.7	<i>Conclusão</i>	40
2.8	<i>Informações de Apoio</i>	40
2.9	<i>Referências</i>	48
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	55
	ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA	62
	ANEXO B – NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA VETERINARY PARASITOLOGY	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose

As leishmanioses são um grupo de doenças de caráter zoonótico, causadas por mais de vinte espécies do protozoário *Leishmania sp.* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae), transmitidas pela picada de mosquitos flebotomíneos. Ocorrem principalmente em regiões tropicais e subtropicais, com maior incidência em países da África, Ásia, América Latina e regiões no Mediterrâneo (Alvar *et al.*, 2012)

Nas Américas, a leishmaniose é endêmica em 13 países, sendo considerada um problema de saúde pública (Organização Mundial da Saúde – OMS, 2010). O Brasil concentra cerca de 90% dos casos registrados nas Américas, com uma média de 3.400 casos por ano (Organização Panamericana de Saúde – OPAS, 2020).

Dentre as apresentações clínicas da doença, podem ser citadas a forma cutânea, mucocutânea e visceral, sendo a leishmaniose visceral (LV) a apresentação clínica mais grave (Grimaldi; Tesh, 1993).

Os cães, além de desenvolverem a forma visceral da doença, são considerados importantes reservatórios da *Leishmania infantum*, principal espécie relacionada a LV em áreas endêmicas e espécie predominante no Brasil. Uma vez infectados, os cães abrigam o parasito em seu sangue e tecidos, atuando como fonte de infecção para o mosquito. Por este motivo, a leishmaniose visceral canina (LVC) tem grande importância epidemiológica, visto o intenso parasitismo cutâneo dos cães, o que favorece a transmissão ao homem (Alvar *et al.*, 2012).

A LVC clássica é considerada uma doença crônica e sistêmica, promovendo um amplo espectro de sinais clínicos não específicos, podendo acometer qualquer órgão do animal, mas principalmente o fígado, baço, linfonodos, medula óssea e rins. Os cães infectados podem apresentar desde infecção subclínica a formas graves da doença, que inclui mais comumente alterações dermatológicas, renais, hepáticas e oculares, associadas a sinais inespecíficos como linfadenomegalia generalizada, perda de peso ou caquexia, alteração do apetite, letargia, palidez de mucosas, hepatoesplenomegalia, poliúria, polidipsia, febre e diarreia crônica (Solano-Gallego *et al.*, 2009). Alterações laboratoriais como hipoalbuminemia,

hiperglobulinemia, anemia não regenerativa, trombocitopatias, aumento de enzimas hepáticas e azotemia renal costumam acompanhar os sintomas, em diferentes graus de severidade (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

No exame necroscópico de animais com leishmaniose, a linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e presença de múltiplas lesões cutâneas ulcerativas ou erosivas são as alterações macroscópicas mais características (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Na histopatologia, observa-se infiltrado piogranulomatoso ou granulomatoso associado a presença de formas amastigotas em diversos órgãos, incluindo pele, músculos, articulações, ossos, trato urogenital e gastrointestinal, embora as alterações mais marcantes ocorram nos linfonodos e baço.

A evolução clínica da leishmaniose depende de uma série de fatores relacionados à virulência do patógeno e a capacidade do sistema imune do hospedeiro de desenvolver respostas favoráveis. Cães infectados são descritos como susceptíveis quando a replicação irrestrita do parasita leva a danos progressivos. Ainda, existem animais resistentes que se mantêm assintomáticos ou com sinais discretos por toda a vida, ainda que com carga parasitária moderada a acentuada (Koutinas, A.; Koutinas, C., 2014).

1.2 Resposta Imune na LVC

A resposta imune na LVC é complexa e os mecanismos imunológicos relacionados à resistência, suscetibilidade e estabelecimento da infecção em cães ainda não foram completamente estabelecidos (Hosein; Blake; Solano-Gallego, 2017). Entretanto, é sabido que a evolução da doença depende diretamente do tipo de resposta imune desenvolvida e que esta é considerada compartimentalizada e órgão-específica (Reis *et al.*, 2009).

Inicialmente, células da resposta imune inata como macrófagos e células dendríticas agem visando a eliminação do patógeno por meio da fagocitose e da indução da produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que participam da posterior ativação da resposta imune adaptativa (Hosein; Blake; Solano-Gallego, 2017). Assim, a resposta imune inata é responsável por instruir o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa específica e de longa duração (Kumar, 2019).

Em cães infectados clinicamente saudáveis, a resposta imune adaptativa do tipo Th1 (celular) prevalece, mediada por citocinas como interleucina 2 (IL-2), interferon-gama (IFN- γ) e TNF- α . A ativação da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos macrófagos é determinante para eliminação do parasita (Baneth *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de sinais clínicos mais graves está associado a uma resposta imune celular predominantemente do tipo Th2 (humoral) (Reis *et al.*, 2009). A resposta Th2 é caracterizada por uma superprodução de interleucina-10 (IL-10), que inibe a atividade das células Th1 e dos macrófagos, permitindo a sobrevivência dos parasitas, além de uma alta produção de anticorpos e IgG (linfócitos B), com marcada redução na população de linfócitos das células T CD4+, mais eficientes no combate ao parasito (Baneth *et al.*, 2008). A proliferação celular de linfócitos B leva à formação e deposição de imunocomplexos nas paredes dos vasos sanguíneos, que muitas vezes é responsável pelo desenvolvimento dos sinais clínicos (Reis *et al.*, 2009).

1.3 Leishmaniose e o Sistema Nervoso Central

Existem poucos estudos caracterizando a patogenia das alterações neurológicas na Leishmaniose, entretanto, já é sabido que o parasita pode infectar o tecido nervoso (Melo *et al.*, 2017) e que manifestações clínicas neurológicas podem ocorrer com a progressão e cronificação da doença. Em cães, a presença de alterações tanto inflamatórias quanto vasculares é descrita, em associação ou não a presença de sinais clínicos (Giannuzzi *et al.*, 2017), afetando o sistema nervoso central e o periférico.

Dentre os sinais clínicos neurológicos relatados em cães com LVC, podem ser citadas a ocorrência de convulsões generalizadas, comportamento atípico, fotofobia, agressão transitória, tetraplegia, andar em círculos, alterações vestibulares e cerebelares, mioclonia, paresia de membros e vocalização (Blavier *et al.*, 2001; Maia *et al.*, 2015; Giannuzzi *et al.*, 2017).

Embora poucos animais desenvolvam sinais clínicos neurológicos (Giannuzzi *et al.*, 2017), alterações histopatológicas como meningite, coroidite, infiltrado inflamatório linfoplasmocítico perivascular e alterações morfológicas indicativas de ativação da micróglia e de astrócitos são observadas em grande parte dos cães

infectados (Oliveira *et al.*, 2017; Melo; Machado, 2011; Melo *et al.*, 2009). A presença de focos de micro hemorragias, múltiplos infartos e depósitos de imunocomplexos nos vasos sanguíneos do plexo coróide também é descrita, embora menos frequente (Garcia-Alonso *et al.*, 1996; Márquez *et al.*, 2013), além de depósitos amiloides, degeneração neuronal e neuroniofagia (Ikeda *et al.*, 2007).

Estudos comprovam que a *Leishmania* é capaz de penetrar a barreira hematoencefálica (BHE), disseminando-se no líquido cefalorraquidiano (LCR) e infectando o encéfalo e a medula espinhal de cães (Oliveira *et al.*, 2017). Formas amastigotas do parasito já foram detectadas na meninge (Márquez *et al.*, 2013), medula espinhal (Oliveira *et al.*, 2017) e no plexo coroide (Grano *et al.*, 2014) de cães infectados, bem como no LCR, embora os relatos sejam escassos. A detecção de DNA de *Leishmania* por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) no tecido nervoso é mais frequente, e está descrita em diferentes áreas do cérebro de cães (Oliveira *et al.*, 2017; Grano *et al.*, 2014).

A presença das alterações inflamatórias comprova que a LVC pode afetar o SNC, seja devido à resposta inflamatória sistêmica ou pela infecção do parasita. Produtos da inflamação, como citocinas e quimiocinas liberadas na circulação durante a resposta imune periférica podem cruzar a barreira hematoencefálica, levando à ativação da micróglia residente no cérebro, que então desencadeia uma cascata neuroinflamatória (Negi; Das, 2018). Disfunção na BHE (Melo *et al.*, 2015) e na barreira hematoliquórica (Silva *et al.*, 2023) foram identificadas no cérebro de cães infectados, permitindo assim a invasão de células do sistema imune e patógenos.

Ainda, no tecido nervoso de cães com LVC, foi detectado aumento da expressão de genes com funções pró-inflamatórias, tanto da imunidade inata quanto adaptativa, como interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-10 (Melo *et al.*, 2017; Grano *et al.*, 2018; Bregano *et al.* 2018), além do aumento dos transcritos para os receptores do tipo *Toll Like* (TRL) TLR-2, TLR-4 e TLR-9. O aumento da expressão gênica relacionados à produção de quimiocinas, como os genes *C-C motif chemokine ligand* (CCL) -3, CCL-4, CCL-5 também é descrito (Melo *et al.*, 2015), com destaque para CCL-5, cujo aumento da expressão gênica foi detectado na região do plexo coroide, onde a presença de linfócitos T é marcante (Silva *et al.*, 2023).

1.4 MicroRNAs

Os micros RNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes, altamente conservados entre as espécies e capazes de regular a expressão de genes alvos no nível pós-transcricional. Apresentam cerca de 19 a 25 nucleotídeos, processados no núcleo e depois transportados para o citoplasma, onde podem ser degradados ou reconhecer um RNA mensageiro (mRNA) específico. Os miRNA se ligam por complementariedade às regiões 3' não traduzidas dos mRNA, bloqueando a tradução de proteínas (Bartel, 2004).

Os miRNAs podem originar-se de regiões intergênicas, de íntrons ou de éxons de genes, entretanto, sabe-se que cerca de metade de todos os miRNAs atualmente identificados são intrônicos, enquanto os restantes estão nas regiões intergênicas, podendo ser transcritos independentemente de um gene hospedeiro (O'Brien *et al.*, 2018). Por vezes, dois ou mais miRNAs estão localizados próximos uns dos outros, e são transcritos em uma única transcrição longa, sendo denominados *clusters* (família) (Bartel, 2004).

A biogênese clássica dos miRNAs (via canônica) inicia-se no núcleo a partir do DNA, onde a RNA polimerase II transcreve o pri-miRNA (com centenas de nucleotídeos), e este é clivado pelo complexo proteico DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*) e pela endoribonuclease II (*Drosha*), resultando em um pré-miRNA com cerca de 70 a 100 nucleotídeos (Slota; Booth, 2019). Os trabalhos também mencionam a existência de vias alternativas na biogênese dos miRNAs, como a via miRtron, que não requer a clivagem mediada por *Drosha*, de modo que os pri-miRNAs são processados diretamente pela maquinaria de *splicing* para gerar pré-miRNAs (Iorio; Croce, 2012).

No citoplasma, os pré-miRNA são clivados em uma fita dupla pela ribonuclease III (*Dicer*), formando o miRNA maduro, com cerca de 22 nucleotídeos. Uma das cadeias, o miRNA guia, é então carregada no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O RISC é essencialmente uma maquinaria proteica composta de proteínas da família Argonauta, que guia o miRNA guia para encontrar mRNAs complementares. Quando o miRNA guia se liga ao mRNA alvo, o RISC pode bloquear a tradução do mRNA ou induzir sua degradação, regulando assim a expressão gênica (Slota; Booth, 2019).

Assim, os miRNAs maduros regulam os mRNAs de acordo com seu grau de complementariedade e homologia, podendo induzir o silenciamento ou degradação dos transcritos alvos ou a inibição da tradução (O'Brien *et al.*, 2018).

A capacidade de ligação por complementaridade parcial permite que os miRNAs interajam com muitos alvos diferentes. Um único miRNA pode ter efeitos biológicos opostos em diferentes tipos celulares, dependendo das funções dos mRNAs-alvo. Além disso, cada mRNA pode ser alvo de múltiplos miRNAs, e os efeitos biológicos de um miRNA específico podem refletir a soma das interações com outros miRNAs na mesma célula. A coexpressão de miRNAs de um *cluster*, por exemplo, pode resultar em uma regulação coordenada de múltiplos alvos gênicos, ampliando o impacto regulatório dos miRNAs sobre processos biológicos (O'Brien *et al.*, 2018).

A expressão dos miRNAs, assim como a expressão dos mRNAs, pode ser regulada por diversos mecanismos e em vários níveis, desde a sua síntese, processamento e manutenção da sua estabilidade. A presença de alterações genômicas (mutações), presença de fatores de transcrição, interação com outros RNAs não codificantes e a modulação epigenética, como a metilação de DNA e a modificação de histonas podem impactar diretamente na expressão dos miRNAs (Morales; Monzo; Navarro, 2017).

Os miRNAs intragênicos estão incorporados nos íntrons dos genes hospedeiros e são co-transcritos com esses genes, de modo que mudanças na expressão dos genes hospedeiros afetam diretamente sua expressão. Por outro lado, os miRNAs intergênicos possuem seus próprios promotores independentes e são regulados por fatores de transcrição específicos que se ligam a esses promotores. Além da regulação transcricional, a expressão dos miRNAs pode ser modulada em níveis pós-transcricionais, por alterações na atividade de enzimas críticas em sua biogênese como *Dicer* e *Drosha* (Gulyaeva; Kushlinskiy, 2016). Os próprios miRNAs podem regular a expressão de componentes da maquinaria epigenética, criando um mecanismo de *feedback* altamente controlado (Iorio; Croce, 2012).

Além de seus papéis regulatórios autócrinos, os miRNAs também podem ser liberados para alterar a função de outras células próximas ou em todo o corpo, sendo liberados no espaço extracelular em vesículas (exossomos). Uma vez liberados no espaço extracelular, os exossomos podem ser captados por células

vizinhas ou células distantes através da circulação sanguínea ou linfática. Os miRNAs contidos nos exossomos são capazes de regular a expressão gênica nas células receptoras, influenciando assim diversos processos fisiológicos e patológicos (Gaudet *et al.*, 2018).

