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

RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE miRNAs EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO E CARGA PARASITÁRIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Jaqueline Poleto Bragato
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CÂMPUS DE ARAÇATUBA

RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE miRNAs EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO E CARGA PARASITÁRIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Jaqueline Poleto Bragato

Orientadora: Profª. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal)

ARAÇATUBA – SP
2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP
Bibliotecária Responsável: Ana Claudia M. Grieger Manzatti - CRB8-6315

B813r

Bragato, Jaqueline Poleto
Relação entre a expressão de miRNAs em células mononucleares de sangue periférico e carga parasitária na leishmaniose visceral canina / Jaqueline Poleto Bragato. -- Araçatuba: [s.n.], 2017.
63 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba.
Orientadora: Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima

1. Cão 2. Leishmaniose visceral 3. MicroRNA 4. Zoonose. I. Título

CDD 616.9364

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Relação entre a expressão de miRNA em células mononucleares de sangue periférico e carga parasitária na leishmaniose visceral canina

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO
ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara/Unesp

Araçatuba, 14 de dezembro de 2017.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Relação entre a expressão de miRNA em células mononucleares de sangue periférico e carga parasitária na leishmaniose visceral canina

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO
ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp

Profa. Dra. ALEXANDRA IVO DE MEDEIROS
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara/Unesp

Araçatuba, 14 de dezembro de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jaqueline Poleto Bragato – Natural de Presidente Prudente/SP, nascida em 22 de maio de 1993, filha de Neusa Poleto Bragato e Luiz Bragato. No ano de 2011 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) no campus de Araçatuba, onde se graduou como Médica Veterinária em dezembro de 2015. Durante o curso de graduação desenvolveu atividades de Iniciação Científica nas áreas de Imunologia (2013) e Reprodução Animal (2015), em ambas com bolsa FAPESP. Em março de 2016 iniciou o mestrado no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, sob orientação da Profª Adjunto Valéria Marçal Félix de Lima, inicialmente com bolsa CAPES e posteriormente com bolsa FAPESP. Em 21 de setembro de 2017 foi aprovada no Exame Geral de Qualificação com o trabalho intitulado "*Leishmania infantum* regulates miRNAs in PBMC, affecting parasite load, in dogs with Visceral Leishmaniasis", o qual faz parte desta dissertação.

EPÍGRAFE

"A única maneira de fazer um bom trabalho é amando o que você faz. Se você ainda não encontrou, continue procurando. Não se desespere. Assim como no amor, você saberá quando tiver encontrado."

Steve Jobs

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Luiz e Neusa, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por sempre guiar meus passos, me ajudando a ser uma pessoa melhor a cada dia e aprender com cada erro que apareceu no meu caminho.

Aos meus pais Luiz e Neusa, que sempre apoiaram todas as minhas decisões e nunca mediram esforços para me ajudar em qualquer situação, mesmo estando a quilômetros de distância, devo a eles tudo que sou pessoal e profissionalmente. Agradeço também por sempre me proporcionarem o prazer de ter um animal em casa, e poder sentir assim o amor incondicional que eles têm por nós, o que me encorajou a seguir essa linda profissão.

Aos meus irmãos Luan e Luiz, minhas cunhadas Natalia e Adelita e meu sobrinho Victor, que me apoiam e estão presentes em todas as minhas conquistas.

As minhas amigas Juliana Vaccari e Natália Rahal, que moraram comigo em Araçatuba todo esse período, sou grata pela amizade e companheirismo em todos esses anos.

A minha orientadora Profª Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima, que desde a graduação aceitou me orientar na iniciação científica e posteriormente no mestrado, sou muito grata pela oportunidade e confiança depositada em mim.

Aos amigos do laboratório: Larissa, Gabriela Venturin, Gabriela Rebech, Flávia, Fabiana, Marilene e Sidnei, que sempre estavam prontos para ajudar com os experimentos e tornaram o ambiente do laboratório mais feliz e descontraído.

Ao colega Leandro Garcia, pela ajuda com os experimentos e análises, sempre pronto para ajudar.

A minha banca do exame geral de qualificação, Profª Gisele Fabrino Machado e Profª Flavia Lombardi Lopes, por todas as considerações que contribuíram muito para melhorar meu trabalho.

A CAPES por conceder bolsa de mestrado e a FAPESP pelo financiamento do projeto e por conceder bolsa de mestrado (2016/02359-4).

SUMÁRIO

Página

CAPÍTULO 1..... 15

CONSEDERAÇÕES GERAIS..... 16

1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da LV..... 16

2. Diagnostico..... 19

3. Resposta imune na LVC..... 20

3.1. Imunidade Inata..... 20

3.2. Imunidade Adaptativa..... 21

3.3. miRNAs e resposta imune..... 23

3.4. miRNAs e resposta imune na Leishmaniose..... 25

OBJETIVO GERAL..... 29

OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 29

REFERÊNCIAS..... 30

CAPÍTULO 2..... 40

RELATIONSHIP OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS miRNA EXPRESSION AND PARASITIC LOAD IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS..... 41

INTRODUCTION..... 42

METHODS..... 43

Screening of animals and collection of samples..... 43

Isolation of peripheral blood mononuclear cells..... 44

DNA extraction and determination of the *Leishmania* species..... 44

Quantification of the parasite load by real-time PCR..... 45

Extraction and quantification of miRNA..... 45

Microarray..... 46

Microarray data analysis..... 46

Real-time PCR for miRNAs analysis..... 46

Statistical analysis..... 47

RESULTS..... 47

Leishmania infantum specie was identified in dogs with VL..... 47

Differentially expressed microRNAs in the PBMC of dogs with VL compared to healthy dogs..... 49
Validation of miRNA expression in the blood of animals with CVL compared to healthy animals..... 50
Canonical pathways regulated by differentially expressed miRNAs in the blood of infected animals..... 51
Parasite load on PBMC and correlation with expression of microRNAs miR 194, miR 371 and miR 150 in dogs naturally infected with *L. infantum*..... 53
DISCUSSION..... 53
REFERENCES..... 57

RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE miRNAs EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO E CARGA PARASITÁRIA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

RESUMO - A Leishmaniose Visceral (LV) no homem é uma doença crônica e frequentemente fatal se não tratada. A doença possui alta taxa de mortalidade e a região de Araçatuba concentra grande número de casos no estado de São Paulo. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) constitui um grave problema de Saúde Pública, pois os animais infectados são potentes transmissores do parasita para humanos pelo vetor flebotomínio. O cão é, portanto, um alvo importante nas medidas de controle. A progressão da infecção canina é acompanhada por falha na imunidade celular com redução de linfócitos circulantes e citocinas que suprimem a função dos macrófagos. A função da célula T na indução da resposta celular é determinante para a eliminação do parasita no interior dos macrófagos. Embora a supressão imunológica já esteja caracterizada, os fatores determinantes são pouco conhecidos. Recentes estudos mostraram que a regulação da função efetora dos macrófagos e células T parece depender de microRNAs (miRNAs). Existem muitas evidências da função dos miRNAs na regulação da expressão de proteínas que são fundamentais para o desenvolvimento, função e diferenciação de vários tipos celulares do sistema imunológico. Uma desregulação da atividade dos miRNAs está envolvida em diversas doenças, incluindo a LV. Na LVC, devido a supressão imunológica celular ser determinante para a progressão da doença, o conhecimento de miRNAs associados a regulação imunológica pode ser importante para a mudança do padrão de resposta.

Palavras-chave: cão, Leishmaniose Visceral, microRNA, zoonose

RELATIONSHIP OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS miRNA EXPRESSION AND PARASITIC LOAD IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY - Visceral Leishmaniasis (VL) in humans is a chronic and often fatal disease if left untreated. The disease has high mortality rate, and the region of Araçatuba concentrates a large number of cases in São Paulo state. Canine VL (CVL) is a serious public health problem, because infected animals are potent transmitters of the parasite to humans by the vector phlebotomine. Therefore, dogs are important targets in the control measures. The progression of canine infection is accompanied by a failure of cellular immunity with reducing of circulating lymphocytes and cytokines that suppress the macrophage function. The role of T cells in the induction of cellular response is crucial to the elimination of the parasite in macrophages. Although immunosuppression is already characterized, the determining factors are not well known. In the last decade studies have shown that regulation of effector function of macrophages and T cells appears to depend on microRNAs (miRNAs). There are many evidences of function of miRNA in regulating of the expression of proteins that are primordial for the development, function and differentiation of various cell types of the immune system. A deregulation of miRNA expression is involved in a variety of disorders including VL. In CVL, due to cell immune suppression be determinant of disease progression, knowledge of miRNAs associated with immune regulation may be important for change the response pattern.

Keywords: dog, Visceral Leishmaniasis, microRNA, zoonosis

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Aspectos clínicos e epidemiológicos da LV

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (WHO, 2010). O gênero *Leishmania* compreende um grupo importante de parasitas que são os agentes causadores das leishmanioses, as quais apresentam manifestações clínicas de diferentes graus de severidade, desde assintomática, lesões cutâneas/mucocutâneas, até a forma mais severa que é a forma visceral (COLMENARES et al., 2002).

Leishmania (L.) spp. são parasitas digenéticos que se desenvolvem como promastigotas no tubo digestivo do vetor flebotomíneo e como amastigotas intracelulares nos macrófagos dos hospedeiros vertebrados (BARBIERI, 2006).

A LV é causada principalmente pela espécie *L. infantum*, e é a forma clínica mais severa das leishmanioses devido a frequentes complicações, podendo levar a morte se não tratada (PAHO, 2017).

A leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas do mundo e está entre as seis doenças tropicais mais importantes segundo a Organização Mundial da Saúde e acomete principalmente os países mais pobres e em desenvolvimento. Mais de 90% dos casos mundiais ocorrem em Bangladesh, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A incidência anual estimada da doença é de cerca de 200 a 400 mil novos casos (WHO, 2010).

Nas Américas a LV está presente em 12 países, sendo que 96% dos casos são no Brasil (PAHO, 2017). No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde, dos 27 estados, 22 já notificaram casos autóctones de LV em humanos, principalmente nas regiões norte, sudeste e nordeste (BRASIL, 2016). No estado de São Paulo, a doença foi notificada pela primeira vez no município de Araçatuba no ano de 1999, quando foi confirmado o primeiro caso canino autóctone no município (FEITOSA et al., 2000).

A migração para áreas urbanas contribuiu para a expansão da LV (DESJEUX, 2004). Além da alta incidência e ampla distribuição, a expansão em novas áreas também carrega a ameaça de que as formas graves e letais da doença podem surgir quando associada à desnutrição (GONTIJO; MELO, 2004) e infecção HIV.

A transmissão entre hospedeiros vertebrados no Novo Mundo é feita pela picada do flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis* (ALENCAR et al*.,* 1991), e no Velho Mundo pelo gênero *Phlebotomus* (MURRAY et al., 2005), porém outras espécies já foram identificadas como vetores da doença (DE PITA-PEREIRA et al., 2008). Mesmo com a dispersão dos flebotomíneos para quase todas as regiões do Brasil, a ausência do vetor em áreas onde existem casos de leishmaniose visceral sugere a existência de outros modos de transmissão da enfermidade (DANTAS-TORRES, 2009). Pulgas (OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2010) e carrapatos (DANTAS-TORRES, 2011; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2010) também já foram incriminados como possíveis transmissores de *L. Infantum*. Já foi descrita também a ocorrência de transmissão venérea (SILVA et al., 2009), vertical (BOGGIATTO et al., 2011; PANGRAZIO et al., 2009; ROSYPAL; LINDSAY, 2005) e por transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001).

Ao realizar o repasto sanguíneo em um vertebrado infectado, o flebotomíneo ingere amastigotas de *Leishmania* spp que se diferenciam em promastigotas e colonizam a faringe e o esôfago do vetor, onde se diferenciarão na forma promastigota infectante. O vetor infectado, ao picar um novo hospedeiro vertebrado, inocula as promastigotas no sangue, que são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico. Já no interior dos macrófagos, as promastigotas se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária de uma maneira tão intensa que os macrófagos se rompem liberando as amastigotas que serão novamente fagocitadas por novos macrófagos (BRASIL, 2003).

Uma ampla gama de mamíferos são reservatórios do parasito, particularmente roedores, edentados e marsupiais na leishmaniose cutânea e

caninos selvagens e domésticos na leishmaniose visceral (BARBIERI, 2006). Os cães são os principais reservatórios do parasito em ambiente doméstico (BANETH et al., 2008; MORENO; ALVAR, 2002).

O aumento no número de casos no homem tem sido relacionado ao aumento do número de casos da doença em cães (COURA-VITAL et al., 2011; NUNES et al., 2010). A LV é mais prevalente na população canina que na humana, além disso, a infecção no homem normalmente é precedida por casos caninos e cães apresentam maior quantidade de parasitos na pele do que o homem, fato que favorece a infecção dos vetores (SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). A prevalência de leishmaniose em cães de áreas endêmicas pode atingir 20 a 40% da população (SLAPPENDEL; FERRER, 1990), porém estudos epidemiológicos que utilizam técnicas moleculares em áreas endêmicas mostram que a prevalência de infecção canina pode ser consideravelmente maior que a soroprevalência e prevalência de doença (BANETH et al., 2008).

Após a alimentação de flebotomíneos no sangue dos cães, os parasitas rapidamente se espalham para os linfonodos e baço através da linfa e sangue e, eventualmente, atingem os rins e fígado. Eles podem também afetar os órgãos reprodutores, bexiga, o sistema digestivo, pele e respiratório (MOLYNEUX; ASHFORD, 1983).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasita pode causar lesões e sintomas que são característicos da LVC, embora alguns cães infectados possam ser oligo ou assintomáticos (MANCIANTI et al., 1988), outros podem evoluir para a cura espontânea (FISA et al., 1999). Os sinais mais frequentes de LVC são lesões na pele, linfadenopatia, onicogrifose, perda de peso, caquexia, febre e doença renal (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Além da sintomatologia clássica, o parasita pode eventualmente causar danos ao sistema reprodutor masculino (MIR et al., 2012) podendo inclusive ser detectado no sêmen (DINIZ et al., 2008). Alterações laboratoriais também são encontradas nos cães com LV, dentre elas anemia não regenerativa,

hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, trombocitopenia, proteinúria, azotemia renal, aumento de enzimas hepáticas (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

A forma assintomática representa 20 a 40% da população de soro positivos, dos quais 80%, na verdade, desenvolvem a doença (NOLI, 1999). No Brasil, em área urbana da região nordeste, a forma assintomática representa 30% da população soro positiva (QUEIROZ et al., 2009).

Em alguns cães os sinais clínicos da doença aparecem logo após a infecção, porém, em muitos animais a infecção é assintomática. No primeiro caso, os cães desenvolvem imunidade humoral predominante, podem ser identificados por sorologia, mas são incapazes de desenvolver uma imunidade celular efetiva. Por outro lado, os cães que não exibem sintomas da doença podem permanecer desta forma por anos ou por toda a vida. No entanto, uma alteração em seu estado imune, em decorrência de alguma enfermidade ou do uso de medicamentos imunossupressores, pode levar ao aparecimento dos sintomas da doença (BANETH et al., 2008).

Os fatores que causam a susceptibilidade à infecção nos cães ainda não foram completamente elucidados, mas fatores como sexo, nutrição, idade, genética do hospedeiro, doenças concomitantes, infecções anteriores, sistema imunossuprimido, produção de citocinas, quantidade de parasitas, virulência das espécies de *Leishmania* spp. e métodos de transmissão podem modificar as manifestações clínicas durante a infecção canina (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

2. Diagnóstico

O diagnóstico pode ser feito por diferentes métodos, porém é importante diferenciar a infecção por *Leishmania* spp. da doença, para aplicar o método diagnóstico mais indicado para cada estágio da doença. O diagnóstico clínico da LVC é complexo, e anormalidades clinico-patológicas baseadas em exames como hemograma, perfil bioquímico e urinálise não são específicos. Um diagnóstico clínico apropriado precisa ser adaptado para cada paciente, e também os cães podem ter doenças concomitantes que podem tornar o

diagnóstico diferencial mais complicado e diverso (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Os principais métodos diagnósticos utilizados incluem técnicas parasitológicas, como a citologia, histologia, imunohistoquímica e cultura, técnicas sorológicas quantitativas como ELISA e imunofluorescência, técnicas sorológicas qualitativas como testes rápidos e técnicas moleculares como PCR convencional, PCR em tempo real e “nested” PCR (SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Cães com LV tem aumento de imunoglobulinas de todas as classes (REIS et al., 2006b). O principal anticorpo que aumenta nos cães infectados é o IgG (PINELLI et al., 1994), portanto métodos sorológicos são os principais empregados na rotina clínica. O método sorológico de ELISA indireto tem sido empregado por ser um teste sensível, com facilidades técnicas e econômicas (LIMA et al., 2003). O diagnóstico parasitológico apesar de ter alta especificidade, pode apresentar baixa sensibilidade quando o parasitismo do tecido é escasso (REIS et al., 2006a).

A técnica molecular PCR em tempo real ainda é a mais sensível, detectando a positividade em animais negativos nos testes ELISA e teste rápido em amostras de sangue e aspirado de linfonodo de cães de área endêmica para LVC no Brasil (LOPES et al., 2017).

3. Resposta imune na LVC

3.1. Imunidade inata

A imunidade adaptativa é indispensável para a resolução de infecção, no entanto, há evidências crescentes de que são mecanismos inatos que desempenham um papel importante nas defesas anti-Leishmania (FARIA et al., 2012). A resposta imune contra *Leishmania* é complexa, e se inicia quando moléculas do parasita são detectadas por receptores da imunidade inata presentes em células dendríticas, células natural killer e macrófagos (ZAMBONI et al., 2015). Entre esses receptores imunes inatos estão os

receptores Toll-like (TLRs), que utilizam proteínas adaptadoras como o MyD88 para desencadear a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF-α, IFN-γ e IL-12, bem como moléculas coestimuladoras em resposta à infecção por *Leishmania* (BECKER et al., 2003; CARRADA et al., 2007).

Em modelo murino, TLR2 foi associado com um papel de proteção na leishmaniose. Em modelo murino infectado com *L. major*, camundongos deficientes para TLR2 tiveram um aumento no número de lesões cutâneas (DEVEER et al. 2003).TLR2 e TLR3 estão envolvidos na fagocitose de *Leishmania donovani* (FLANDIN et al. 2006). Em neutrófilos humanos, TLR2 pode se ligar diretamente ao lipofosfoglicano e promover a sinalização (BECKER et al. 2003). Em cães, macrófagos derivados de sangue periférico de cães infectados com *L. infantum* tiveram diminuição na expressão do gene TLR2 comparado a cães não infectados (MELO et al. 2014).