A atividade dos miRNAs é fundamental para o controle da expressão de genes e, portanto, na transcrição de proteínas que atuam em inúmeras atividades celulares, incluindo as relacionadas a resposta imunológica. Assim, genes que modulam a inflamação e a resposta imune podem ser co-regulados por vários miRNAs e a desregulação da atividade de miRNA vem sendo destacada em diversas enfermidades, incluindo as doenças infecciosas (Nejad; Stunden; Gantier, 2018).

1.5 MicroRNAs na Leishmaniose Canina

Nos últimos anos, o papel dos miRNAs na leishmaniose tem sido amplamente estudado. Diversos miRNAs foram identificados como moduladores-chave da resposta imune e da carga parasitária em cães. Esses miRNAs desempenham papéis cruciais na regulação de vias de sinalização, expressão gênica e resposta inflamatória, afetando diretamente a progressão da doença e a eficácia da resposta imunológica contra o parasita.

Na infecção por *Leishmania donovani* de fagócitos humanos *in-vitro*, foi demonstrado que o parasita é capaz de induzir alteração na atividade de miRNAs como miR-21, miR-155 e miR-146b-5p, interferindo na sinalização de TGF- β , fator responsável por reduzir a produção de INF- γ , o que diminuiu a resposta oxidativa e eliminação do parasita (Geraci; Tan; McDowell, 2015).

Em relação à modulação do perfil de resposta imune em Th1/Th2, o miR-21 e o miR-148a foram demonstrados aumentados em leucócitos esplênicos de cães LVC, favorecendo o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo Th2 (Rebech *et al.*, 2023). Quanto à polarização de macrófagos, foi verificado que o miR-21 regula a polarização dos macrófagos ao suprimir a PTEN, influenciando sua mudança de perfil de M2 (fenótipo anti-inflamatório) para M1 (fenótipo pró-inflamatório), essencial para a atividade leishmanicida (Freitas *et al.*, 2023). Adicionalmente, o papel do miR-21 também parece estar relacionado a regulação da expressão de CD69 em linfócitos B, reduzindo os níveis de IL-10 (Bragato *et al.*, 2022). Sabe-se que a IL-10

suprime a resposta imunitária, e os seus níveis aumentados têm sido associados à progressão do LVC.

O miR-371 foi correlacionado positivamente com a carga parasitária, possivelmente como regulador do gene Runx3, resultando em uma resposta Th2 mais pronunciada (Bragato *et al.*, 2018). Já o papel do miR-150 foi associado a regulação da carga parasitária nas células mononucleares do sangue periférico de cães com LVC, associando aos níveis de granzima B (Soares *et al.*, 2023).

Adicionalmente, o miR-346 foi identificado em macrófagos caninos e no plasma de cães naturalmente infectados. Sua regulação positiva pode contribuir para o controle da resposta de genes envolvidos no estresse oxidativo, sugerindo um possível papel na regulação da carga parasitária, além de ser um candidato a biomarcador (Buffi *et al.*, 2022).

A relação entre a interleucina 1 beta (IL-1 β) e o miR-194 em cães com leishmaniose foi investigada, indicando que o miR-194 pode regular negativamente a produção de IL-1 β em células inflamatórias. A inibição do miR-194 resultou em um aumento na produção de IL-1 β em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de cães com LVC (Costa *et al.*, 2024).

Ainda, o miR-194 apresentou uma forte correlação positiva com o aumento da ureia sérica nos cães, destacando que este pode desempenhar um papel no desenvolvimento de lesões renais. Além disso, mostrou uma forte correlação negativa com a concentração de hemoglobina, sugerindo uma possível correlação com a anemia, que é frequentemente observada em cães sintomáticos (Bragato *et al.*, 2018).

1.6 MicroRNAs na Neuroinflamação

Os miRNAs demonstraram estar envolvidos na regulamentação de vários processos biológicos dentro do SNC, sendo implicados em múltiplos distúrbios neurológicos (Quinn; O'Neill, 2011). As interações miRNA-alvo no SNC são complexas e podem afetar muitos processos, incluindo morte neuronal, neurogênese, angiogênese, agregação plaquetária, infiltração de leucócitos, disfunção da BBB e infarto do tecido, promovendo déficits neurológicos após lesões (Hussain; Chang, 2021).

No tecido nervoso, além de atuarem em diversas funções fisiológicas, no contexto da neuroinflamação, os miRNA operam ativando ou modulando a expressão de genes das células da glia e astrócitos, podendo promover ou restringir a sinalização inflamatória. Tanto a micróglia quanto os astrócitos são considerados parte do sistema imunológico inato no SNC, devido à sua capacidade para produzir imunomoduladores e expressar receptores associado à imunidade inata (Matejuk; Ransohoff, 2020).

Os astrócitos são as células mais abundantes no SNC e exercem múltiplas funções fisiológicas no tecido nervoso, como a homeostase de íons e água, reciclagem de neurotransmissores, participação na formação e eficiência BBB, regulação da sinaptogênese neuronal e sinalização imunológica. São mantidos quiescentes em situações fisiológicas; no entanto, podem sofrer alterações morfológicas e bioquímicas na presença de estímulos lesivos (Giovannoni; Quintana, 2020).

As células microgliais são macrófagos residentes no SNC com papel essencial referente ao combate de infecções, remoção de detritos celulares, fagocitose, mielinização e até mesmo a vascularização do SNC (Guo *et al.*, 2019). Semelhante aos macrófagos periféricos, a micróglia responde diretamente aos patógenos e mantém a homeostase celular eliminando-os. Após a exposição a estímulos, a micróglia pode se polarizar nos fenótipos M1 (pró-inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório), produzindo várias substâncias, incluindo citocinas pró-inflamatórias, proteínas neurotóxicas, quimiocinas, citocinas anti-inflamatórias e fatores neurotróficos (Guedes; Cardoso; Lima, 2013).

A expressão aumentada ou diminuída de diversos miRNAs foi associada à modulação do perfil de ativação da micróglia e dos astrócitos em diversas enfermidades. Em geral, os miRNAs mais estudados no contexto da neuroinflamação e sabidamente expressos pela micróglia e astrócitos incluem os miRNA-155, miRNA-27b e miRNA-326, cuja função é promover uma resposta pró-inflamatória; os miRNA-124, miRNA-146a, miRNA-21, miRNA-223, têm sido associados a efeitos anti-inflamatórios, enquanto a família let-7 tem uma função reguladora mista (Gaudet *et al.*, 2018).

Entre os miRNAs relacionados à ativação da micróglia, os alvos diretos da maioria dos miRNAs (miR-27a, miR-181a, miR-203, miR-125b, miR-199, miR-29b, miR-7 e miR-146a) estão dentro da via do fator nuclear kappa B (NF- κ B), indicando

o importante papel desta via na sua ativação (Guo *et al.*, 2019). A micróglia também pode expressar níveis elevados de miRNA-128, que por sua vez atua visando manter seu estado quiescente (Conrad; Dittel, 2011). Quanto à polarização dos astrócitos, os miRNAs miR-136-5p, miR-140, miR-124-3p e miR-21a-5p são considerados reguladores críticos em favorecer o fenótipo A2 (protetor) (Faraoni *et al.*, 2009).

A regulação da integridade da BBB também pode ser influenciada pela atividade de miRNAs. Estudos apontam que os miRNAs miR-155, miR-98 e let-7 podem influenciar a expressão de genes que controlam proteínas de junção apertada (*tight junctions*) e proteínas transportadoras, influenciando na permeabilidade da barreira (Ma; Zhang; Yin, 2020).

Sendo assim, a liberação de miRNAs durante a neuroinflamação pode moldar a resposta inflamatória, incluindo a modulação do fenótipo da micróglia e dos astrócitos, a intensidade da resposta e o equilíbrio entre funções efetoras tóxicas ou reparadoras.

1.7 Justificativa

A ocorrência de inflamação cerebral é comum em cães com LVC cronicamente infectados, embora o envolvimento do SNC na doença seja subestimado. É sabido que o parasita pode infectar o SNC e que há alteração na expressão gênica no tecido favorecendo um ambiente pró-inflamatório. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes a patogenia das alterações cerebrais ainda não está completamente estabelecido. Investigar a expressão de miRNAs no tecido cerebral pode fornecer informações sobre como a resposta inflamatória é regulada nesse contexto. Assim, o presente estudo buscou a melhor compreensão da patogênese das alterações neurológicas causadas na LVC, por meio da avaliação da expressão de miRNA em cérebro de cães com leishmaniose.

1.8 Objetivos

Determinar através de RT-qPCR a existência de miRNAs diferencialmente expressos no tecido nervoso de cães com LVC.

2 CAPÍTULO 1 – EXPRESSÃO DE MICRORNAS NO CÉREBRO DE CÃES COM LEISHMANIOSE¹

2.1 Resumo

A desregulação da atividade dos microRNAs (miRNAs) pode estar envolvida em diversas doenças, uma vez que estes atuam regulando a expressão de proteínas fundamentais no sistema imunológico. A Leishmaniose Canina (LVC) é uma doença crônica e progressiva, que pode causar comprometimento no sistema nervoso central. Devido à inflamação sistêmica, a presença de alterações histopatológicas como meningite, coroidite e manguitos perivascularares é frequente em cães infectados. Visando à melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta inflamatória no cérebro durante a LVC, avaliamos a expressão de 28 miRNAs selecionados no tecido nervoso de dezesseis cães infectados com *L. Infantum*. Para compor um grupo controle, utilizamos amostras de cérebro de cinco cães cuja causa de morte não estava relacionada a processos infecciosos ou comprometimento do sistema nervoso central, com sorologia e PCR do baço negativos. Cortes histológicos de secções de cérebro dos cães corados com hematoxilina e eosina foram avaliados quanto a intensidade e distribuição de células inflamatórias. A expressão relativa dos miRNAs foi avaliada através de RTqPCR pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os miRNAs mir-19a-3p ($p=0.003450$), miR-219a-5p ($p=0.03113$), mir-451a ($p=0.0172$) e o mir-33a-5p ($p=0.0480$) foram menos expressos no cérebro de animais do grupo infectado em relação ao grupo controle (*down-regulation*). A análise de vias revelou que estes miRNAs podem atuar regulando genes presentes em vias cruciais para a resposta imune e neurodegeneração. Esses resultados fornecem novos insights sobre os mecanismos moleculares subjacentes à patogênese da leishmaniose no encéfalo de cães.

Palavras-chave: neuropatologia; neuroinflamação; *Leishmania infantum*

¹ Citações e referências conforme as normas da Revista Veterinary Parasitology (Anexo B).

2.2 Abstract

Dysregulation of the activity of microRNAs (miRNAs) may be involved in several diseases, as they act by regulating the expression of fundamental proteins in the immune system. Canine Leishmaniasis (CVL) is a chronic and progressive disease, which can cause impairment of the central nervous system. Due to systemic inflammation, the presence of histopathological changes such as meningitis, choroiditis and perivascular cuffs is common in infected dogs. Aiming to better understand the mechanisms involved in the inflammatory response in the brain during CanL, we evaluated the expression of 28 selected miRNAs in the nervous tissue of sixteen dogs infected with *L. Infantum*. To compose a control group, we used brain samples from five dogs whose cause of death was not related to infectious processes or involvement of the central nervous system, with negative serology and spleen PCR. Histological sections of dog brain sections stained with hematoxylin and eosin were evaluated for the intensity and distribution of inflammatory cells. The relative expression of miRNAs was evaluated through RTqPCR using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The miRNAs mir-19a-3p ($p=0.003450$), miR-219a-5p ($p=0.03113$), mir-451a ($p=0.0172$) and mir-33a-5p ($p=0.0480$) were less expressed in the brain of animals from the infected group in relation to the control group (down-regulation). Pathway analysis revealed that these miRNAs may act by regulating genes present in pathways crucial to the immune response and neurodegeneration. These results provide new insights into the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of leishmaniasis in dog's brain.

Keywords: neuropathology; neuroinflammation; *Leishmania infantum*

2.3 Introdução

A Leishmaniose Visceral Canina (LCan ou LVC) é uma doença crônica, sistêmica e progressiva, que promove um amplo espectro de sinais clínicos, podendo acometer qualquer órgão do animal. Os mecanismos imunológicos envolvidos na suscetibilidade e progressão da infecção ainda não foram completamente estabelecidos (Hosein et al., 2017), mas sabe-se que a resposta

imune é considerada órgão-específica e que o tipo de resposta desenvolvida determina a evolução da doença (Reis et al., 2009).

A resposta inflamatória desenvolvida no SNC é única e complexa; e é sabido que estímulos crônicos periféricos desencadeiam a ativação de micróglia e astrócitos, considerados células da imunidade inata no tecido nervoso (Negi; Das, 2018). Em virtude dos mediadores inflamatórios produzidos sistemicamente na LVC, a doença pode promover alterações no sistema nervoso central (SNC) (Melo et al., 2015; Melo et al., 2017). Em cães, tanto o sistema nervoso central como o periférico podem ser afetados pela leishmaniose. Dentre os sinais clínicos neurológicos relatados em cães com LVC, podem ser citadas a ocorrência de convulsões generalizadas, comportamento atípico, fotofobia, agressão transitória, tetraplegia, andar em círculos, alterações vestibulares e cerebelares (Gianuzzi et al., 2017).

Embora poucos animais desenvolvam sinais clínicos neurológicos, alterações histopatológicas como meningite, coroidite e alterações morfológicas indicativas de ativação da micróglia e de astrócitos são observadas em grande parte dos cães infectados (Oliveira et al., 2017; Melo et al., 2011; Melo et al., 2009). A presença de vasculite, focos de micro hemorragias e múltiplos infartos também é relatada, embora com menor frequência (Garcia-Alonso et al., 1996; Márquez et al., 2013), além de depósitos amiloides, degeneração neuronal e neuroniofagia (Ikeda et al., 2007).

Alterações na barreira hematoencefálica (BHE) (Melo et al., 2015) e hematóliquorica (Silva et al., 2023) foram identificadas no cérebro de cães infectados, associadas ao aumento da expressão de genes no tecido nervoso com funções pró-inflamatórias, como interleucina (IL) -1 β , IL-6, interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α e o receptor *Toll Like* (TRL)-4 (Grano et al., 2018; Melo et al., 2017; Melo et al., 2015).

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificantes capazes de regular a expressão de genes alvo em nível pós-transcricional. No SNC, as interações miRNA-alvo são complexas e podem afetar muitos processos, incluindo morte neuronal, neurogênese, angiogênese, agregação plaquetária, modulação da micróglia e astrócitos, infiltração de leucócitos e até disfunção da BHE (Slota and Booth, 2019). Diversos fatores, como a presença de promotores específicos, interações com proteínas ligantes e modificações epigenéticas influenciam diretamente a expressão dos miRNAs (Bartel, 2004). A desregulação de diversos

miRNAs foi documentada em condições neuropatológicas em humanos e em cães (Mármol-Sánchez et al., 2023), no entanto, a literatura ainda é escassa em relação a expressão de miRNAs no SNC em doenças infecciosas, especialmente as causadas por protozoários.

Na LVC, estudos recentes identificaram diversos miRNAs diferencialmente expressos em cães infectados, sugerindo sua participação na regulação da expressão gênica e na resposta imune durante a infecção. Os miR-148a, mir-194, mir-150 tiveram seus níveis de expressão correlacionados com a gravidade da infecção e/ou com a carga parasitária dos animais. Ainda, a expressão diferencial do miR-21 e do miR-148a foi associada à polarização das respostas do tipo Th1/Th2 (Costa et al., 2024; Melo et al., 2019; Rebech et al., 2023; Soares et al., 2023).

No contexto da neuroinflamação, os miRNA operam modulando a expressão de genes que podem promover ou restringir a sinalização inflamatória, sendo determinantes na diferenciação da micróglia e astrócitos no fenótipo pró ou anti-inflamatório. Entre os miRNAs relacionados à ativação da micróglia, os alvos diretos da maioria dos miRNAs estão dentro da via do fator de transcrição NF-kapa B (NF-kB), indicando o importante papel desta via na ativação da mesma (Guo et al., 2019).

Considerando as alterações histopatológicas observadas no cérebro de cães com LVC e o aumento da expressão de genes com funções pró-inflamatórias identificados no cérebro desses animais, é possível que miRNAs estejam envolvidos na regulação de vias determinantes para a imunopatogênese da leishmaniose cerebral. Nossos achados sugerem que a expressão diferencial de miRNAs, incluindo a diminuição significativa de miR-19a, miR-219a, miR-451a e miR-33a nos cérebros dos cães com LVC, está associada a genes alvo presentes em vias cruciais para a resposta imune e neurodegeneração. Esses resultados fornecem novos insights sobre os mecanismos moleculares subjacentes à patogênese da leishmaniose no encéfalo de cães.

2.4 Métodos

2.4.1 Ética

Todos os procedimentos e métodos utilizados no estudo foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da FOA, UNESP, Araçatuba/SP, nº 739/2022 (Anexo A).

2.4.2 Animais

Para compor o grupo infectado, foram selecionados 16 cães adultos que apresentavam alterações histopatológicas no SNC, com idades entre 1 e 5 anos, sem raça definida, 12 machos e 4 fêmeas, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba/SP. Os cães apresentavam pelo menos três sinais clínicos compatíveis com LVC, como linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, onicogrifose e/ou lesões dermatológicas. Para confirmação do diagnóstico de LVC, foi realizado exame citológico de linfonodo e baço, sendo incluídos cães com exame parasitológico positivo em pelo menos um dos tecidos avaliados; teste sorológico ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, sendo considerados positivas amostras com densidade óptica acima de 0,270 (Lima et al., 2003) e a quantificação da presença de DNA do parasito em amostras de baço por qPCR (Real Time Quantitative PCR) (Toz et al., 2013). Exames complementares como hemograma e avaliação bioquímica sérica de perfil hepático e renal foram realizados, visando a determinação do estadiamento clínico dos animais segundo Solano-Gallego et al., 2009.

O grupo controle consistiu em cinco cães com diagnóstico negativo para LVC (sorologia e PCR), provenientes de regiões não endêmicas para a doença. A causa da morte dos cães do grupo controle não estava relacionada a doenças infecciosas e/ou enfermidades com comprometimento encefálico e os mesmos não apresentavam alterações significativas no hemograma ou avaliação bioquímica.

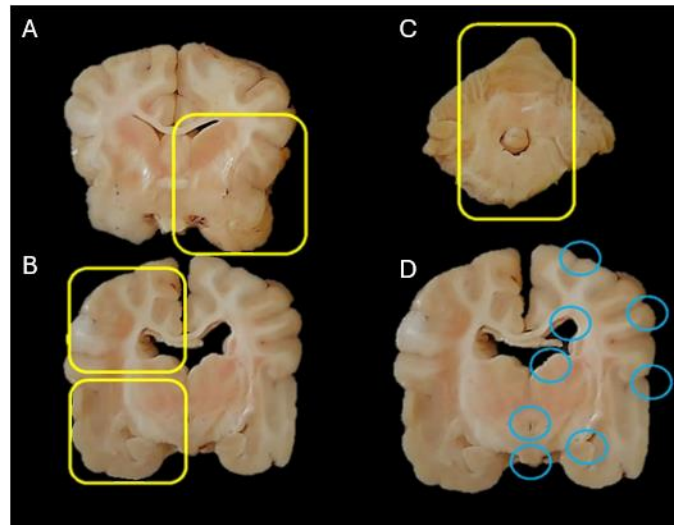
2.4.3 Colheita de material

Os cães foram submetidos à eutanásia de acordo com a Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe detalhadamente sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. A colheita de sangue para avaliação hematológica e bioquímica foi realizada antes da eutanásia. Posteriormente, os animais foram submetidos à necropsia para exame macroscópico e colheita de amostras de tecidos.

Para a avaliação histopatológica, foram realizados cortes coronais de um hemisfério cerebral, selecionando áreas pré-determinadas, incluindo o córtex temporal e piriforme, tálamo, hipocampo, bulbo, cerebelo e plexo coroide ventricular, fixados em formalina 10%. Posteriormente, as secções foram submetidas ao processamento histológico convencional.

Para a avaliação molecular, do hemisfério cerebral contralateral, foram colhidos fragmentos de cerca de 0,5 cm³ das regiões periventricular e meníngea, incluindo o tálamo, hipocampo, substância branca periventricular, córtex temporal parietal e córtex piriforme (Figura 1). Esses fragmentos, assim como fragmentos do baço, foram armazenados em solução preservadora de RNA (RNAlater®, Applied Biosystems, AM7020) e estocados a - 80°C até o processamento.

Figura 1 - Cortes coronais de encéfalo de cão para ilustração das áreas encefálicas avaliadas.



Legenda: A- Corte coronal passando pelo quiasma óptico. No retângulo amarelo destacamos a região de núcleos da base. B – Corte coronal passando pelo infundíbulo hipofisário. Destacadas as áreas que incluem o diencéfalo, hipocampo, lobo piriforme e lobo temporal. C – Corte coronal de tronco encefálico passando pelos pedúnculos cerebelares. D – Os círculos azuis indicam as regiões de onde foram colhidas amostras para compor um pool para pesquisa de miRNA (periventricular e perimeníngeo).

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

2.4.4 Avaliação histopatológica e imunohistoquímica do cérebro

Cortes de 5 μ m corados com HE foram utilizados para avaliação histopatológica do cérebro. As regiões avaliadas incluíram o plexo coroide, meninges, região subependimária e região subpial, além do hipocampo e tálamo. A avaliação da presença de infiltrado leucocitário foi conduzida de forma semiquantitativa, graduando a presença de células inflamatórias em discreta, moderada ou acentuada, com distribuição focal, multifocal ou difusa. Para determinação de um escore inflamatório, foram atribuídos graus de 0 a 3 de acordo com a intensidade e localização do infiltrado inflamatório observado (Melo et al., 2009). O grau 0 foi atribuído a cães com ausência de inflamação. O grau 1 foi atribuído à animais com infiltrado discreto e focal nas meninges e no plexo coroide, enquanto o grau 2 foi atribuído aos animais com infiltrado moderado nas meninges e plexo coroide, mas com a presença de alguns linfócitos no parênquima cerebral. O

grau 3 foi atribuído aos cães que apresentavam infiltrado moderado a acentuado em duas ou mais regiões avaliadas, além da presença de manguitos perivasculares.

Para a confirmação e melhor caracterização da presença de infiltrado inflamatório nas regiões destacadas, foram realizadas reações de imunohistoquímica para detecção de linfócitos TCD3 nos cortes de cérebro dos cães com LVC, utilizando o anticorpo anti-CD3 (A0452, Dako), de acordo com o protocolo do fabricante.

2.4.5 Carga parasitária do baço

A extração de DNA do baço dos animais foi realizada utilizando o kit AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop™, Thermo Fisher) para verificação da pureza (260/280) e quantidade. A reação de qPCR foi realizada utilizando o equipamento Eppendorf Mastercycler® RealPlex2, SYBR Green JumpStart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich) e os primers 5'-CTGGATCATTTTCCGATG e 5'-TGATACCACTTATCGCACTT, que amplificam o transcrito interno 1 (ITS1) do parasito, em um volume total de 25 µl, em duplicata. As condições de amplificação foram 94°C por 2 min, 40 ciclos de 94°C por 15 s e 60°C por 1 min. As amostras foram submetidas a uma curva de dissociação de 60°C a 95°C; aumentando 0,5°C a cada 5 seg. A quantificação absoluta foi avaliada utilizando uma curva padrão com dez diluições (10^7 a 10^1) em série de DNA extraído de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR00/MER02).

2.4.6 Seleção dos miRNAs

Para selecionar os miRNAs a serem utilizados, uma pesquisa sistemática na literatura foi conduzida no banco de dados PubMed, usando várias palavras-chave: *microRNA and dog brain*; *microRNA and astrocytes*, *microRNA and microglia*, *microRNA and neuroinflammation*, *microRNA and central nervous system injury*, *microRNA and neuronal infection*, *microRNA and inflammatory response*, *regulatory function of microRNAs in astrocytes*, *regulatory function of microRNAs in microglia* e *CNS microRNA profiles and dog*.

A partir desta pesquisa inicial, selecionamos 28 miRNAs (Tabela S1) que demonstraram envolvimento pró ou anti-inflamatório em cães com alta frequência nas palavras-chaves pesquisadas, especialmente os descritos na literatura como bastante expressos no tecido nervoso de cães normais e/ou em diferentes condições inflamatórias. Além destes, foram escolhidos os miRNAs diferencialmente expressos associados à resposta inflamatória em cães na leishmaniose (Bragato et al., 2018).

2.4.7 Avaliação da expressão de miRNAs

A extração dos miRNAs do *pool* de amostras das regiões periventriculares e peri-meníngeas do cérebro dos cães foi realizada utilizando o kit AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. O RNA total extraído foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop™, Thermo Fisher) para verificação da pureza (260/280) e quantidade. O cDNA foi sintetizado a partir do kit miRCURY LNA RT Kit (Qiagen), utilizando o UniSp6 RNA Spike-in como controle da reação.

A expressão relativa dos miRNAs foi avaliada por Real time Qpcr (RT-qPCR), utilizando sequências disponíveis comercialmente e com similaridade comprovada com miRNAs caninos (Koenig et al., 2016). Os ensaios foram realizados em placas customizadas confeccionadas para PCR miRNA miRCURY (Qiagen), com genes para normatização das reações, além dos primers para os miRNAs alvos selecionados. Para cada amostra, foram realizadas 32 reações, sendo 28 miRNAs alvos e 4 controles de normatização exógenos (UniSp6 e UniSp3 RNA Spike In). Os resultados de *Ct* obtidos foram avaliados através da plataforma Gene Globe Analyses (Qiagen). A quantificação da expressão gênica foi avaliada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, segundo (Livak and Schmittgen, 2001), obtendo-se os valores de *fold change* e *fold regulation* para cada um dos miRNAs avaliados em relação ao grupo controle.

Para a determinação de genes de referência endógenos, uma vez que a literatura carece de padronização quanto a miRNAs estáveis no cérebro de cães (Varvil and dos Santos, 2023), utilizamos os softwares Normfinder (Andersen et al., 2004) e Genorm (Vandesompele et al., 2002) para verificar o índice de estabilidade dos miRNAs em nossas amostras. Assim, selecionamos dois genes de referência

endógenos (hsa-miR-148a-3p e hsa-miR-340-5p) cujos valores de estabilidade se mostraram adequados nos dois softwares (Tabela 1). Ambos os softwares fornecem um valor de estabilidade para cada gene; e valores de estabilidade mais baixos indicam maior estabilidade do gene. O NormFinder considera não apenas a média da expressão gênica entre amostras, mas também a variabilidade entre grupos de amostras. Já o GeneNorm utiliza o algoritmo de média geométrica de pares para estimar a estabilidade dos genes candidatos.

Tabela 1 - Fator de estabilidade dos genes de referência endógenos de acordo com o NormFinder e Genorm.

miRNA	Fator de Estabilidade	
	NormFinder	Genorm
hsa-miR-148a-3p	0.16	0.2085
hsa-miR-340-5p	0.11	0.2092

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

2.4.8 Previsão de alvos e análise de vias

Para previsão de possíveis genes alvos e vias relacionadas aos miRNAs diferencialmente expressos, foi realizada uma busca nas plataformas MirDB (Chen and Wang, 2020), mirWalk(Sticht et al., 2018) e TargetScan (Agarwal et al., 2015). Os genes alvos listados em pelo menos duas dessas plataformas foram utilizados para análise funcional.

A análise de enriquecimento foi realizada através da plataforma GProfiler (Reimand et al., 2016), que utiliza as bases de dados públicas Gene Ontology (GO) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) para determinar as funções biológicas e as vias metabólicas associadas aos genes diferencialmente expressos. Os dados de GO e vias enriquecidas (KEGGS) com $p < 0.05$ envolvidos na resposta imune ou relacionados ao sistema nervoso central foram destacados.

2.4.9 Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., CA, USA). A significância entre as médias de dois grupos foi analisada pelo teste t pareado ($p > 0.05$).