Inflamassomas são complexos multiméricos de proteínas que são montados no citoplasma de células imunes inatas em resposta a moléculas microbianas ou sinais de estresse. Os inflamassomas facilitam a indução de respostas inflamatórias induzindo a secreção de citocinas inflamatórias, tais como IL-1β e IL-18, e orientam a célula hospedeira para formar um tipo específico de morte celular programada, chamada piroptose. Esses processos favorecem a iniciação de processos inflamatórios nos tecidos infectados, que podem levar a morte de patógenos, indução de imunidade adaptativa e retorno à homeostase do tecido (ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015).

Macrófagos infectados *in vitro* com *Leishmania* spp. são capazes de secretar a forma ativa de IL-1β (revisado por ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015). Diversas espécies de *Leishmania,* incluindo *L. infantum,* desencadeiam a ativação da caspase-1 em macrófagos em um processo dependente de NLRP3 e ASC. Além disso, o inflamassoma foi importante para a diminuição da replicação do parasita em um modelo murino infectado com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, como demonstrado pelo uso de camundongos geneticamente deficientes para NLRP3, ASC e caspase- 1 (LIMA-JUNIOR et al., 2013).

As células dendríticas são muito importantes na assistência ao controle da infecção por *Leishmania* e o comprometimento dessas células pelo parasita geralmente resulta no início da doença. No entanto, poucas informações são conhecidas em relação às células dendríticas na infecção canina por *L. infantum* (HOSEIN et al., 2017).

A injeção intradérmica de solução de leishmania induziu a maturação antígeno-específica de células dendríticas em cães com LV e também induziu a regulação da expressão de MHC II de superfície, sugerindo assim que as células dendríticas caninas atuam como células efetoras na reação de hipersensibilidade do tipo tardia observada nos cães com LV (SACCHI et al., 2006).

Os neutrófilos têm a capacidade de descondensar a cromatina e expulsar o DNA no ambiente extracelular circundante, resultando na captura e inativação de patógenos (ABI ABDALLAH AND DENKERS, 2012). Este fenômeno é conhecido como armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e estudos recentes mostraram que esses NETs não são apenas importantes para a destruição de bactérias e vírus, mas também em infecções por protozoários, incluindo Leishmania (GUIMARAES-COSTA et al., 2009).

Em cães infectados por *L. infantum* ocorre estresse oxidativo de neutrófilos, e a viabilidade dos neutrófilos diminuiu nos estágios finais da doença, o que pode ser resultado da uremia (ALMEIDA et al., 2013b). Na doença moderada houve aumento da produção de superóxido, mas em estágios muito graves houve uma diminuição na produção de superóxido e aumento de apoptose, que também foi associada à uremia (ALMEIDA et al., 2013a).

A produção de óxido nítrico (NO) é o último passo envolvido na destruição da *Leishmania* por macrófagos. A atividade anti-leishmania e a produção de NO foram detectadas em macrófagos caninos infectados com *L. infantum* após incubação com IL-2, IFN-γ e TNF-α (PINELLI et al., 2000). A expressão de iNOS por macrófagos caninos infectados por *Leishmania* spp. foi investigada e os resultados deste estudo revelaram que uma alta expressão de

iNOS está correlacionada com um baixo parasitismo intracelular, sugerindo que essa expressão elevada de iNOS em macrófagos caninos é um mecanismo para controlar a infecção (ZAFRA et al., 2008).

A diminuição da sobrevivência intracelular de *L. infantum* em macrófagos caninos foi associada ao aumento da produção de TNF-α e IFN-γ e a diminuição da produção de IL-10. A expressão dos genes associados a resposta imune inata foi estudada e mostrou que os genes TLR2, 3, 4, 5 e 6 apresentaram níveis mais elevados de transcrição constitutiva em macrófagos caninos infectados com *L. infantum*, porém a transcrição constitutiva destes genes não interfere na sobrevivência intracelular de *L. infantum* (TURCHETTI et al., 2014).

3.2. Imunidade adaptativa

Os macrófagos tem papel importante na resposta imunológica contra *Leishmania* spp*,* pois são células parasitadas e, além disso, desencadeiam a resposta adaptativa. A célula T responde ao antígeno através do engajamento do receptor TCR das células T no MHC associado ao peptídeo no macrófago. A função efetora desta interação é determinada por sinais adicionais da ligação de moléculas co-estimulatórias sobre a superfície de células T e seus ligantes nas células apresentadoras de antígeno. Dependendo da natureza e magnitude desses sinais a célula irá gerar citocinas ou desenvolver funções regulatórias ou citotóxicas, indução de memória ou anergia (PENTCHEVA-HOANG et al., 2007).

As moléculas co-estimulatórias pertencem à família B7-CD28, as quais transmitem sinais ativadores (CD28) ou inibidores (CTLA-4) para as células T (GREENWALD; FREEMAN; SHARPE, 2005). Em macrófagos infectados por *Leishmania* spp ocorre falha no processo de apresentação de antígenos, a análise da expressão das moléculas co-estimulatórias indicam diminuição na expressão de B7 que reduz a proliferação das células T (PINELLI et al., 1999). Tem sido recentemente mostrado que o parasita e seus antígenos inibem a

expressão de co-estimuladores e diminuem a produção de óxido nítrico (DIAZ et al., 2012).

Outra molécula co-estimulatória pertencente a família B7-CD28 é a PD-1. Em cães com LV, a expressão de PD-1 está aumentada em linfócitos T CD3+ e linfócitos B CD21+ tanto em sangue periférico quanto em células mononucleares esplênicas (CHIKU et al., 2016). PD-1 e seus ligantes estão envolvidos na indução da apoptose de células T e na regulação da produção de TNF-α, IL-4 e óxido nítrico, e seu bloqueio leva a uma diminuição da carga parasitária (CHIKU et al., 2016). O bloqueio do ligante de PD-1 B7-H1 promoveu um retorno da função das células T CD4+ e CD8+ e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio em fagócitos de cães com LV, consequentemente esses fagócitos tiveram uma diminuição da carga parasitária (ESCH et al., 2013).

A supressão da imunidade celular é o aspecto mais importante na patogênese e progressão da doença canina. A ausência de resposta das células T aos antigenos de *Leishmania* sp é observada *in vivo*, com um teste de hipersensibilidade do tipo tardia negativa (DOS-SANTOS et al., 2008). Em cães infectados com *Leishmania infantum*, ocorre uma redução do número de linfócitos T em sangue periférico (BOURDOISEAU et al., 1997), que pode ocorrer devido a altas taxas de apoptose dessas células (LIMA et al., 2012).

A imunidade protetora tem geralmente sido associada com resposta imunológica celular, manifestado por resposta linfoproliferativa positiva a antígenos de *Leishmania* spp (CABRAL; O'GRADY; ALEXANDER, 1992) e produção de citocinas, tais como IFN-γ e TNF-α, as quais são necessárias para ativação de macrófagos e morte de parasitas intracelulares (SADICK et al., 1991).

A resposta celular do tipo Th1 é induzida principalmente por IL-12, responsável por estimular a produção de INF-γ por células T CD4+ e conferir proteção contra a infecção. Já a resposta do tipo Th2 é estimulada principalmente por IL-4, que causa a secreção de citocinas como IL-10, IL-13 e TGF-β (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007). A susceptibilidade a infecção tem

sido atribuída à predominância de IL-4, reduzindo os efeitos das citocinas Th1, tais como IL-12 e IFN-γ, que diminuem a produção de óxido nítrico nos macrófagos, impedindo a destruição do parasita (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

A resistência a infecção é relacionada a proliferação celular, principalmente de células T CD4+ e CD8+, e alta produção das citocinas TNF-α e IFN-γ (REIS et al., 2010). É observado um menor número de células T CD4+ e CD8+, bem como um menor número de células B e monócitos principalmente em cães com alto parasitismo (REIS et al., 2006c). A função da célula T na indução da resposta celular é determinante para a eliminação do parasita no interior dos macrófagos (PINELLI et al., 1999).

3.3. miRNAs e resposta imune

A regulação da função efetora dos macrófagos e células T parece depender de pequenos RNAs não codificantes de aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento que são transcritos no interior celular e funcionam como reguladores pós-transcricionais de expressão gênica regulando a tradução de proteínas fundamentais para a resposta imunológica, essas moléculas são denominadas de miRNAs. Durante os últimos anos essas moléculas foram evidenciadas por apresentarem um papel crítico no desenvolvimento e função da resposta imunológica (LIU; ABRAHAM, 2013).

Recentes estudos demonstraram o papel dos microRNAs associados também ao papel regulador da resposta imune inata, como *feedback* negativo nas vias de sinalização Toll (O'CONNELL et al., 2010). A transfecção de linhagem celular HEK293-TLR4 com miRNA exógeno e plasmídeo com NF-kB permitiu identificar que os miRNAs miR-200b e miR-200c modificam a eficiência da via de sinalização de TLR4 dependente de MyD88, portanto, podem afetar as defesas inatas do hospedeiro contra patógenos microbianos (WENDLANDT et al., 2012).

Os miRNAs também estão envolvidos na resposta adaptativa regulando a ativação, proliferação e apoptose das células T e B. A alta atividade do miR-

181 facilita o desenvolvimento destas células (LIU et al., 2008), e pode ainda regular a intensidade de sinalização do TCR durante o desenvolvimento da célula T no timo (LI et al., 2007).

Após ativação de células T, houve um aumento na expressão de miR-214 e consequente inibição na expressão do gene Pten, que é um alvo de fosfatase, como resultado, a proliferação dessas células é aumentada (JINDRA et al., 2010). miR-182 se liga ao transcrito de Foxo1 e inibe a síntese protéica, esse processo resulta em aumento de proliferação das células T helper (STITTRICH et al., 2010).