2.5 Resultados

2.5.1 Achados clínicos e laboratoriais

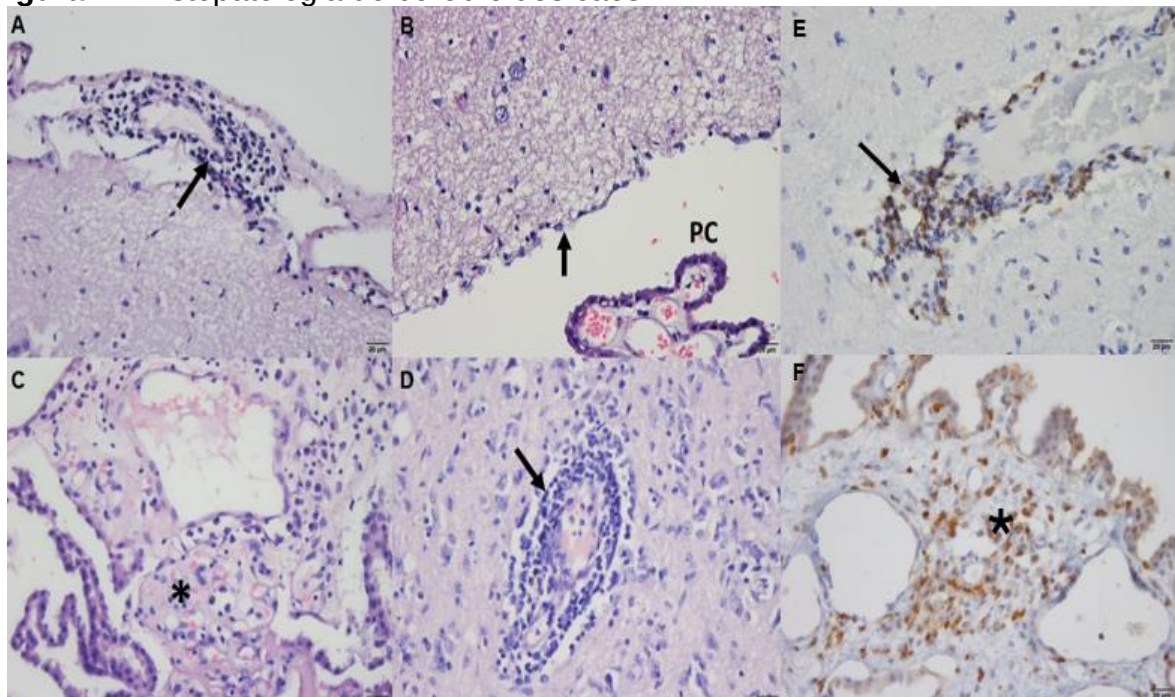
Todos os dezesseis cães incluídos no grupo infectado no estudo apresentaram teste sorológico ELISA e qPCR do baço positivos para *Leishmania spp.* (Tabela S2). Os cães possuíam pelo menos três sinais clínicos compatíveis com a doença, destacando-se a linfadenomegalia (10/16), hepatoesplenomegalia (8/16) e alterações cutâneas difusas (8/16). Nenhum dos animais apresentava sinais clínicos neurológicos ou alterações macroscópicas no sistema nervoso central. Dentre as alterações laboratoriais observadas (Tabela S3), a presença de anemia foi a mais frequente (13/16), seguida pela hiperproteïnemia (10/16) e trombocitopenia (8/16). Assim, considerando as alterações clínicas e laboratoriais observadas, bem como o resultado do teste ELISA, 7 cães (7/16) foram classificados no estágio I, com apenas alterações laboratoriais discretas, 8 (8/16) animais no estágio II, apresentando sinais clínicos discretos associados a anemia e hiperglobulinemia discretas; e um (1/16) no estágio III, apresentando alterações bioquímicas significativas.

2.5.2 Lesões histopatológicas do tecido nervoso

A avaliação histopatológica do cérebro dos cães com LVC revelou a presença de alterações compatíveis com infiltrado mononuclear, linfoplasmocítico (Figura 2, A, B, C e D), principalmente na região de plexo coróide, leptomeninges e região subependimária, em sua maioria discreto e focal, principalmente na região de plexo coróide e meninge. Foi observada presença de células inflamatórias no parênquima

cerebral e/ou presença de manguitos perivasculares em sete cães (Tabela S3). A presença de células inflamatórias foi confirmada na avaliação imunohistoquímica para detecção de linfócitos TCD3⁺ (Figura 2, E, F). A presença de gliose reativa também foi observada, principalmente nas regiões periventriculares, com distribuição focal a difusa. Astrogliose foi observada de forma discreta e difusa em todo o parênquima cerebral. Sete cães (7/16) apresentaram alterações histopatológicas no cérebro compatíveis com o escore inflamatório 3, que consiste em infiltrado moderado a acentuado em duas ou mais regiões avaliadas. O escore 2 foi atribuído a seis (6/16) animais, que possuíam infiltrado discreto a moderado em pelo menos uma região; e três (3/16) animais foram classificados com o escore 1, caracterizado por infiltrado discreto em apenas uma região. Os cães pertencentes ao grupo controle não apresentavam alterações histopatológicas nos cortes de cérebro avaliados.

Figura 2 - Histopatologia do cérebro dos cães.



A – Região de meninge de cão infectado com LVC demonstrando infiltrado inflamatório mononuclear focal acentuado (seta). B – Região subependimária de cão infectado com LVC, evidenciada pela presença do plexo coróide (PC), demonstrando presença discreta de células inflamatórias difusa. C – Plexo coróide de cão infectado com LVC apresentando infiltrado inflamatório mononuclear acentuado (*). D – Manguito perivascular no cérebro de cão com LVC (seta). E – Manguito perivascular no cérebro de cão com LVC, destacando a presença de linfócitos T CD3⁺ imunomarcados (Imunohistoquímica, DAB). F – Pléxo coroide de cão com LVC, evidenciando a presença de linfócitos T CD3⁺ imunomarcados (Imunohistoquímica, DAB). A, B, C e D – Hematoxilina eosina, Obj. 40x.

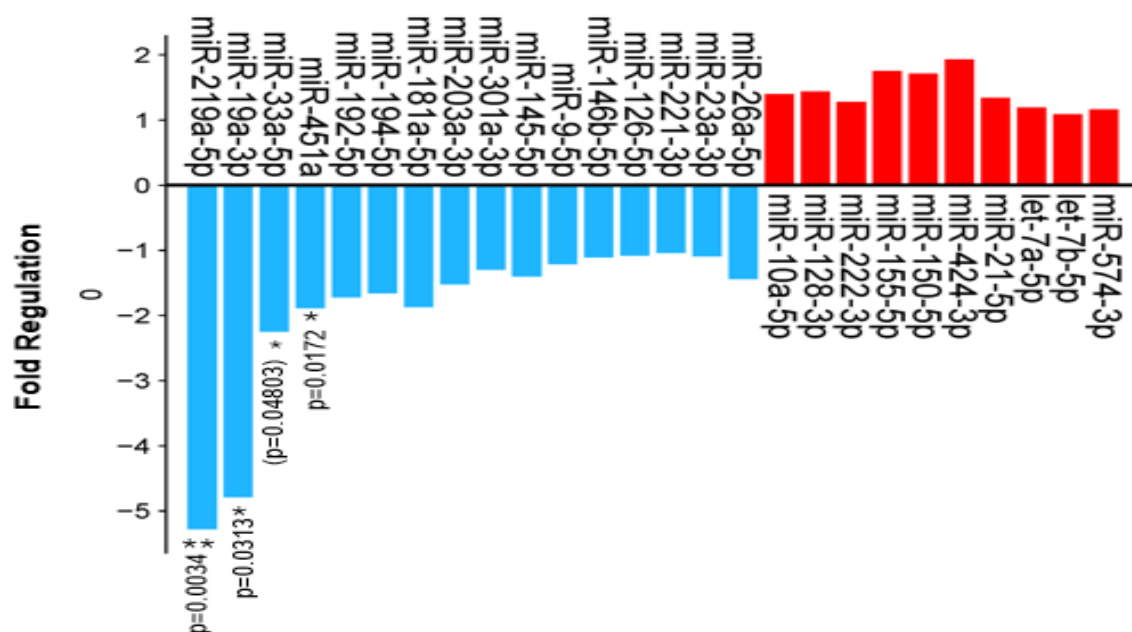
2.5.3 Carga parasitária

A carga parasitária do baço dos cães no estudo foi avaliada por meio de qPCR. A reação de amplificação no baço obteve valores de eficiência de 87%, r^2 0,996 e *slope* -3,67. Todos os 16 cães foram positivos no PCR do baço e os valores de carga parasitária variaram entre $4,1 \times 10^1$ e $9,5 \times 10^5$ ng de DNA/ 10 mg de tecido, sumarizados na Tabela S2. Não foi observada correlação entre a carga parasitária no baço e a presença/intensidade da inflamação no cérebro de cães com LVC.

2.5.4 Expressão relativa dos miRNAs

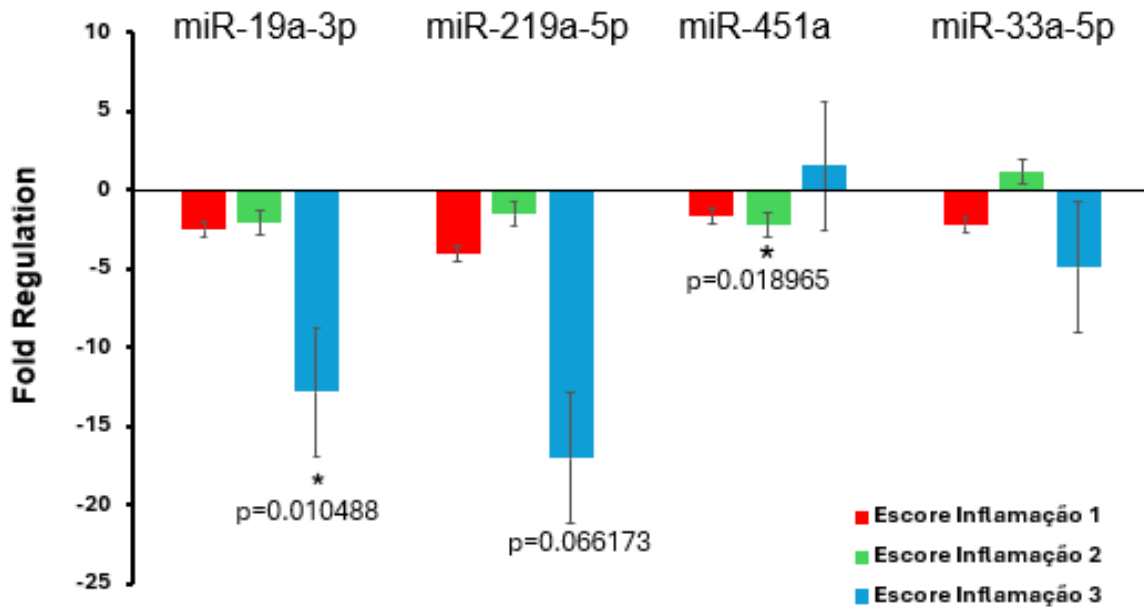
A quantificação da expressão gênica foi avaliada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$, segundo Livak e Schmittgen (2001), para determinação dos valores de *fold change* e *fold regulation* dos cães com LVC em relação ao grupo controle para cada um dos miRNAs avaliados (Tabela S4). Os miRNAs mir-19a-3p ($p=0.0034$), miR-219a-5p ($p=0.0311$), mir-451a ($p=0.0172$) e o mir-33a-5p ($p=0.0480$) foram menos expressos no cérebro de animais do grupo infectado em relação ao grupo controle (*down-regulation*) (Figura 3). Ao avaliar a expressão desses miRNAs de acordo com o escore inflamatório dos animais, observou-se que os animais classificados como escore inflamatório 3 obtiveram valores de *fold regulation* ainda menores para os miR-19a e mir-219a-5p (Figura 4), embora apenas o miR-19a-3p tenha sido significativamente menos expresso ($p=0.10488$) no grupo mais inflamado. O mir-451a foi significativamente menos expresso nos animais com escore inflamatório 2 ($p=0.018965$). Não foi observada diferença estatística significativa nos valores de *fold regulation* nos demais miRNAs analisados com relação ao grupo controle ou entre os cães com LVC com diferentes escores inflamatórios.

Figura 3 - Expressão relativa (*fold regulation*) dos miRNAs avaliados no cérebro dos cães com LVC em relação ao grupo controle. Os miRNAs mir-19a-3p ($p=0.00345$), miR-219a-5p ($p=0.0311$), mir-451a ($p=0.0172$) e o mir-33a-5p ($p=0.04803$) foram menos expressos nos cães do grupo infectado em relação ao grupo controle (*down-regulation*).



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Figura 4 - Expressão relativa (*fold regulation*) dos miRNAs em relação ao grupo controle de acordo com o escore inflamatório do cérebro dos cães com LVC. O miR-19a-3p foi significativamente menos expresso nos animais com maior intensidade de inflamação no cérebro ($p=0.0104$). O mir-451a foi significativamente menos expresso nos animais com escore inflamatório 2 ($p=0.0189$).



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

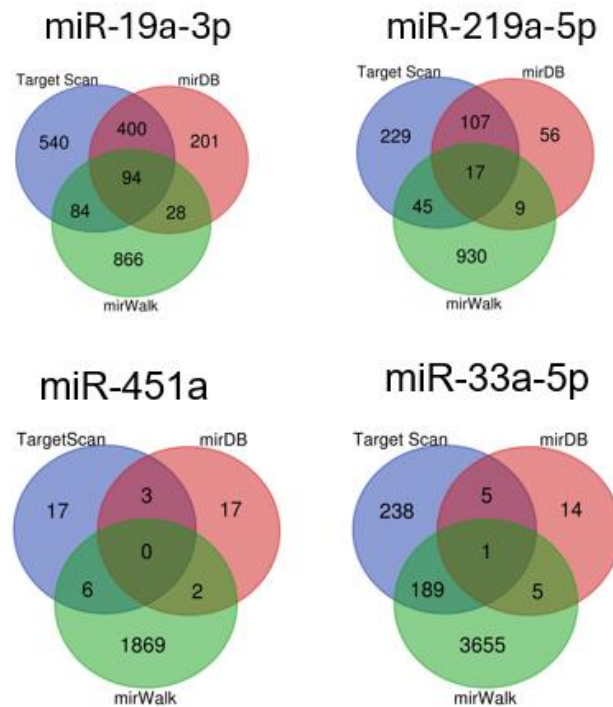
2.5.5 Previsão de alvos e vias

A pesquisa de genes alvos para cada um dos miRNAs diferencialmente expressos foi realizada em três bases de dados, TargetScan, mirDB e mirWalk (Figura 5). Os genes alvos previstos em pelo menos duas plataformas foram utilizados para a análise de enriquecimento na plataforma GProfiler, totalizando 992 genes. Os resultados de enriquecimento de vias (KEGG) e GO com p valor significativo ($p<0.05$) e com envolvimento em respostas imunes celulares ou relacionados ao sistema nervoso central foram destacados (Figura 6).

Constatamos que os miRNAs diferencialmente expressos executam funções fisiológicas e patológicas no tecido nervoso, estando associados à genes alvo presentes em vias de resposta do sistema imune como dos receptores T e receptores *Toll Like* (TRL), via JAK-STAT, produção de fator de necrose tumoral

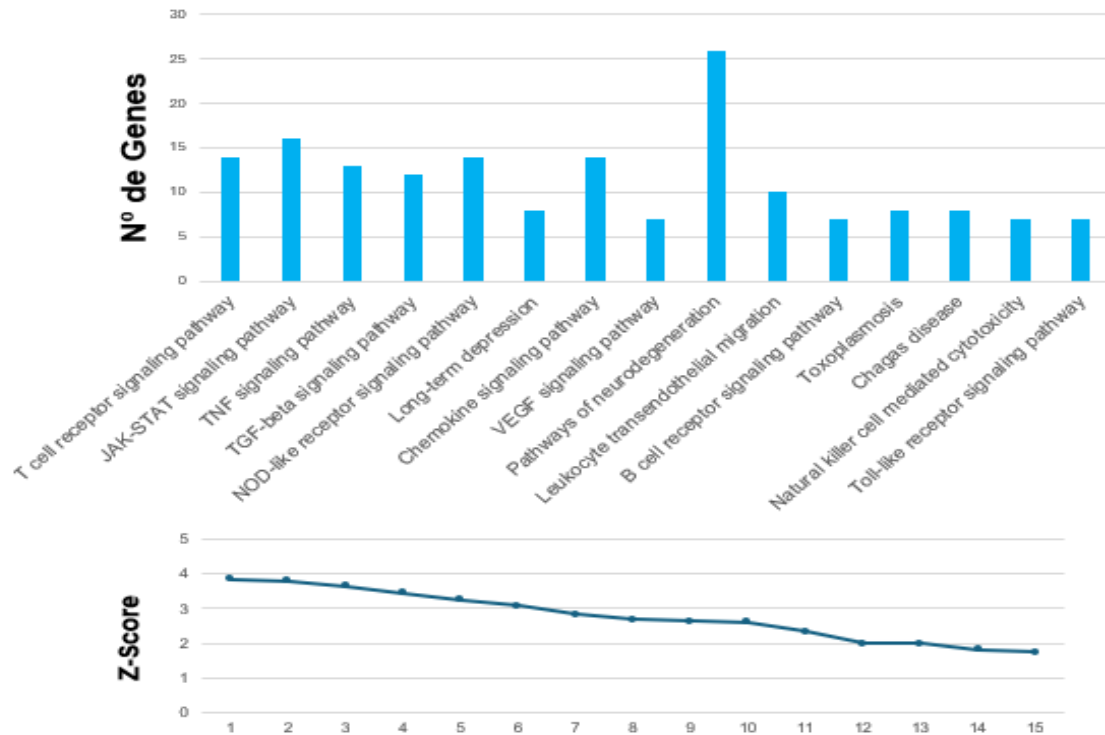
(TNF) e de quimiocinas, migração transendotelial leucocitária e resposta mediada por células Natural Killer (NK), além de vias relacionadas a neurodegeneração e depressão sináptica (Tabela S5).

Figura 5 - Previsão de genes alvos de acordo com as plataformas TargetScan, mirDB e mirWalk. Os genes anotados em pelo menos duas das plataformas foram utilizados para a análise de enriquecimento.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Figura 6 - Análise de enriquecimento de vias de genes alvos dos miRNAs cuja expressão foi significativamente menor no grupo infectado. Destacamos 15 vias com $p > 0.05$ importantes para o sistema imune e relacionadas ao sistema nervoso central/Leishmaniose.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

2.6 Discussão

Em nosso trabalho, investigamos a expressão diferencial de miRNAs no cérebro de cães com LVC em relação a um grupo controle, associando-os as alterações histopatológicas presentes no cérebro dos animais.

As alterações inflamatórias observadas na histopatologia no cérebro de cães com LVC neste estudo foram semelhantes as alterações descritas em trabalhos anteriores (Melo et al., 2009; Sakamoto et al., 2013), que descrevem a presença de infiltrado inflamatório linfoplasmocítico discreto a moderado em meninges, plexo

coróide, região subependimária e regiões perivasculares, além de reatividade glial e de astrócitos (Melo & Machado, 2011).

Observamos que os miRNAs mir-19a ($p=0.00345$), miR-219a ($p=0.0311$), mir-451a ($p=0.0172$) e o mir-33a (0.04803) foram menos expressos nos cães do grupo infectado em relação ao grupo controle (*down-regulation*).

Em nosso trabalho, o miR-19a foi quatro vezes menos expresso no cérebro dos cães doentes. A diminuição foi ainda mais significativa nos cães classificados no escore inflamatório 3, no qual o mesmo foi cerca de doze vezes menos expresso. Na inflamação periférica, dados de expressão genética baseados em *microarray* demonstraram um número significativo de genes da resposta imune regulados pelo miR-19, sugerindo que há uma relação entre o miR-19 e a inflamação (Li et al., 2020). Ainda, estudos apontam que a expressão de miR-19 é essencial para aumentar a capacidade das células T efectoras para produzir IFN- γ , favorecendo sua diferenciação a uma resposta Th1 (Jiang et al., 2011). Já no sistema nervoso, no contexto da neuroinflamação, há poucos estudos que destacam o mir-19, mas seu papel já foi estudado em gliomas (Wang et al., 2018) e lesões de isquemia-reperfusão (Liu et al., 2021; Zhou et al., 2021).

Um estudo recente detectou maior ativação da micróglia na presença de *mimics* do mir-19a e mir-19b, com aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da expressão de genes supressores da sinalização de citocinas (SOCS), possivelmente através das vias NF- κ B e JAK-STAT (Sahebdel, 2023). A modulação da via NF- κ B pelo mir-19 foi descrita na inflamação induzida por LPS em camundongos, através de genes alvos reguladores negativos da sinalização do NF- κ B, como o A20, o RNF11 e o ZBTB16. Ao regular negativamente estes genes, o estudo sugere que o miR-19a pode aumentar a atividade do NF- κ B, conduzindo a um aumento da expressão de genes pró-inflamatórios (Gantier et al., 2012).

Uma vez que em nosso estudo detectamos uma diminuição significativa da expressão do miR-19a no tecido nervoso de cães com LVC, é possível que este miRNA atue na doença visando manter a micróglia em um estado quiescente. A diminuição do miR-19 pode levar ao aumento da expressão de SOCS, possivelmente pela via JAK-STAT, que se mostrou enriquecida.

O mir-219 também apresentou regulação negativa no cérebro dos cães com LVC em relação ao grupo controle, sendo de cinco vezes menos expresso nos cães

com LVC e 17 vezes menos expresso no grupo infectado com escore inflamatório três. Estudos demonstraram que o miR-219 desempenha um papel crucial na regulação da diferenciação de precursores neurais, especialmente na diferenciação de oligodendrócitos durante o desenvolvimento, na mielinização e regulação da atividade neural (Hu et al., 2016).

Na resposta neuroinflamatória, o miR-219 tem como alvo genes que favorecem a ativação da micróglia e astrócitos, assim, o aumento de sua expressão visa atenuar a neuroinflamação e proteger contra danos neuronais, com importante destaque na prevenção de convulsões (Zheng et al., 2016). Esta modulação ficou evidente em um estudo investigando o papel do mir-219 em lesões na medula espinhal de camundongos, que evidenciou seu papel na supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e ROS, possivelmente mediada pela regulação do gene NEUROD2 (Zhu et al., 2019). A expressão gênica de IL-1 β , TNF- α e INF- γ (Melo et al., 2013) é marcadamente aumentada no cérebro de cães com LVC, o que pode estar relacionado com a acentuada diminuição do mir-219 observada em nossos resultados, embora outros miRNAs não investigados também possam estar envolvidos.

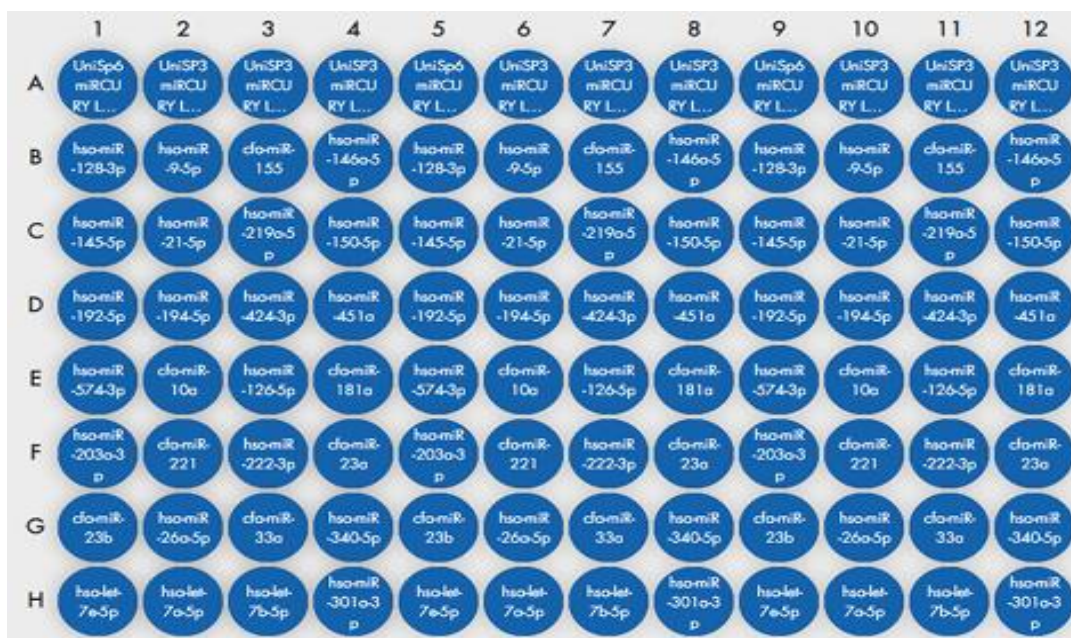
Em nosso estudo, o miR-451a foi significativamente menos expresso no tecido nervoso dos cães com LVC, com diminuição significativa nos cães classificados com escore inflamatório 2. Curiosamente, os animais com escore inflamatório 3 apresentaram uma regulação positiva do miR-451a, embora sem diferença estatística em relação ao grupo controle. Em um estudo com *mimics* do miR-451a *in vitro*, verificou-se a capacidade deste miRNA de inibir a ativação microglial desencadeada por LPS, reduzindo a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão do marcador de ativação da micróglia IBA-1. Ainda, o miR-451a foi capaz reverter a ativação microglial induzida por citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α , tendo como alvo o receptor TLR4 (Sun and Zhang, 2018). Na LVC, é descrito o aumento da expressão de TLR4 no cérebro de cães com LVC (Grano et al., 2018). Visto que em nossos resultados o miR-451a teve sua expressão diminuída nos cães menos inflamados e aumentada nos cães mais inflamados, é possível que a expressão diferencial deste miRNA também atue visando diminuir a ativação microglial e reduzir os danos da neuroinflamação.

2.7 Conclusão

Diante da complexidade que envolve a patogenia da reação inflamatória no cérebro na LVC, nossos achados sugerem que a expressão diferencial de miRNAs, incluindo a diminuição significativa de miR-19a, miR-219a, miR-451a e miR-33a, está associada a genes alvo presentes em vias cruciais para a manutenção do ambiente inflamatório no cérebro. Embora a neuroinflamação seja um mecanismo protetor, a neuroinflamação crônica pode induzir neurotoxicidade e está relacionada com a neurodegeneração. Esses resultados fornecem novos insights sobre os mecanismos moleculares subjacentes à patogênese da leishmaniose no encéfalo de cães.

2.8 Informações de Apoio

Figura S1 - Placa customizada com os miRNAs e normalizadores.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024

Tabela S1 – MiRNAs avaliados no estudo.

(Continua)

miRNA cão	miRNA humano	Acesso MiRBase	Função	Referência
cfa- miR- 128	hsa-miR- 128-3p	MI0008032	Supressão da neuroinflamação e mantém o estado quiescente da micróglia	Guo et al., 2019
cfa- miR-9	hsa-miR- 9-5p	MI0008125	Regula a resposta imune adaptativa e inata, influenciando a polarização de macrófagos e a expressão de citocinas	Koenig et al., 2016
cfa- miR- 155	hsa-miR- 155-5p	MI0008078	Promove a ativação da micróglia e astrócitos, produção de citocinas pró- inflamatórias, como IL-6 e IL- 1 β	Gaudet et al., 2018
cfa- miR-19	hsa-miR- 19-5p	MI0008051	Produção de citocinas Th1 e proliferação de células T CD4+	Jiang et al., 2011
cfa- miR-21	hsa-miR- 21-5p	MI0008165	Supressão da neuroinflamação	Bragato et al., 2018
cfa- miR- 219-1	hsa-miR- 219-5p	MI0008007	Regulação da atividade neural	Koenig et al., 2016
cfa- miR- 150	hsa-miR- 150-5p	MI0007998	Diferencialmente expresso na LVC	Bragato et al., 2018
cfa- miR- 192	hsa-miR- 192-5p	MI0008031	Diferencialmente expresso na LVC	Bragato et al., 2018
cfa- miR- 194	hsa-miR- 194-5p	MI0008091	Diferencialmente expresso na LVC	Bragato et al., 2018
cfa- miR- 424	hsa-miR- 424-3p	MI0008169	Diferencialmente expresso na LVC/ Inibe a ativação de micróglia e a astrogliose	Bragato et al., 2018
cfa- miR- 451	hsa-miR- 451a	MI0010367	Diferencialmente expresso na LVC	Bragato et al., 2018
cfa- miR- 574	hsa-miR- 574-3p	MI0008080	Diferencialmente expresso na LVC	Bragato et al., 2018

Tabela S1 – MiRNAs avaliados no estudo.