Nas células Th1 miR-19 e miR-17 participam da resposta Th1 aumentando a proliferação dessas células, promovem a produção de citocinas e inibem a apoptose (JIANG et al., 2011; LYKKEN; LI, 2011). Muitos miRNAs também estão envolvidos no controle de apoptose das células T (LORENZI et al., 2012; MANFÈ et al., 2012; MOLITORIS; MCCOLL; DISTELHORST, 2011).

Os macrófagos passam por mudanças dramáticas na expressão dos genes, resultando em alterações na capacidade funcional da célula. Os miRNAs tem a capacidade de atingir simultaneamente centenas de RNAm transcritos, e promover a diferenciação em macrófagos com um fenótipo inflamatório ou não (EL GAZZAR et al., 2011; GRAFF et al., 2012).

3.4. miRNAs e resposta imune na Leishmaniose

Existem muitas evidências da função dos miRNAs na regulação da tradução de proteínas que são fundamentais para o desenvolvimento, função e diferenciação de vários tipos celulares do sistema imunológico. Uma desregulação da atividade de miRNA também está envolvida na infecção por *Leishmania* spp. e pode promover a indução da imunidade.

A infecção *in vitro* de fagócitos humanos com *Leishmania donovani* mostrou que o parasita induz alteração da atividade dos miRNAs miR-21, miR-155 e miR-146b-5p e interferem na via de sinalização do TGF-β (GERACI; TAN; MCDOWELL, 2015).

Na infecção experimental em camundongo por *L. donovani* foi observado no fígado uma diminuição do miR-122 e genes envolvidos na biossíntese de colesterol, e a restauração da atividade do miR-122 restabeleceu os níveis de colesterol e reduziu a contagem parasitária (GHOSH et al., 2013). Esse dado sugere que na LV os miRNAs tem papel importante e podem estar regulando a resposta imunológica.

In silico foram identificados miRNAs alvos que tem como alvo fatores de transcrição que possuem papel na proliferação e diferenciação das células T na LV. Os miR29-a e miR29-b se ligam a região UTR do fator de transcrição das células Th1 TBX21 e podem suprimir a resposta protetora Th1 na LV, enquanto o desenvolvimento de Th2 pode ser suprimido pela ligação do miR-135 e miR-126 na região UTR do fator de transcrição GATA-3 específico para células Th2, indicando que os miRNAs podem regular a resposta imunológica e o controle da infecção (PANDEY; SUNDAR; PRAJAPATI, 2016).

A infecção *in vitro* de macrófagos de camundongo com *L. donovani* mostrou expressão alterada de 85 miRNAs, e dentre eles, 10 têm relação com a regulação da função efetora dos macrófagos (TIWARI et al., 2017). Em macrófagos humanos, a infecção *in vitro* por *L. major* altera o perfil de expressão de miRNAs já nas primeiras 24 horas pós infecção (LEMAIRE et al., 2013).

Estudo *in vitro* mostrou que a expressão de miR30A-3p foi significativamente aumentada após a infecção por *L. donovani*. A transfecção transitória com um inibidor de MIR30A-3p seguido de infecção por *L. donovani* promoveu a autofagia e diminuiu a carga de parasitas em células THP-1 e macrófagos humanos, demonstrando o papel do miR30A-3p na regulação da eliminação de *L. donovani* mediada por autofagia tendo como alvo a proteína BECN1 (SINGH et al., 2016).

Macrófagos humanos infectados *in vitro* com *L. amazonensis* tiveram um aumento na expressão de miR 294 e miR 721, enquanto em macrófagos infectados com *L. amazonensis* “knockout” para arginase houve inibição da expressão desses miRNAs, e aumento da expressão de NOS2 e

consequentemente da produção de óxido nítrico, reduzindo a infectividade de *L. amazonensis*, demonstrando que NOS2 é alvo desses miRNAs (MUXEL et al., 2017).

Na LVC devido à supressão imunológica celular ser determinante na progressão da doença, o conhecimento de fatores associados a regulação imunológica é fundamental para a mudança do padrão de resposta. Estudos explorando os miRNAs como ferramentas terapêuticas estão em andamento para tratamento de certas formas de câncer (UCHINO; OCHIYA; TAKESHITA, 2013).

OBJETIVO GERAL

Comparar o padrão de atividade de miRNA em células mononucleares de sangue periférico de cães saudáveis e cães naturalmente infectados por *L. infantum,* sendo assim, melhorar a nossa compreensão da patogênese da LV no hospedeiro e revelar novos caminhos que possam constituir alvos terapêuticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar perfis específicos de miRNA associados a infecção por *L. infantum* cujos alvos sejam proteínas associadas a regulação da resposta imunológica.

Correlacionar o perfil específico de miRNA das células mononucleares do sangue periférico de cães naturalmente infectados com a carga parasitária.

REFERÊNCIAS

ABI ABDALLAH, D. S.; DENKERS, E. Y. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 382, 2012.

ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias.** 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. p. 706-17, 1991.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of cell science**, v. 112, p. 2993–3002, 1999.

ALMEIDA, B. F.; NARCISO, L. G.; BOSCO, A. M.; PEREIRA, P. P.; BRAGA, E. T.; AVANCO, S. V.; MARCONDES, M.; CIARLINI, P. C. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 196, p. 6–12, 2013a.

ALMEIDA, B. F.; NARCISO, L. G.; MELO, L. M.; PREVE, P. P.; BOSCO, A. M.; LIMA, V. M.; CIARLINI, P. C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **Veterinary Journal**, v. 198, p. 599–605, 2013b.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329–337, 2006.

BECKER, I., et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, v. 130, p. 65–74, 2003.

BOGGIATTO, P. M. et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. 1010-19, 2011.

BOURDOISEAU, G. et al. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 56, n. 3–4,

p. 345–51, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde**,** 2003. 122 p.

BRASIL. Ministério da Saúde do Brasil. Casos confirmado de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LV-Casos.pdf>. Acesso em: 24 out. 2017.

CABRAL, M.; O'GRADY, J.; ALEXANDER, J. Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. **Parasite immunology**, v. 14, n. 5, p. 531–9, 1992.

CARRADA G, et al. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with Leishmania mexicana. **Parasite Immunology**, v. 29, p. 117–126, 2007.

CHIKU, V. M. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 221, n. 8, p. 879–888, 2016.

COLMENARES, M. et al. Mechanisms of pathogenesis: differences amongst *Leishmania* species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96 Suppl 1, p. S3-7, 2002.

COURA-VITAL, W. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, n. Suppl 1, p. S1, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 4, p. 155–159, 2011.

DE PITA-PEREIRA, D. et al. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania*

infantum chagasi in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Tropica**, v. 107, n. 1, p. 66–69, 2008.

DE VEER, M. J., CURTIS, J. M., BALDWIN, T. M., DIDONATO, J. A., SEXTON, A., MCCONVILLE, M. J., HANDMAN, E. AND SCHOFIELD, L. MyD88 is essential for clearance of Leishmania major: possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signaling. **European Journal of Immunology**, v. 33, p. 2822–2831, 2003.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DIAZ, S. et al. Canine leishmaniosis: modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 189, n. 2–4, p. 137–144, 2012.

DINIZ, S. A. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. **Journal of infection in developing countries**, v. 2, n. 1, p. 24–33, 2008.

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3–4, p. 251–259, 2008.

EL GAZZAR, M. et al. MicroRNA-146a regulates both transcription silencing and translation disruption of TNF- during TLR4-induced gene reprogramming. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 90, n. 3, p. 509–519, 2011.

ESCH, K. J. et al. Programmed Death 1-Mediated T Cell exhaustion during Visceral Leishmaniasis impairs phagocyte function. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 11, p. 5542–5550, 2013.

FARIA, M. S., REIS, F. C. and LIMA, A. P. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? **Journal Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária,** São Paulo, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FISA, R. et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain:)The example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 87–97, 1999.

FLANDIN, J. F., CHANO, F. AND DESCOTEAUX, A.. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, p. 411–420, 2006.

GERACI, N. S.; TAN, J. C.; MCDOWELL, M. A. Characterization of microRNA expression profiles in *Leishmania*-infected human phagocytes. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 1, p. 43–51, 2015.

GHOSH, J. et al. *Leishmania donovani* targets dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 3, p. 277–288, 2013.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GRAFF, J. W. et al. Identifying functional MicroRNAs in macrophages with polarized phenotypes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 21816–21825, 2012.

GREENWALD, R. J.; FREEMAN, G. J.; SHARPE, A. H. The B7 family revisited. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 515–548, 2005.

GUIMARAES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T.; FROMENT, G. S.; SOARES, R. P.; MORGADO, F. N.; CONCEICAO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 6748–6753, 2009.

HOSEIN, S.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v.144, n. 1, p. 95-115,

2017.

JIANG, S. et al. Molecular dissection of the miR-17-92 cluster's critical dual roles in promoting Th1 responses and preventing inducible Treg differentiation. **Blood**, v. 118, n. 20, p. 5487–5497, 2011.

JINDRA, P. T. et al. Costimulation-dependent expression of MicroRNA-214 increases the ability of T cells to proliferate by targeting Pten. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 990–997, 2010.

LEMAIRE, J. et al. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 10, p. e2478, 2013.

LI, Q.-J. et al. miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. **Cell**, v. 129, n. 1, p. 147–161, 2007.

LIMA, V. M. F. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 485-489, 2003.

LIMA, V. M. F. DE et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 2–4, p. 147–153, 2012.

LIMA-JUNIOR, D.S., et al. Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, p. 909– 915, 2013.

LIU, G. et al. Pre-miRNA loop nucleotides control the distinct activities of mir-181a-1 and mir-181c in early T cell development. **Plos One**, v. 3, n. 10, p. e3592, 2008.