(Conclusão)

miRNA cão	miRNA humano	Acesso MiRBase	Função	Referência
cfa-miR-10a	hsa-miR-10a-5p	MI0008161	Ativação da micróglia, lesão em neurônios	Nejad et al., 2018
cfa-miR-126	hsa-miR-126-5p	MI0008154	Homeostase vascular, resposta imune inata	Nejad et al., 2018
cfa-miR-181a 1	sa-miR-181a-5p	MI0008126	Ativação da micróglia e via NF-KB	Nejad et al., 2018
cfa-miR-203	hsa-miR-203a	MI0010363	Ativação da micróglia	Nejad et al., 2018
cfa-miR-221	hsa-miR-221-3p	MI0008183	Disfunção da barreira hematoencefálica	Nejad et al., 2018
cfa-miR-222	hsa-miR-222-3p	MI0010346	Anti-inflamatório	Nejad et al., 2018
cfa-miR-23a	hsa-miR-23a-3p	MI0008039	Polarização da micróglia	Nejad et al., 2018
cfa-miR-23b	hsa-miR-23b-3p	MI0008008	Polarização da micróglia	Nejad et al., 2018
cfa-miR-26a-1	hsa-miR-26a-5p	MI0008058	Pró-inflamatório	Nejad et al., 2018
cfa-miR-33	hsa-miR-33a-5p	MI0007988	Doenças neurodegenerativas	Nejad et al., 2018
cfa-let-7a-1	hsa-let-7a-5p	MI0007989	Atua na ativação de receptores TRL	Nejad et al., 2018
cfa-let-7b	hsa-let-7b-5p	MI0010329	Atua na ativação de receptores TLR	Nejad et al., 2018
cfa-miR-301a	hsa-miR-301a-3p	MI0010348	Ativação da micróglia	Nejad et al., 2018

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Tabela S2 – Dados gerais dos cães incluídos no experimento.

Cão	Idade	Sexo	ELISA D.O.*	Carga Parasitária Baço (ng DNA/ 10ng de tecido)	Estadiamento Clínico **
C1	Adulto	M	1,421	2,38E+02	II
C2	Adulto	M	1,426	7,00E+01	II
C3	Adulto	M	1,336	1,16E+03	I
C4	Adulto	M	1,251	7,70E+02	II
C5	Adulto	M	1,430	3,19E+03	II
C6	Adulto	M	0,617	2,93E+02	II
C7	1 ano	F	0,805	2,70E+03	I
C8	4 anos	F	0,733	2,15E+03	II
C9	Adulto	M	0,523	9,57E+04	II
C10	Adulto	M	0,678	7,85E+02	I
C11	Adulto	M	1,328	7,70E+02	I
C12	Adulto	F	0,617	1,50E+03	I
C13	Adulto	F	0,412	4,13E+01	I
C14	Adulto	M	1,350	5,39E+03	I
C15	Adulto	M	1,577	6,86E+02	III
C16	Adulto	M	1,535	1,68E+04	II
Controle 1	Adulto	M	0,069	Negativo	
Controle 2	Adulto	M	0,138	Negativo	
Controle 3	Adulto	M	0,124	Negativo	
Controle 4	Adulto	F	0,024	Negativo	
Controle 5	Adulto	M	0,114	Negativo	

*Ponto de Corte ELISA: *Leishmania* (0,270). ** Solano-Gallego et al. (2009).

Tabela S3 – Avaliação hematológica e bioquímica.

Animal	Hemograma					Exames Bioquímicos										
	Eritrócitos x10 ⁵ /µl	Hemoglobina g/dl	VG %	Leucócitos /µl	Segmentados /µl	Linfócitos /µl	Monócitos /µl	Eosinófilos /µl	Plaquetas x10 ³ /µl	PPT g/dl	ALT (U/L)	FA (U/L)	PT (mg/dL)	Albumina (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Ureia (mg/dL)
C1	3,04	6,8	20	10900	8066	2725	109	0	200	9,4	15	59	8,16	2,84	1,12	65
C2	3,45	8,003	25	15200	12464	1520	456	760	160	9,3	73	71	13,2	2,36	1,13	100
C3	6,77	14,003	43	15900	11130	3180	318	1272	260	9,2	26	27	8,2	2,9	0,86	36
C4	2,8	5,336	17	11900	9996	714	476	714	60	7,7	16	100	7,8	0,86	1,09	51
C5	4,51	10,003	31	10100	8181	909	404	606	160	10	34	100	5,4	2,33	1,39	73
C6	4,84	9,9	29	15500	11625	2325	930	620	200	14	24	20	14,3	1,96	1	31
C7	6,86	13,5	43	13600	7208	5440	272	680	170	7,4	23	111	8,2	3,21	0,8	53
C8	3,34	7,4	24	6400	4224	1664	364	128	96	7,6	11	79	7,5	1,59	1,2	135
C9	4,78	11,1	35	12200	7686	3172	488	854	90	8	36	43	8	2,43	1,8	130
C10	2,08	4,4	13	2800	0	0	0	0	20	6	50	51	12,3	2,3	0,7	20
C11	5,44	10,4	34	7800	5694	1404	156	546	160	12	22	189	5,7	1	0,6	75
C12	5,26	10	31	11000	6380	3850	440	330	90	9,4	64	71	9	2,07	0,5	21
C13	3,14	6,2	22	6900	3664	1449	1311	276	40	11	49	56	11	4,5	0,5	207
C14	4,46	10,2	35	42200	37516	1808	5876	0	584	8,9	72	107	11,4	2,77	0,5	78
C15	5,78	13,2	36	4200	2856	1008	336	0	162	9,6	142	40	9,5	3	15,5	491
C16	4,75	9,8	31	11700	10072	936	351	0	146	6,6	27	468	6,6	2,18	0,8	27
Controle 1	6,87	14,336	44	18000	13135	2590	1110	1665	300	7	23	32	9,4	2,17	1,07	24
Controle 2	7,43	15,4	47	8100	6156	324	162	1458	320	7,6	42	23	7,56	2,58	1,13	27
Controle 3	8,08	17	48	15300	9488	2295	459	3060	120	7,3	72	21	6,7	4,12	1,03	26
Controle 4	7,85	18,003	55	12900	11352	903	645	0	200	7,7	46	78	7,5	3,68	1,15	10
Controle 5	7,04	14,67	45	14500	11600	1160	725	1015	150	9	23	32	9,4	2,17	1,07	24

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Tabela S4 – Avaliação da inflamação no cérebro dos cães com LVC.

Inflamação / Presença Células CD3+					
Cão	Meninge	Plexo	Subepêdima	Parênquima	Escore
C1	+ F	++ D			2
C2	+ D	++ M	+ D	+ F	3
C3	+++ M	++ D	+ F	+ F	3
C4	+ F	+ F			1
C5	++ M	++ D	+ F		2
C6	+ M	+ F	+ M		2
C7	++ D	++ F	+ F		2
C8	++ D	++ F	++ F	+ F	3
C9	+ F	++ F		+ F	3
C10	++ M		+++ F	++ M	3
C11	+M	+ ++F	++F	++M	3
C12		+M			1
C13	++M	++F			2
C14	++D	+M			2
C15	+++M	+D	++M	++F	3
C16	+F	+F			1

*Presença discreta (+), moderada (++) ou acentuada (+++), com distribuição focal (F), multifocal (M) ou difusa (D). ** Escore 1 = infiltrado discreto e focal nas meninges e no plexo coroide; escore 2 = infiltrado moderado nas meninges e plexo coroide, mas com a presença de alguns linfócitos no parênquima cerebral; escore 3 = infiltrado moderado a acentuado em duas ou mais regiões avaliadas, além da presença de manguitos perivasculares.

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Tabela S5 – Valores de *fold change*, *fold regulation* e p valor.

MicroRNA	Infetados			Escore Inflamatório 1			Escore Inflamatório 2			Escore Inflamatório 3		
	Fold Change	Fold Regulation	p valor	Fold Change	Fold Regulation	p valor	Fold Change	Fold Regulation	p valor	Fold Change	Fold Regulation	p valor
miR-21-5p	1.34	1.34	0.312989	1.97	1.97	0.003308	0.95	-1.06	0.987078	1.53	1.53	0.268315
miR-146b-5p	0.90	-1.11	0.875088	0.53	-1.87	0.644298	0.78	-1.28	0.750587	1.27	1.27	0.583234
miR-19a-3p	0.21	-4.79	0.003450	0.39	-2.55	0.167787	0.48	-2.08	0.082135	0.08	-12.85	0.010488
miR-155-5p	1.75	1.75	0.320827	1.23	1.23	0.945923	0.89	-1.13	0.884309	3.62	3.62	0.110593
miR-128-3p	1.44	1.44	0.385805	0.63	-1.58	0.989722	1.93	1.93	0.304729	1.59	1.59	0.384418
let-7a-5p	1.19	1.19	0.368682	0.50	-2.01	0.183483	0.79	-1.27	0.950753	2.47	2.47	0.107987
let-7b-5p	1.09	1.09	0.453863	0.48	-2.08	0.304948	0.76	-1.32	0.878842	2.11	2.11	0.172216
miR-181a-5p	0.54	-1.87	0.408612	0.24	-4.10	0.029448	0.66	-1.52	0.860491	0.63	-1.59	0.340034
miR-203a-3p	0.66	-1.52	0.716360	0.73	-1.38	0.731808	0.90	-1.11	0.942290	0.48	-2.07	0.534584
miR-9-5p	0.83	-1.21	0.929412	0.33	-3.02	0.153693	0.85	-1.18	0.847794	1.19	1.19	0.381608
miR-145-5p	0.71	-1.40	0.447033	1.09	1.09	0.908038	0.76	-1.31	0.945813	0.56	-1.78	0.028897
miR-219a-5p	0.19	-5.28	0.031382	0.25	-4.02	0.354021	0.65	-1.54	0.311821	0.06	-17.06	0.068173
miR-150-5p	1.71	1.71	0.256550	1.20	1.20	0.663579	1.09	1.09	0.458759	2.93	2.93	0.108533
miR-192-5p	0.58	-1.72	0.251037	0.35	-2.87	0.110143	0.47	-2.11	0.105839	0.86	-1.16	0.853984
miR-194-5p	0.60	-1.66	0.094474	0.39	-2.55	0.117800	0.54	-1.85	0.086205	0.79	-1.26	0.434350
miR-424-3p	1.93	1.93	0.320815	0.91	-1.10	0.605742	1.89	1.89	0.442290	2.73	2.73	0.168529
miR-451a	0.53	-1.89	0.017209	0.62	-1.62	0.297402	0.37	-2.69	0.018965	0.67	-1.50	0.181105
miR-574-3p	1.16	1.16	0.520271	0.57	-1.75	0.384783	0.52	-1.94	0.218405	3.12	3.12	0.193904
miR-128-5p	0.93	-1.08	0.780100	0.72	-1.39	0.514910	0.53	-1.89	0.225030	1.69	1.69	0.488098
miR-10a-5p	1.40	1.40	0.403529	0.21	-4.71	0.107148	0.55	-1.83	0.222711	7.06	7.06	0.168107
miR-221-3p	0.96	-1.04	0.989428	0.72	-1.38	0.467842	3.03	3.03	0.295289	0.41	-2.46	0.237654
miR-222-3p	1.28	1.28	0.379551	1.41	1.41	0.648800	2.53	2.53	0.101574	0.68	-1.46	0.911300
miR-26a-5p	0.70	-1.44	0.381880	0.48	-2.08	0.182299	0.59	-1.70	0.244553	0.94	-1.06	0.967144
miR-33a-5p	0.44	-2.25	0.0480302	0.44	-2.27	0.545050	1.12	1.12	0.374407	0.20	-4.95	0.161540
miR-23a-3p	0.91	-1.09	0.764625	0.85	-1.18	0.396528	0.66	-1.51	0.534229	1.25	1.25	0.353945
miR-301a-3p	0.77	-1.30	0.004173	0.58	-1.72	0.069012	1.29	1.29	0.129371	0.55	-1.80	0.019977

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Tabela S6. Vias enriquecidas, genes alvos e p valor.