LIU, G.; ABRAHAM, E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 2, p. 170–177, 2013.

LOPES, E. G. et al. Serological and molecular diagnostic tests for canine visceral leishmaniasis in Brazilian endemic area: one out of five seronegative dogs are infected. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 12, p. 2436–2444, 2017.

LORENZI, J. C. C. et al. miR-15a and 16-1 are downregulated in CD4 $^{+}$ T cells of multiple sclerosis relapsing patients. **International Journal of Neuroscience**, v. 122, n. 8, p. 466–471, 2012.

LYKKEN, E. A.; LI, Q.-J. microRNAs at the regulatory frontier: an investigation into how microRNAs impact the development and effector functions of CD4 T cells. **Immunologic Research**, v. 49, n. 1–3, p. 87–96, 2011.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 566–7, 1988.

MANFÈ, V. et al. miR-122 regulates p53/Akt signalling and the chemotherapy-induced apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma. **Plos One**, v. 7, n. 1, p. e29541, 2012.

MELO, L. M., PEROSSO, J., ALMEIDA, B. F., SILVA, K. L., SOMENZARI, M. A. AND DE LIMA, V. M. Effects of P-MAPA immunomodulator on toll like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. **International Immunopharmacology** v. 18, p. 373–378, 2014.

MIR, F. et al. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 7, p. 419–422, 2012.

MOLITORIS, J. K.; MCCOLL, K. S.; DISTELHORST, C. W. Glucocorticoid-mediated repression of the oncogenic microRNA cluster miR-17∼92 contributes to the induction of bim and initiation of apoptosis. **Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 3, p. 409–420, 2011.

MOLYNEUX, D.H.; ASHFORD, R.W. **The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals**. London: Taylor & Francis, 1983.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p.

1561–1577, 2005.

MUXEL, S. M. et al. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44141, 2017.

NOLI, C. Canine Leishmaniasis. **Waltham Focus**. v. 9, n.2, p.16-24, 1999.

NUNES, C. M. et al. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1–2, p. 131–133, 2010.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. Fleas and ticks as vectors of *Leishmania* spp. to dogs: Caution is needed. **Veterinary Parasitology**, v. 168, n. 1–2, p. 173–174, 2010.

OWENS, S. D. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076–83, 2001.

O'CONNELL, P. J. et al. Role of regulatory T cells in xenotransplantation. **Current Opinion in Organ Transplantation**, v. 15, n. 2, p. 224–229, 2010.

PAHO (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION). Epidemiological Report of the Americas. US1.1, p. 2–5, 2017.

PANDEY, R. K.; SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Differential expression of miRNA regulates T cell differentiation and plasticity during visceral leishmaniasis infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. feb, p. 1–9, 2016.

PANGRAZIO, K. K. et al. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3–4, p. 327–331, 2009.

PENTCHEVA-HOANG, T. et al. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 45, p. 17765–17770, 2007.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs

experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–35, 1994.

PINELLI, E. et al. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-Cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and immunity**, v. 67, n. 1, p. 237–243, 1999.

PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A. M.; VAN HOEIJ, M.; LANGERMANS, J. A.; RUITENBERG, E. J.; RUTTEN, V. P. Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Veterinary Parasitology**, v. 92, p. 181–189, 2000.

QUEIROZ, P. V. S. et al. Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 267–273, 2009.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006a.

REIS, A. B. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 102–116, 2006b.

REIS, A. B. et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–311, 2006c.

REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 26, n. 7, p. 341–9, 2010.

ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. Non-sand fly transmission of a north american isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected balb/c mice. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 5, p. 1113–1115, 2005.

SACCHI, L.; CALVI, L. E.; KRAMER, L. H.; FERROGLIO, E.; GRANDI, G.; CLEMENTI, E.; CORONA, S. The intradermal Leishmanin reaction induces antigen-specific maturation of canine dendritic cells with up-regulation of MHCII synthesis and expression. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 17–24, 2006.

SADICK, M. D. et al. Cytokine regulation of murine leishmaniasis: interleukin 4 is not sufficient to mediate progressive disease in resistant C57BL/6 mice. **Infection and immunity**, v. 59, n. 12, p. 4710–4714, 1991.

SANTA ROSA I.C.A.; OLIVEIRA I.C.S. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clinica Veterinária,** v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, 2009.

SINGH, A. K. et al. MicroRNA expression profiling of *Leishmania donovani*-infected host cells uncovers the regulatory role of MIR30A-3p in host autophagy. **Autophagy**, n. August, p. 1–15, 2016.

SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat.** Philadelphia: W.B. Saunders, p. 450-458, 1990.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

STITTRICH, A.-B. et al. The microRNA miR-182 is induced by IL-2 and promotes clonal expansion of activated helper T lymphocytes. **Nature Immunology**, v. 11, n. 11, p. 1057–1062, 2010.

TIWARI, N. et al. Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection: delineation of their roles in macrophage dysfunction. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 314, 2017.

TURCHETTI, A.P., DA COSTA, L.F., ROMÃO EDE, L., FUJIWARA, R.T., DA

PAIXÃO, T.A., SANTOS, R.L. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of Leishmania infantum. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 163, p. 67–76, 2015.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.

UCHINO, K.; OCHIYA, T.; TAKESHITA, F. RNAi Therapeutics and applications of MicroRNAs in cancer treatment. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 43, n. 6, p. 596–607, 2013.

WENDLANDT, E. B. et al. The role of MicroRNAs miR-200b and miR-200c in TLR4 signaling and NF-κB activation. **Innate Immunity**, v. 18, n. 6, p. 846–855, 2012.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Control of the leishmaniases. World Health Organization technical report series, n. 949, p. 22–26, 2010.

ZAFRA, R.; JABER, J. R.; PEREZ-ECIJA, R.; BARRAGAN, A.; MARTINEZ-MORENO, A.; PEREZ, J. High NOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.123, p. 353–359, 2008.

ZAMBONI, D. S. and LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, p. 156–171, 2015.

CAPÍTULO 2

RELATIONSHIP OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS miRNA EXPRESSION AND PARASITIC LOAD IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY - Visceral leishmaniasis (VL) in humans is a chronic and often fatal disease if left untreated. Dogs are powerful reservoirs of the parasite which allows for transmission to humans by a phlebotomine vector. Immune response can be modulated by microRNAs (miRNAs). Here, we evaluated the expression of miRNAs in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (L.) infantum* (n=10) and compared to healthy dogs (n=5). Microarray analysis revealed that miR 21, miR 424, miR 194 and miR 451 had a 3-fold increase in expression, miR 192, miR 503, and miR 371 had a 2-fold increase in expression, whereas a 2-fold reduction in expression was observed for miR 150 and miR 574. Real-time PCR validated the differential expression of miR 21, miR 150, miR 451, miR 192, miR 194, and miR 371. Parasite load of PBMC was measured by real-time PCR and correlated to differentially expressed miRNA, showing a strong positive correlation with expression of miR 194, a regular positive correlation with miR 371 expression and a moderate negative correlation with miR 150 expression in PBMC. These findings suggest that the immune response in dogs infected with *L. infantum* may be post-transcriptionally modulated by miRNAs. We suggest that their role in immune regulation and their correlation to parasite load may help in the identification of therapeutic targets in Canine Visceral Leishmaniasis (CVL).

Keywords: Canine Visceral Leishmaniasis, Immune response, MicroRNAs, Zoonosis

AUTHOR SUMMARY - VL is a chronic disease that affects humans, dogs, cats and other mammalian animals. The disease is caused by a protozoan called *Leishmania infantum* and can lead to death if left untreated. Dogs are the main reservoirs of the parasite, which is then transmitted to humans by the phlebotomine vector. Dogs cannot form an effective immune response against this infection, and this could be modulated by small non-coding RNAs, called microRNAs, responsible for post-transcriptional control of gene expression. In this study, we investigate the miRNAs modulated in canine visceral leishmaniasis and the correlation of these miRNAs with the parasite load of the dogs. Furthermore, we identified in silico the target genes of these miRNAs. These findings can help in the identification of therapeutic targets for this disease.

Introduction

VL is a zoonosis caused by the protozoan *Leishmania infantum* and is the most fatal form of this parasitic disease [1]. VL is still one of the most neglected diseases in the world and, of the human cases reported in America, 95.1% are in Brazil [2]. Dogs are considered the main domestic reservoirs of *L. Infantum* [3]. Once in the vertebrate host, the parasite may cause lesions and symptoms that are characteristic of CVL, although some infected dogs may be oligo or asymptomatic [4], others may evolve to spontaneous cure [5]. The most frequent signs of VL are lymphadenopathy, onychogryphosis, cutaneous lesions, weight loss, cachexia, fever and locomotor abnormalities [6].

In dogs infected with *L. infantum*, a reduction in the number of T-lymphocytes in the peripheral blood occurs [7,8], as well as a disorganization of the splenic white pulp [9]. Protective immunity in dogs has generally been associated with a cellular immune response manifested by a positive lymphoproliferative response to *Leishmania* spp antigens [10] and cytokine production, such as IFNγ and TNF-α, which are necessary for macrophage activation and parasite death [11]. The role of T cell in the induction of the

cellular response is determinant for the elimination of the parasite inside the macrophages [12].

In recent years, studies with microRNAs (miRNAs) have shown that these molecules play a critical role in the development and function of the immune response [13]. miRNAs are a group of small, highly conserved, single-stranded non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level [14].

In vitro infection of human phagocytes with *Leishmania donovani* showed that the parasite induces alteration of miR-21, miR-155 and miR-146b and interferes with the TGF-β signaling pathway [15]. In a murine model infected with *L. donovani*, there is a decrease in miR 122 expression, facilitating hepatic infection, and an increase in miR 122 expression decreases parasite burden in the liver [16]. An *in silico* study has also shown that miR 29a and miR 29b target transcription factors that play a role in the proliferation and differentiation of T cells in visceral leishmaniasis, indicating that miRNAs can regulate immune response and infection control [17]. Although there are several studies on the role of miRNAs in VL, studies on the expression of miRNAs in dogs with VL have not yet been described.

In this study, we demonstrated that there are differences in the expression of miRNAs in PBMC of dogs with VL compared to healthy dogs. Parasite load showed strong positive correlation with miR 194 expression and regular correlation with the expression of miR 371 and miR 150 in PBMC.

Methods

Screening of animals and collection of samples

This study was approved by the Brazilian Animal Experimental College (COBEA), with the approval of the Committee for Ethics in Animal Use (CEUA) of UNESP – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Campus de Araçatuba - School of Veterinary Medicine - FMVA (process 00978/2016).

Five healthy animals upon clinical examination, complete blood count and serum biochemical profile were selected for this study, and ten animals naturally infected with *Leishmania infantum,* from the Zoonosis Control Center of Araçatuba, were selected. These animals contained at least three characteristic clinical signs of the disease, including onychogriphosis, weight loss, ear-tip injuries, periocular lesions, alopecia, skin lesions and lymphadenopathy. Infected animals were classified in the clinical stage II of the disease [18]. Blood of both groups (infected and healthy) was collected in tubes without EDTA to obtain serum for biochemical profile and perform indirect ELISA assay for the detection of anti-leishmania antibodies [19], and in EDTA tubes for hemogram and isolation of the PBMC. Infected animals were euthanized by barbiturate anesthesia (Tiopental, Cristália Itapira, SP), followed by intravenous injection of potassium chloride 19.1%, in compliance with local laws.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

PBMC were isolated by gradient Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) following the manufacturer's instructions. They were then washed twice in phosphate buffered saline solution at pH 7.2. After isolation, these cells were counted in a Neubauer chamber for further extraction of DNA and miRNA.

DNA extraction and determination of the Leishmania species

DNA extraction from PBMC samples from the experimental dogs was performed using $5x10^6$ cells with the commercial DNAeasy® kit (Quiagen, Valencia, California, USA) according to the manufacturer's recommendations. Extracted DNA was quantified in spectrophotometer 260/280 (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) for evaluation of purity and then stored at -20°C until analysis.

Determination of the *Leishmania* species was performed by PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) [20], comparing the restriction

profiles of the sample with a PCR restriction profile obtained from *L. infantum* (IOC / L0575-MHOM / BR / 2002 / LPC-RPV), *L. braziliensis* (IOC / L0566-MHOM / BR / 1975 / M2903) and *L. amazonensis* (IOC / L0575-MHOM / BR / 1967 / PH8) as positive controls and water as negative control.

Quantification of the parasite load by real-time PCR

Parasite load quantification was performed by real-time PCR with a final reaction volume of 20µL using primers amplifying a 116bp fragment of the kinetoplast DNA (kDNA) of *Leishmania* spp. (5 'CCTATTTTACACCAACCCCCAGT 3' and 5 'GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA 3'), at a concentration of 900nM [21], Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 50ng of sample DNA. Amplification condition used was an initial heating of 95ºC for 10 minutes, 40 cycles of 95ºC for 15 seconds and 65ºC for 60 seconds. Upon the end of amplification, a dissociation curve of the amplified fragment was determined from 60ºC to 95ºC with increase of 0.5ºC every 5 seconds. A standard curve with DNA from *Leishmania infantum* promastigotes (MHOM/BR00/MER02) with dilution of 10^8 to 10^1 of parasite DNA was performed for each reaction.

Extraction and quantification of miRNA

Extraction of microRNAs from PBMC was performed on the samples with the commercial mirVana® kit for isolation of miRNA with phenol (Life Technologies, USA), following the procedure indicated by the manufacturer. After the isolation of the fraction containing total RNA, it was stored at -80ºC until evaluation of quality and concentration.

The isolated RNAs were analyzed by spectrophotometry (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) for evaluation of their quantity. Before performing microarray, samples were also analyzed for RNA quality by capillary electrophoresis (Bioanalyzer, Agilent Technologies, USA) using the commercial Agilent RNA 6000 Nano kit, following manufacturer's instructions. All samples presented RNA integrity number (RIN) greater than 8.

Microarray

Total RNAs with satisfactory amount (over than 30ng/µl) and quality (RNA integrity number over than 8) were used to perform microarray analysis using a miRNA 4.1 Array Strip (Affymetrix, USA) containing probes designed for the miRNAs of several species, including 291 of the *canis familiaris* specie.

MicroRNAs were biotinylated using the Affymetrix FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit following manufacturer's instructions. For the microarray, GeneAtlas® Hybridization, Wash, and Stain Kit for miRNA array Strips were used, following manufacturer's instructions.

Microarray data were deposited in Gene Expression Omnibus with the access number GSE105443 according to the minimum information about microarray experiment (MIAME) standards.

Microarray data analysis

Normalization and quality of microarray analysis of the miRNAs of control and infected dogs were performed in the Expression Console Software program, version 1.4.1 (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, USA). Differential expression analysis of the miRNAs was performed in the Transcriptome Analysis Console (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, USA).

Analysis of targets of the miRNAs differentially expressed in dogs with VL, as well as identification of the canonical pathways of these targets, were performed using the Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Redwood City, CA, USA).

Real-time PCR for miRNAs analysis

To validate the results obtained by microarray, real-time PCR (qPCR) was performed. cDNA production was performed using the miScript RT II kit (Qiagen™), as recommended by the manufacturer. qPCR reactions were performed using commercially available specific primers for *canis familiaris* miRNAs of interest and reference gene (SNORD96A) (miScript, Qiagen™)

using the SYBR Green system (myScript SYBR Green PCR kit, Qiagen™) in real-time thermal cycler (RealPlex, Eppendorf™). Amplification conditions were determined by the manufacturer. For each reaction, a standard curve with serial dilution of a pool of cDNA was performed. MicroRNA expression was calculated based on the values of the standard curve, by the quotient of the target miRNA value and the housekeeping gene value.

Statistical analysis

Statistical analyzis were performed using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Analysis of variance (ANOVA) was performed for treatment comparison in the microarray. Mann-Whitney test was performed to validate the real-time PCR values of the miRNAs. Spearman correlation was made to evaluate association between parasite load and miRNA expression. Fisher test was made by IPA to set up canonical pathways. Results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

***Leishmania infantum* specie was identified in dogs with VL**

Dogs of the control and infected group were submitted to ELISA test to confirm the presence or absence of anti-leishmania antibodies (table 1).

PCR-RFLP was performed to identify the *L.* specie. In all dogs of the infected group the *L. infantum* specie was found (fig. 1).

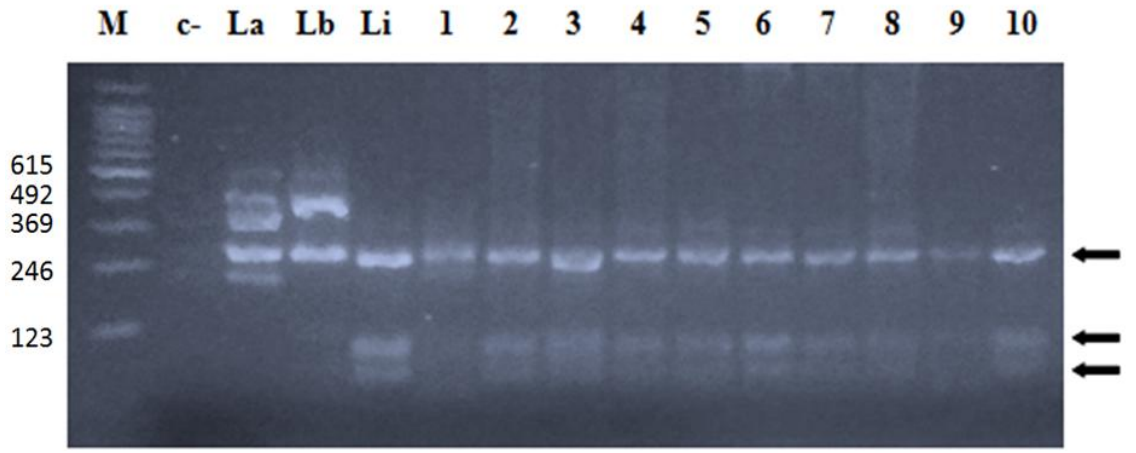

Fig 1. PCR RFLP for identification of *Leishmania* species. A restriction profile similar to *L. infantum* was found in all dogs of infected group.

Table 1. Optical density on ELISA and clinical signs of animals naturally infected and healthy animals from control group

Animal	ELISA	Clinical Signs
Infected 1	1.333	Onychogryphosis, skin lesions, alopecia, , ear lesions, anemia, hepatosplenomegaly
Infected 2	0.511	Onychogryphosis, cachexia, skin lesions, alopecia, ear lesions, anemia, hepatosplenomegaly
Infected 3	0.974	Onychogryphosis, cachexia, ear lesions, anemia
Infected 4	1.283	Onychogryphosis, alopecia, ear lesions, anemia
Infected 5	0.356	Lymphadenopathy, onychogryphosis, skin lesions, hepatosplenomegaly
Infected 6	1.323	Onychogryphosis, skin lesions, ear lesions, anemia
Infected 7	1.315	Onychogryphosis, cachexia, skin lesions, ear lesions, anemia
Infected 8	0.907	Onychogryphosis, cachexia, ear lesions, anemia, hepatosplenomegaly
Infected 9	1.089	Lymphadenopathy, onychogryphosis, skin lesions, alopecia, ear lesions, anemia, hepatosplenomegaly
Infected 10	0.711	Onychogryphosis, alopecia, ear lesions, anemia
Control 1	0.026	No clinical sings
Control 2	0.032	No clinical sings
Control 3	0.028	No clinical sings
Control 4	0.049	No clinical sings
Control 5	0.055	No clinical sings

Differentially expressed microRNAs in the PBMC of dogs with VL compared to healthy dogs.