KEGG	Genes Alvo	p valor
<i>T cell receptor pathway</i>	ZNF385B, MAPK8, PDPK1, MAPK6, HMGN1, DKK1, KBTBD4, SLC49A3, SPARCL1, FUT9, CYBRD1, PTK7, WNT10B, LPIN2	0.00005
<i>JAK-STAT signaling pathway</i>	SYNPR, GHR, MTOR, TRIM9, MAPK6, SPPL3, HMGN1, BAIAP2, DKK1, KBTBD4, SPARCL1, TMEM168, SOCS5, MBOAT2, LPIN2, SCN7A	0.00007
<i>TNF signaling pathway</i>	SLCO1C1, MAPK8, TRAF3, NONO, CDK8, KBTBD4, SPARCL1, FUT9, PIP4K2C, PTK7, TAF4, ARHGEF10L, POLDIP2	0.00012
<i>TGF-beta signaling pathway</i>	SKI, TGFB1, SMAD7, ADCY9, ARFGAP3, ANKRD6, WNT10B, MBOAT2, BAMBI, WNT10B, GPHN, ZFYVE9	0.00028
<i>NOD-like receptor</i>	SLCO1C1, CDKN2C, MAPK8, TRAF3, KRT27, MEIS1, MEIS2, FUT9, ATG16L1, PTK7, TENT4B, MEIS2, PANX1, TACC1	0.00056
<i>Chemokine signaling pathway</i>	ZNF385B, ADCY9, MAPK6, HMGN1, MEIS2, NEUROG1, DKK1, KBTBD4, PTK7, ADCY9, SPARCL1, STAT5B, PRKACB, LPIN2	0.00219
<i>VEGF</i>	ZNF385B, HMGN1, DKK1, KBTBD4, SPARCL1, FUT9, PTK7	0.00365
<i>Leukocyte transendothelial migration</i>	ZRANB3, ADCY9, NEUROG1, KBTBD4, PTK7, SPARCL1, FUT9, IQSEC2, PTK7, FSTL4	0.00458
<i>B cell receptor</i>	ZNF385B, MAPK6, HMGN1, DKK1, KBTBD4, SPARCL1, LPIN2	0.00941
<i>Natural killer cell mediated cytotoxicity</i>	ZNF385B, MAPK6, HMGN1, DKK1, KBTBD4, SPARCL1, LPIN2	0.03336
<i>Toll-like receptor</i>	MAPK8, TRAF3, CDK8, KBTBD4, SPARCL1, FUT9, PTK7	0.03870
<i>Pathways of neurodegeneration</i>	ATRIP, VAPB, ZNF385B, ATP5J2, CAMK2G, SPPL3, MAPK8, MTOR, PDK2, HMGN1, TPGS1, FZD4, OLFM4, CDK8, MEIS2, DKK1, DKK1, MBOAT2, FUT9, MBOAT2, GRIN2A, MBOAT2, PTK7, CYBRD1, MEIS2, TACC1	0.00400
<i>Chagas disease</i>	TGFB1, MAPK8, WNT10B, MEIS2, KBTBD4, SPARCL1, FUT9, PTK7	0.02289
<i>Toxoplasmosis</i>	DKK1, MAPK8, LAMC1, PDPK1, CDK8, MTHFD2, FUT9, PTK7	0.02289

Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

2.9 Referências

- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., Bartel, D.P., 2015. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/elif.05005>
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 64, 5245–5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-04-0496>
- Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs. *Cell* 116, 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
- Bragato, J.P., Melo, L.M., Venturin, G.L., Rebech, G.T., Garcia, L.E., Lopes, F.L., de Lima, V.M.F., 2018. Data on differentially expressed miRNAs in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Data Brief* 17, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2018.01.007>
- Chen, Y., Wang, X., 2020. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 48, D127–D131. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz757>
- Costa, S.F., Soares, M.F., Poletto Bragato, J., dos Santos, M.O., Rebech, G.T., de Freitas, J.H., de Lima, V.M.F., 2024. MicroRNA-194 regulates parasitic load and IL-1 β -dependent nitric oxide production in the peripheral blood mononuclear cells of dogs with leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 18, e0011789. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011789>
- Gantier, M.P., Stunden, H.J., McCoy, C.E., Behlke, M.A., Wang, D., Kaparakis-Liaskos, M., Sarvestani, S.T., Yang, Y.H., Xu, D., Corr, S.C., Morand, E.F., Williams, B.R.G., 2012. A miR-19 regulon that controls NF- κ B signaling. *Nucleic Acids Res.* 40, 8048–8058. <https://doi.org/10.1093/nar/gks521>

- Garcia-Alonso, M., Nieto, C.G., Blanco, A., Requena, J.M., Alonso, C., Navarrete, I., 1996. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. *Parasite Immunol.* 18, 539–546. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-28.x>
- Gaudet, A.D., Fonken, L.K., Watkins, L.R., Nelson, R.J., Popovich, P.G., 2018. MicroRNAs: Roles in regulating neuroinflammation. *Neuroscientist* 24, 221–245. <https://doi.org/10.1177/1073858417721150>
- Giannuzzi, A.P., Ricciardi, M., De Simone, A., Gernone, F., 2017. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *J. Small Anim. Pract.* 58, 125–138. <https://doi.org/10.1111/jsap.12650>
- Grano, F.G., dos S. Silva, J.E., Melo, G.D., de Souza, M.S., Lima, V.M.F., Machado, G.F., 2018. Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 253, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.030>
- Guo, Y., Hong, W., Wang, X., Zhang, P., Körner, H., Tu, J., Wei, W., 2019. MicroRNAs in microglia: How do MicroRNAs affect activation, inflammation, polarization of microglia and mediate the interaction between microglia and glioma? *Front. Mol. Neurosci.* 12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00125>
- Hosein, S., Blake, D.P., Solano-Gallego, L., 2017. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitology* 144, 95–115. <https://doi.org/10.1017/s003118201600055x>
- Hu, X.-M., Cao, S.-B., Zhang, H.-L., Lyu, D.-M., Chen, L.-P., Xu, H., Pan, Z.-Q., Shen, W., 2016. Downregulation of miR-219 enhances brain-derived neurotrophic factor production in mouse dorsal root ganglia to mediate morphine analgesic tolerance by upregulating CaMKII γ . *Mol. Pain* 12, 174480691666628. <https://doi.org/10.1177/1744806916666283>

- Jiang, S., Li, C., Olive, V., Lykken, E., Feng, F., Sevilla, J., Wan, Y., He, L., Li, Q.-J., 2011. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. *Blood* 118, 5487–5497. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-355644>
- Ikeda, F.A., Dalastre, M., Corbett, C.E., Feitosa, M.M., Machado, G.F., Helena, S., Perri, V., 2007. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*
- Koenig, E.M., Fisher, C., Bernard, H., Wolenski, F.S., Gerrein, J., Carsillo, M., Gallacher, M., Tse, A., Peters, R., Smith, A., Meehan, A., Tirrell, S., Kirby, P., 2016. The beagle dog MicroRNA tissue atlas: identifying translatable biomarkers of organ toxicity. *BMC Genomics* 17. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2958-x>
- Li, J., Lin, T.-Y., Chen, L., Liu, Y., Dian, M.-J., Hao, W.-C., Lin, X.-L., Li, X.-Y., Li, Y.-L., Lian, M., Chen, H.-W., Jia, J.-S., Zhang, X.-L., Xiao, S.-J., Xiao, D., Sun, Y., 2020. miR-19 regulates the expression of interferon-induced genes and MHC class I genes in human cancer cells. *Int. J. Med. Sci.* 17, 953–964. <https://doi.org/10.7150/ijms.44377>
- Lima, V.M.F., Gonçalves, M.E., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C.R., Feitosa, M.M., 2003. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36, 485–489. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003000400010>
- Liu, X., Zheng, X., Wang, Y., Liu, J., 2021. Dysregulation serum miR-19a-3p is a diagnostic biomarker for asymptomatic carotid artery stenosis and a promising predictor of cerebral ischemia events. *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 27, 107602962110392. <https://doi.org/10.1177/10760296211039287>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Mármol-Sánchez, E., Heidemann, P.L., Gredal, H., Cirera, S., 2023. MicroRNA profiling of cerebrospinal fluid from dogs with steroid responsive meningitis-arteritis and meningoencephalitis of unknown origin. *Front. Vet. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1144084>
- Márquez, M., Pedregosa, J.R., López, J., Marco-Salazar, P., Fondevila, D., Pumarola, M., 2013. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 142–146. <https://doi.org/10.1177/1040638712466728>
- Matejuk, A., Vandenbark, A.A., Offner, H., 2021. Cross-talk of the CNS with immune cells and functions in health and disease. *Front. Neurol.* 12. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.672455>
- Oliveira, V. da C., Boechat, V.C., Mendes Junior, A.A.V., Madeira, M. de F., Ferreira, L.C., Figueiredo, F.B., Campos, M.P., de Carvalho Rodrigues, F. das C., Carvalhaes de Oliveira, R. de V., Amendoeira, M.R.R., Menezes, R.C., 2017. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. *PLoS One* 12, e0175588. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175588>
- Melo, G.D., Goyard, S., Fiette, L., Boissonnas, A., Combadiere, C., Machado, G.F., Minoprio, P., Lang, T., 2017. Unveiling Cerebral Leishmaniasis: Parasites and brain inflammation in *Leishmania donovani* infected mice. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09085-5>
- Melo, G. D., Grano, F.G., Silva, J.E.S., Kremer, B.E., Lima, V.M.F., Machado, G.F., 2015. Blood-brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol* 37, 635–645. <https://doi.org/10.1111/pim.12285>
- Melo, G.D., Machado, G.F., 2011. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: Correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. *Cell Tissue Res* 346, 293–304. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1290-7>

- Melo, G.D., Marcondes, M., Vasconcelos, R.O., Machado, G.F., 2009. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. *Vet Parasitol* 162, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.002>
- Melo, G.D., Seraguci, T.F., Schweigert, A., Silva, J.E.S., Grano, F.G., Peiró, J.R., Lima, V.M.F., Machado, G.F., 2013. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.002> *Vet Parasitol* 192, 57–66.
- Melo, Guilherme D., Silva, J.E.S., Grano, F.G., Souza, M.S., Machado, G.F., 2015. *Leishmania* infection and neuroinflammation: Specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally-infected dogs. *J Neuroimmunol* 289, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.10.004>
- Melo, L.M., Bragato, J.P., Venturin, G.L., Rebech, G.T., Costa, S.F., Garcia, L.E., Lopes, F.L., De Rezende Eugênio, F., Santos, P.S.P. Dos, De Lima, V.M.F., 2019. Induction of miR 21 impairs the anti-*Leishmania* response through inhibition of IL-12 in canine splenic leukocytes. *PLoS One*, 14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226192>
- Negi, N., Das, B.K., 2018. CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *Int Rev Immunol* 37, 57–68. <https://doi.org/10.1080/08830185.2017.1357719>
- Rebech, G.T., Bragato, J.P., Costa, S.F., de Freitas, J.H., Dos Santos, M.O., Soares, M.F., Eugênio, F. de R., Dos Santos, P.S.P., de Lima, V.M.F., 2023. miR-148a regulation interferes in inflammatory cytokine and parasitic load in canine leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011039>
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H., Vilo, J., 2016. g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res* 44, W83–W89. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKW199>

- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 128, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>
- Silva, J.E. dos S., Jussiani, G.G., Grano, F.G., Pelissari, M.C.C., de Melo, G.D., Negrão Watanabe, T.T., de Lima, V.F., Machado, G.F., 2023. Increased CCL-5 37 (RANTES) Gene Expression in the Choroid Plexus of Dogs with Canine Leishmaniosis. *Animals* 13. <https://doi.org/10.3390/ani13132060>
- Slota, J.A., Booth, S.A., 2019. MicroRNAs in neuroinflammation: Implications in disease pathogenesis, biomarker discovery and therapeutic applications. *Noncoding RNA*. <https://doi.org/10.3390/ncrna5020035>
- Soares, M.F., Costa, S.F., de Freitas, J.H., Rebech, G.T., dos Santos, M.O., de Lima, V.M.F., 2023. MiR-150 regulates the *Leishmania infantum* parasitic load and granzyme B levels in peripheral blood mononuclear cells of dogs with canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol* 320. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2023.109958>
- Sticht, C., De La Torre, C., Parveen, A., Gretz, N., 2018. Mirwalk: An online resource for prediction of microrna binding <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206239> regulators sites. *PLoS One* 13.
- Su, W., Aloj, M.S., Garden, G.A., 2016. MicroRNAs mediating CNS inflammation: Small with powerful <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.003> potential. *Brain Behav Immun*.
- Sun, X., Zhang, H., 2018. miR-451 elevation relieves inflammatory pain by suppressing microglial activation-evoked inflammatory response via targeting TLR4. *Cell Tissue Res* 374, 487–495. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2898-7>
- Toz, S.O., Culha, G., Zeyrek, F.Y., Ertabaklar, H., Alkan, M.Z., Vardarli, A.T., Gunduz, C., Ozbel, Y., 2013. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3, RESEARCH0034. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research003>
- Varvil, M.S., dos Santos, A.P., 2023. A review on microRNA detection and expression studies in dogs. *Front. Vet. Sci.* 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1261085>
- Wang, W., Zhang, A., Hao, Y., Wang, G., Jia, Z., 2018. The emerging role of miR-19 in glioma. *J Cell Mol Med.* <https://doi.org/10.1111/jcmm.13788> 38 the Zheng, H., Tang, R., Yao, Y., Ji, Z., Cao, Y., Liu, Z., Peng, F., Wang, W., Can, D., Xing, H., Bu, G., Xu, H., Zhang, Y. wu, Zheng, W., 2016. MiR-219 Protects Against Seizure in Kainic Acid Model of Epilepsy. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8981-5>
- Zhou, F., Wang, Y.K., Zhang, C.G., Wu, B.Y., 2021. miR-19a/b-3p promotes inflammation during cerebral ischemia/reperfusion injury via SIRT1/FoxO3/SPHK1 pathway. *J Neuroinflammation* 18. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02172-5>
- Zhu, Y., Xu, Q., Sha, W.-P., Zhao, K.-P., Wang, L.-M., 2019. MiR-219-5p promotes spinal cord injury recovery by inhibiting NEUROD2-regulated inflammation and oxidative stress. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 23, 37–43. https://doi.org/10.26355/eurrev_201901_16745

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, article e35671, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22693548/>. Acesso em: 23 mai. 2023.

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**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008. DOI: 10.1016/j.pt.2008.04.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18514028/>. Acesso em: 2 fev. 2023.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, Cambridge, v. 116, n. 2, p. 281-297, 2004. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14744438/>. Acesso em: 2 jun. 2023.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001. DOI: 10.1053/tvjl.2000.0556. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11531395/>. Acesso em: 2 jun. 2024.

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, article e0206876, p. 1-16, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0206876. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6281177>. Acesso em: 2 jun. 2024.

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, article e0265192, p. 1-15, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0265192. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35324917/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

BREGANO, L. C. **Genes da resposta imune inata e adaptativa diferencialmente expressos em cérebros de cães com Leishmaniose Visceral**. 2018. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2018.

BUFFI, G.; DIOTALLEVI, A.; CECCARELLI, M.; BRUNO, F.; CASTELLI, G.; VITALE, F.; MAGNANI, M.; GALLUZZI, L. The host micro-RNA cfa-miR-346 is induced in canine leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, London, v. 18, n. 1, article 247, p. 1-11, 2022. DOI: 10.1186/s12917-022-03359-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35761326/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

CONRAD, A. T.; DITTEL, B. N. Taming of macrophage and microglial cell activation by microRNA-124. **Cell Research**, Basingstoke, v. 21, n. 2, p. 213-216, 2011. DOI: 10.1038/cr.2011.9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3193438/>. Acesso em: 1 maio 2023.

COSTA, S. F.; SOARES, M. F.; BRAGATO, J. P.; SANTOS, M. O.; REBECH, G. T.; FREITAS, J. H.; LIMA, V. M. F. MicroRNA-194 regulates parasitic load and IL-1 β -dependent nitric oxide production in the peripheral blood mononuclear cells of dogs with leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 18, n.1, e0011789, p. 1-22, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011789>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38241360/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

FARAONI, I.; ANTONETTI, F. R.; CARDONE, J.; BONMASSAR, E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, Amsterdam, v. 1792, n. 6, p. 497-505, 2009. DOI: 10.1016/j.bbadis.2009.02.013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19268705/>. Acesso em: 2 maio 2024.

FREITAS, J. H.; BRAGATO, J. P.; REBECH, G. T.; COSTA, S. F.; SANTOS, M. O.; SOARES, M. F.; EUGÊNIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; LIMA, V. M. F. MicroRNA-21 and microRNA-148a affects PTEN, NO and ROS in canine leishmaniasis. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 14, article 1106496, p. 1-12, 2023. DOI: 10.3389/fgene.2023.1106496. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37124626/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, C. G.; BLANCO, A.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during Leishmania infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 539-546, 1996. DOI: 10.1046/j.1365-3024.1996.d01-28.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9226692/>. Acesso em: 1 jun. 2023.

GAUDET, A. D.; FONKEN, L. K.; WATKINS, L. R.; NELSON, R. J.; POPOVICH, P. G. MicroRNAs: roles in regulating neuroinflammation. **The Neuroscientist: a Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry**, Thousand Oaks, v. 24, n. 3, p. 221-245, 2018. DOI: 10.1177/1073858417721150. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28737113/>. Acesso em: 3 jun. 2024.

GERACI, N. S.; TAN, J. C.; MCDOWELL, M. A. Characterization of micro RNA expression profiles in Leishmania-infected human phagocytes **Parasite Immunology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 43-51, 2015. DOI: 10.1111/pim.12156. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25376316/>. Acesso em: 9.jan.2024.

GIANNUZZI, A. P.; RICCIARDI, M.; SIMONE, A.; GERNONE, F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by Leishmania infantum: descriptions of 10 cases and a review of the literature. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 125-138, 2017. DOI: doi: 10.1111/jsap.12650. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28267216/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

GIOVANNONI, F.; QUINTANA, F. J. The role of astrocytes in CNS inflammation.

Trends in Immunology, Oxford, v. 41, n. 9, p. 805–819, 2020. DOI:

10.1016/j.it.2020.07.007. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8284746/>. Acesso em: 3 jun. 2024.

GRANO, F. G.; MELO, G. D.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; GÓMEZ-NIETO, L. C.;

MACHADO, G. F. First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 204, n. 3-4, p. 376-380, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.05.015. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24893696/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

GRANO, F. G.; SILVA, J. E. S.; MELO, G. D.; SOUZA, M. S.; LIMA, V. M. F.;

MACHADO, G. F. Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 253, p. 30-38, 2018. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.02.030. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29605000/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

GRIMALDI Jr, G.; TESH, R. Leishmaniasis of the New World: current concepts and

implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993. DOI: 10.1128/CMR.6.3.23. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358284/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

GUEDES, J.; CARDOSO, A. L.; LIMA, M. C. P. Involvement of microRNA in

microglia-mediated immune response. **Clinical & Developmental Immunology**, London, v. 2013, article 186872, p. 1-11, 2012. DOI: 10.1155/2013/186872.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23762086/>. Acesso em: 3 jun. 2024.

GULYAEVA, L. F.; KUSHLINSKIY, N. E. Regulatory mechanisms of microRNA

expression. **Journal of Translational Medicine**, London, v. 14, n. 1, article 143, p. 1-10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0893-x> Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27197967/> Acesso em: 1 jun. 2024.

GUO, Y.; HONG, W.; WANG, X.; ZHANG, P.; KÖRNER, H.; TU, J.; WEI, W.

MicroRNAs in microglia: how do microRNAs affect activation, inflammation, polarization of microglia and mediate the interaction between microglia and glioma?

Frontiers in Molecular Neuroscience, Lausanne, v. 12, article 125, p. 1-14, 2019. DOI: 10.3389/fnmol.2019.00125. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31133802/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGU, L. Insights on adaptive and innate

immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, London, v. 144, n. 1, p. 95-115, 2017. DOI: 10.1017/S003118201600055X. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27094260/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

HUANG, X.; HUSSAIN, B.; CHANG, J. Peripheral inflammation and blood–brain

barrier disruption: effects and mechanisms. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 36-47, 2021. DOI: 10.1111/cns.13569. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33381913/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

IKEDA, F. A.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; FEITOSA, M. M.; MACHADO, G. F.; PERRI, S. H. V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2007. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26653. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26653>. Acesso em: 9 jun. 2024.

IORIO, M. V.; CROCE, C. M. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. **EMBO Molecular Medicine**, Chichester, v. 4, n. 3, p. 143–159, 2012. DOI: 10.1002/emmm.201100209. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22351564/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

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, 2014. DOI: 10.1177/0300985814521248. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24510947/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

KUMAR, V. Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 332, p. 16-30, 2019. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2019.03.012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30928868/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MA, F.; ZHANG, X.; YIN, K.-J. MicroRNAs in central nervous system diseases: a prospective role in regulating blood-brain barrier integrity. **Experimental Neurology**, Maryland Heights, v. 323, article 113094, p. 1-28, 2020. DOI: 10.1016/j.expneurol.2019.113094. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7304262/>. Acesso em: 3 jun. 2024.

MAIA, C. S. F.; MONTEIRO, M. C.; GAVIOLI, E. C.; OLIVEIRA, F. R.; ROMÃO, P. R. T. Neurological disease in human and canine leishmaniasis – clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 37, n. 8, p. 385-393, 2015. DOI: 10.1111/pim.12203. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25983042/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J. R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 25, n. 1, p. 142-146, 2013. DOI: 10.1177/1040638712466728. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23166183/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MATEJUK, A.; RANSOHOFF, R. M. Crosstalk between astrocytes and microglia: an overview. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 11, article 1416, p. 1-11, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01416. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378357/>. Acesso em: 3 jun. 2024.

MELO, G. D.; GOYARD, S.; FIETTE, L.; BOISSONNAS, A.; COMBADIÈRE, C.; MACHADO, G. F.; MINOPRIO, P.; LANG, T. Unveiling Cerebral Leishmaniasis: parasites and brain inflammation in *Leishmania donovani* infected mice. **Scientific Reports**, London, v. 7, article 8454, p. 1-13, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09085-5>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5559479/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MELO, G. D.; GRANO, F. G.; SILVA, J. E. S.; KREMER, B. E.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F. Blood-brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 635-645, 2015. DOI:

10.1111/pim.12285. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26434684/>.

Acesso em: 9 jan. 2024.

MELO, G. D.; MACHADO, G. F. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 346, n. 3, p. 293-304, 2011. DOI: 10.1007/s00441-011-1290-7. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22160561/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MELO, G. D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R. O.; MACHADO, G. F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs.

Veterinary Parasitology, Amsterdam, v. 162, n. 3-4, p. 248-256, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.002. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19362424/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MORALES, S.; MONZO, M.; NAVARRO, A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. **Biomolecular Concepts**, Berlin, v. 8, n. 5-6, p. 203–212, 2017. DOI: 10.1515/bmc-2017-0024. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29161231/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

NEGI, N.; DAS, B. K. CNS: not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. **International Reviews of Immunology**, London, v. 37, n. 1, p. 57-68, 2018. DOI: 10.1080/08830185.2017.1357719. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28961037/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

NEJAD, C.; STUNDEN, H. J.; GANTIER, M. P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 285, n. 20, p. 3695-3716, 2018. DOI: 10.1111/febs.14482. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29688631/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 9, article 402, p. 1-12, 2018. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30123182/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

OLIVEIRA, V. C.; BOECHAT, V. C.; MENDES JUNIOR, A. A. V.; MADEIRA, M. F.; FERREIRA, L. C.; FIGUEIREDO, F. B.; CAMPOS, M. P.; RODRIGUES, F. C. C.; OLIVEIRA, R. V. C.; AMENDOEIRA, M. R. R.; MENEZES, R. C. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PloS One**, San Francisco, v. 12, n. 4, article e0175588, p. 1-15, 2017. 10.1371/journal.pone.0175588. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28419136/>. Acesso em: 3 maio 2023.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. **Control of the leishmaniasis**. Geneva: OMS, 2010. 186 p. (WHO Technical Report Series, n. 949).

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS. **Leishmanioses**: informe epidemiológico nas Américas. Washington, D.C.: OPAS, 2020. 11 p. (Leishmaniasis Report, n. 9). Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53091>. Acesso em: 1 jun. 2024.

QUINN, S. R.; O'NEILL, L. A. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. **International Immunology**, Oxford, v. 23, n. 7, p. 421-425, 2011. DOI: 10.1093/intimm/dxr034. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21652514/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

REBECH, G. T.; BRAGATO, J. P.; COSTA, S. F.; FREITAS, J. H.; SANTOS, M. O.; SOARES, M. F.; EUGÊNIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; LIMA, V. M. F. miR-148a regulation interferes in inflammatory cytokine and parasitic load in canine leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 17, n.1, article e0011039, p. 1-19, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011039> Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36719867/> Acesso em: 1 jun. 2024.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.10.307. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19054576/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

SILVA, J. E. S.; JUSSIANI, G. G.; GRANO, F. G.; PELISSARI, M. C. C.; MELO, G. D.; WATANABE, T. T. N.; LIMA, V. F.; MACHADO, G. F. Increased CCL-5 (RANTES) Gene Expression in the Choroid Plexus of Dogs with Canine Leishmaniosis. **Animals: An Open Access Journal from MDPI**, Basel, v. 13, n. 13, article 2060, p. 1-14, 2023. DOI: 10.3390/ani13132060. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37443858/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

SLOTA, J. A.; BOOTH, S. A. MicroRNAs in neuroinflammation: implications in disease pathogenesis, biomarker discovery and therapeutic applications. **Non-coding RNA**, Basel, v. 5, n.2, article 35, p. 1-24, 2019. DOI: 10.3390/ncrna5020035. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6632112/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

SOARES, M. F.; COSTA, S. F.; FREITAS, J. H.; REBECH, G. T.; SANTOS, M. O.; LIMA, V. M. F. MiR-150 regulates the Leishmania infantum parasitic load and granzyme B levels in peripheral blood mononuclear cells of dogs with canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 320, article 109958, p. 1-8, 2023. DOI: 10.1016/j.vetpar.2023.109958 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37269731/> Acesso em: 1 jun. 2024.

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, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19559536/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G.; THE LEISHVET GROUP. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, London, v. 4, article 86, p. 1-16, 2011. DOI: 10.1186/1756-3305-4-86. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21599936/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

ANEXO A – COMISSÃO 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 "Expressão de mi-RNAs e polarização de micróglia no encéfalo de cães com Leishmaniose Visceral", Processo FOA nº 0739-2022, sob responsabilidade de Gisele Fabrino Machado apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Novembro de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Agosto de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Setembro de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Expression of MiRNAs and microglial polarization in the brain of dogs with visceral leishmaniasis", Protocol FOA nº 0739-2022, under the supervision of Gisele Fabrino Machado presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on November 30, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 30, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 30, 2024.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

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

ANEXO B – NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA VETERINARY PARASITOLOGY

GUIDE FOR AUTHORS

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Letters to the Editor
4. Book reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to one of the Book Review Editors noted below:

Dr G. Baneth
School of Veterinary Medicine,
Hewbrew University,
Rehovot,
Israel
gad.baneth@mail.huji.ac.il

Dr E. Papadopoulos
Faculty of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki,
Thessaloniki,
Greece
eliaspap@vet.auth.gr

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- We require that non-commercial product names are used throughout the text in submissions. You may include the commercial name(s) of products in the Material and Methods section, then use only the non-commercial name thereafter

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Animal Welfare

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from the following URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Veterinary Parasitology. Please include an animal welfare statement under the heading "Animal welfare statement" at the end of the text.

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We

suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example.](#)

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the **English Language Editing service** available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

A cover letter is required for each new submission. It should address the novelty and significance of the work and how it fits within the defined scope of Veterinary Parasitology. Essential information, issues of concern or potential problems, (such as other publications or submissions containing similar information) should be identified in the cover letter. Authors who submit papers based on local data/surveys will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the **Elsevier Support Center**. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Article Transfer Service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/VETPAR/default.aspx>.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our **Support Center**.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written

by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

If at all possible please refrain from sending chasers to the Editorial Office asking about the status of your paper under review, as the Editors aim to review your paper as efficiently as possible and the enquiry is unlikely to speed up the process.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscripts should have **numbered lines** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)
 Name(s) of author(s)
 Complete postal address(es) of affiliations
 Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author
 Present address(es) of author(s) if applicable
 Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent
 Abstract
 Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).
 Introduction
 Material studied, area descriptions, methods, techniques
 Results
 Discussion
 Conclusion
 Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.
 References
 Tables
 Figure captions
 Tables (separate file(s))
 Figures (separate file(s)).

Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

SI units should be used.

Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be clear, descriptive and not more than 400 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are advised to consult the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299-326).

Submission of sequence data to databases

New nucleotide or amino acid sequence data must be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank™, EMBL or DDJB, and an accession number obtained and submitted to the Publisher (at the latest) together with the final, revised manuscript. The accession number should appear in a separate paragraph in the Materials and Methods section (example: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers: XXXX, XXXX). In order for automatic links to be made between papers and databases, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. When published they will appear in normal type.

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Illustration services

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference Style

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruysse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to

supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <https://www.elsevier.com/locate/vetpar>. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>