Considering that miRNAs can regulate immune response [14], microarray was employed for comparative analysis of miRNA expression in the blood of dogs naturally infected with *L. infantum* and healthy dogs. miRNAs miR 194, miR 192, miR 21, miR 424, miR 451, miR 503 and miR 371 showed increased expression in the blood of infected dogs (3.1, 2.8, 3.7, 3.2, 3.1, 2.0 and 2.9 fold change respectively), while miRNAs 150 and miR 574 showed decreased blood expression (2.2 and 2.7 fold change respectively). Fig 2 illustrates miRNAs differentially expressed in PBMC of dogs with VL compared to healthy ones.

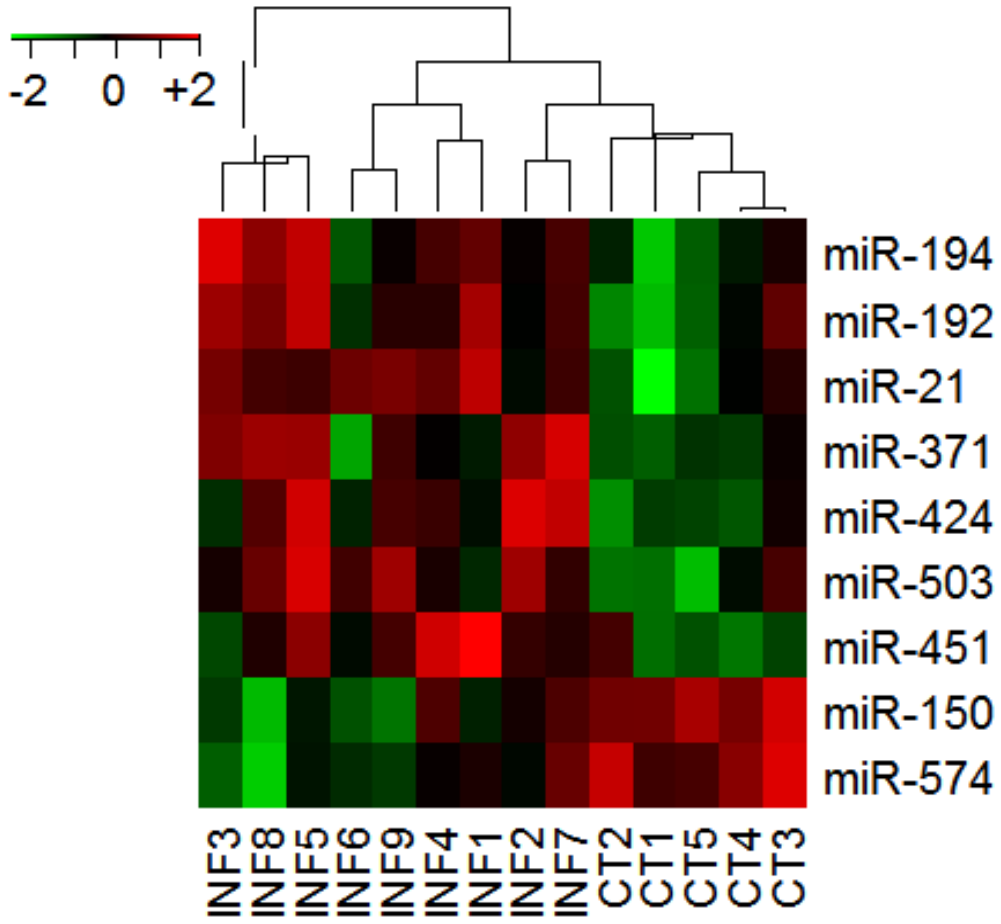

Fig 2. Heatmap of differentially expressed miRNAs in PBMC of dogs infected with *L. infantum* compared to control group. Heatmap shows the

average signal of miRNAs. Upregulated miRNAs are plotted in red and downregulated miRNAs are plotted in green. The fold change was less than -2 and greater than 2. Analysis of variances (ANOVA) was used between groups, and the result was considered significant when $p < 0.05$.

Validation of miRNA expression in the blood of animals with CVL compared to healthy animals

To confirm the differential expression of miRNAs in the blood of dogs with VL as identified by microarray, real-time PCR validation was performed. Reactions showed efficiency from 0.84 to 1.42, slope from -2.603 to 3.761 and R^2 from 0.933 to 0.998.

miR 21, miR 451, miR 192, miR 194 and miR 371 were increased similar to the microarray and the miR 150 decreased in the PBMC, Fig 3.

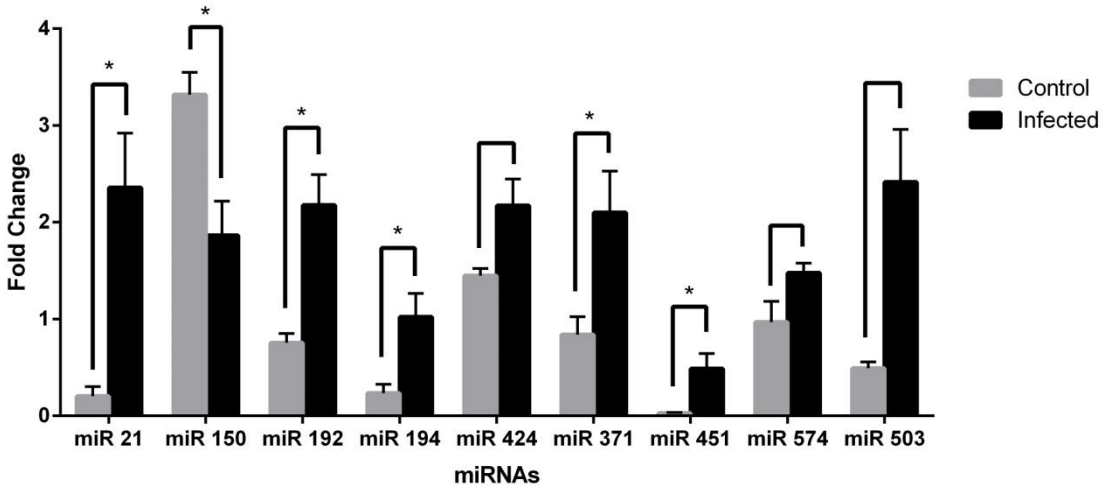

Fig 3. **MiRNAs validated by real-time PCR.** Expression of the microRNAs in infected and healthy groups was quantified by real-time PCR in the PBMC of infected and healthy dogs. Data represent the mean values of the miRNA expression + standard error of the mean and the asterisks represent the statistically significant data following Mann-Whitney test.

Canonical pathways regulated by differentially expressed miRNAs in the blood of infected animals

IPA's microRNA Target Filter (high predicted and experimentally observed) showed gene targets and demonstrated 63 canonical pathways regulated by these miRNAs. The top 20 canonical pathways are presented in Table 2, including p53 signaling, antiproliferative role of TOB in T cell signaling, STAT3 pathway, PTEN signaling, death receptor signaling and crosstalk between dendritic cells and natural killer cells, that can regulate immune response in CVL. We further studied the canonical pathway “crosstalk between dendritic cells and natural killer cells” (Fig 4), which targets important genes involved in immunopathogenesis in CVL, such as NFκB, TNFα, CD80, IFN-γ and DNAM-1.

Table 2. Top twenty canonical pathways predicted for the miRNAs differentially regulated in CVL.

Ingenuity Canonical Pathways	**-log(p-value)**
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	3.86
p53 Signaling	3.83
Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells	3.53
Osteoarthritis Pathway	3.17
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	3.01
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	2.85
dTMP De Novo Biosynthesis	2.74
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	2.73
STAT3 Pathway	2.46
Human Embryonic Stem Cell Pluripotency	2.44
Estrogen-mediated S-phase Entry	2.38
Actin Cytoskeleton Signaling	2.37
Type I Diabetes Mellitus Signaling	2.37
Cyclins and Cell Cycle Regulation	2.36

Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	2.33
Antiproliferative Role of TOB in T Cell Signaling	2.28
Molecular Mechanisms of Cancer	2.22
PTEN Signaling	2.22
Small Cell Lung Cancer Signaling	2.20
Death Receptor Signaling	2.04

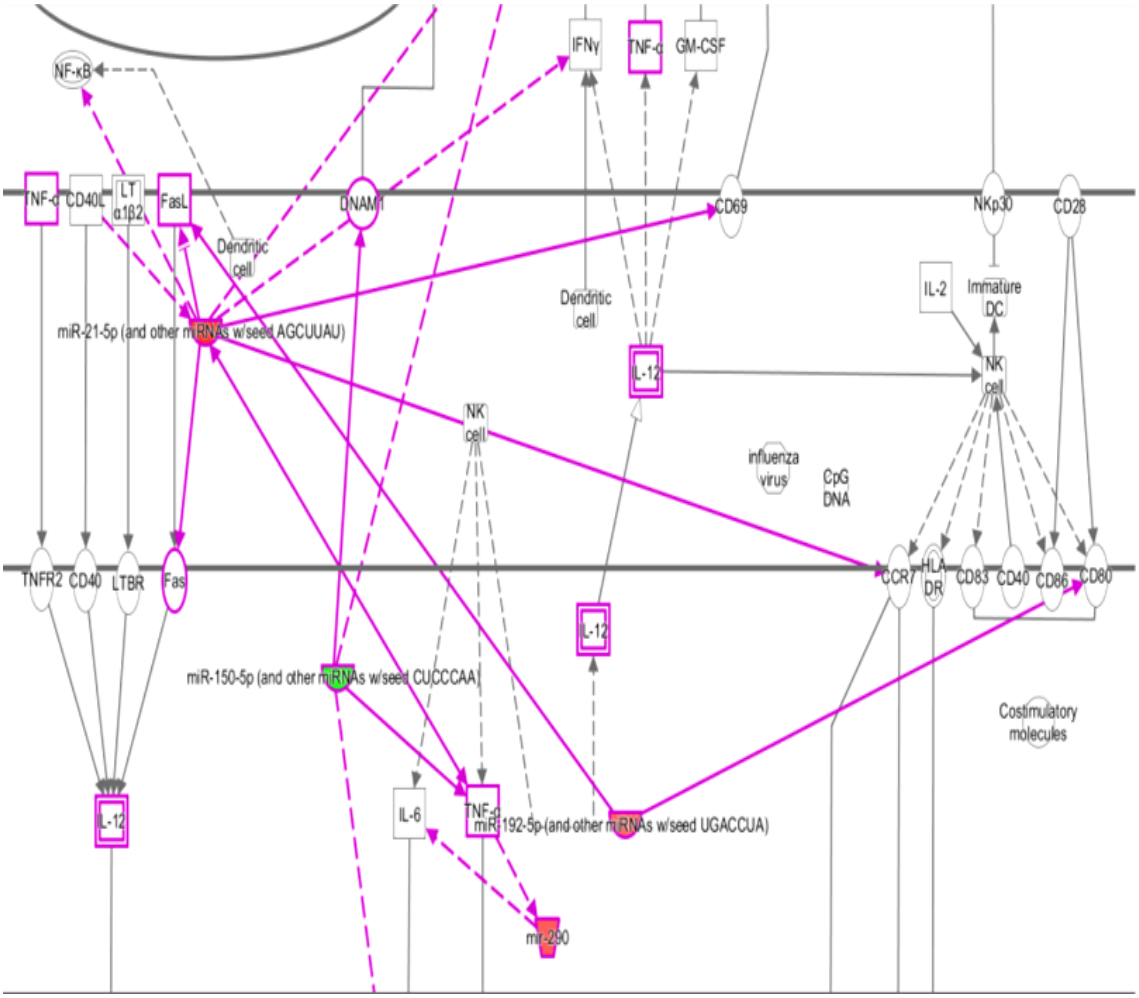

Fig 4. IPA's Canonical Pathway "crosstalk between dendritic cells and natural killer cells". Upregulated miRNAs are in red, and downregulated is in green. Indirect relationships are represented by dotted lines and direct relationships by solid lines. miR 290 is a synonym of miR 371 in IPA's analysis.

Parasite load on PBMC and correlation with expression of microRNAs miR 194, miR 371 and miR 150 in dogs naturally infected with *L. infantum*.

Real-time PCR reaction for quantification of parasite load presented efficiency values of 0.97, slope -3.405 and R^2 0.958.

There was a strong positive correlation between parasite load and miR 194 expression (r=0.816 p=0.007) and a regular positive correlation between parasite load and miR 371 expression (r=0.683 p=0.042) in PBMC from infected dogs compared to healthy dogs. There was a regular negative correlation between the parasite load and the expression in miR 150 (r=-0.683 p=0.042) in these cells.

Discussion

The *Leishmania* species observed in dogs with VL in the endemic area studied was *L. infantum*. Identification of the infecting species is important because differences in miRNA expression by *L. donovani* and *L. major* have already been observed in infected human dendritic cells *in vitro* [15]. Also, *L. amazonensis* has been identified in dogs with visceral leishmaniasis in the nearby city of Bauru-SP, Brazil [20], thus, the determination of *L. infantum* in the samples was important to ensure the subsequent results of the research. We demonstrated by microarray that there was altered expression of nine miRNAs in PBMC of animals with CVL compared to healthy animals; the miRNAs miR 21, miR 192, miR 194, miR 371, miR 503, miR 424 and miR 451 were upregulated, and miR 574 and miR 150 were downregulated.

miRNAs differentially expressed in the microarray in the *canis familiaris* species were also evaluated by real-time PCR. miR 21, miR 150, miR 451, miR 192, miR 194 and miR 371 confirmed the microarray data in the PBMC. miR 424, miR 574 and miR 503 showed similar patterns to microarray results, but statistical significance was not achieved, likely due to the small sample size (10 infected animals and 5 healthy animals).

Canonical pathway “crosstalk between dendritic cells and natural killer cells” involved several target genes of differentially expressed miRNAs and their products, between them, TNF-α and IFN-γ are important cytokines in CVL and are related with disease resistance [11], The expression of TNF-α and IFN-γ is downregulated by miR 21 [22–24], which would favor parasitic growth.

Protein CD40L that is associated with positive co-stimulation is downregulated by miR 21 expression [25] and CD40L is related to control of *Leishmania* parasitism [26]. miR 21 also targets NFκB [27] that is involved in cell death, oxidative stress, cytokine production and cellular defense [28], *L. donovani* infection suppress general transcription factors including NFκB [29]. Therefore miRNAs could be altering expression of these molecules and modulating the immune response against *L. infantum* infection.

Canonical pathway analysis also showed relation with apoptosis signaling. Fas and FasL, important molecules in apoptosis, were downregulated by miR 21 [30,31]. The expression levels of Fas and FasL in CD4+ cells from blood and spleen were lower in infected dogs than in healthy dogs [32], and the soluble levels Fas (sFas) from spleen leukocytes were lower in dogs with VL compared with controls [33]. Thus, miRNAs are acting in apoptosis pathway that occurs in CVL.

miRNA 150 directly target DNAM-1 (CD226) [34] and miR 21 target CD69 [35] , which are regulators of NK cells [36,37]. NK cells play a key role in the induction and polarization to Th1 or Th2. *Leishmania* promastigotes can directly induce human peripheral blood NK cells from healthy donors to secret IFN-γ in the absence of IL-12 and professional antigen presenting cells [38], and this can be relevant for the establishment of Th1 immune response, which is the protective cell response in CVL.

CD80 (B7) is a positive co-stimulatory molecule in dendritic cell, important regulator of T cell activation and cytokine production [39] in adaptative immune response and is downregulated by miR 192 [40] . *Leishmania* infection in canine monocyte-derived macrophages decreased expression of costimulatory B7 molecules, and the co-culture with B7-transfected cells

resulted in the restoration of cell proliferation and IFN-γ production by a *Leishmania* specific T-cell line [12]. Therefore, T-cell activation and cytokine production could be modulated by the expression of miRNA 192 in dogs with VL.

CCR7 is expressed in dendritic cells and is a target of miR 21 [41]. Interaction between T cell and dendritic cells are essential to generate adaptative immune response, as mature dendritic cells from CCR7 deficient mice upon activation fail to migrate into the draining lymph nodes and to mount a rapid primary B or T cell response [42]. Dendritic cells from mice infected by *L. donovani* showed impaired migration from the marginal zone to the periarteriolar region of the spleen, in part attributed by inhibition of CCR7 expression [43]. Therefore, miR 21 expression in dogs with VL could be acting on cell migration, thus modulating immune response.

MicroRNA 150 was decreased in PBMC of dogs with VL and it showed regular negative correlation with the parasitic load in the blood. miR 150 was first described as a key miRNA in the development of B cells [44]. Knockout mice and mutants for miR 150 had an overproduction of immunoglobulins (Igs) of all classes, due to an increase in the number of B1 cells through increased c-Myb gene expression [45]. Interestingly, dogs with symptomatic VL there is an increase in the serum level of immunoglobulins of all classes (IgG, IgA IgE, and IgM) [46] and regulatory B cells from *L. infantum*–infected dogs co-cultured with enriched T cells, were sufficient to suppress T cell function through IL-10 and PD1 [47]. It is possible that the miR 150 may be acting in hipergamaglobulemia and in the development of regulatory B-cells by increasing the parasite burden due to T-cell suppression in canine visceral leishmaniasis.

Increased parasite load associated with decreased miR 150 could also act in other effector pathways of anti-parasitic immunity. Mutant mice lacking miR 150 have a decrease in the number of mature natural killer (NK) cells, whereas mice with increased expression of this miRNA have enhanced development of NK cells [48]. NK cells may play a role in controlling the burden of *Leishmania* spp. parasites during early stages of infection by their ability to

respond rapidly to IFN-γ production which activates macrophage to kill the parasite. *In vitro*, human NK cells were shown to be directly activated by *Leishmania* promastigotes or their lipophosphoglycan (LPG) to produce IFN-γ [38,49,50]. Thus, the decrease in NK cells modulated by miR 150 expression could be related to a higher parasite load in the CVL animals.

An increase in miRNA 194 expression was observed in PBMC in dogs with VL and has a positive and strong correlation with parasite blood load. In human THP-1 monocytes an increase in miR 194 expression directly decreases the expression of the TRAF6 gene, decreasing the release of the proinflammatory cytokine TNF-α [51]. In dogs with asymptomatic VL there is a high expression of TNF-α in lymph nodes with low parasitism, and this expression is lower in symptomatic dogs with a higher parasite load, suggesting that this cytokine has a protective function in *L. infantum* infection [11]. Suggesting that miRNA 194 could be regulating the secretion of inflammatory cytokines, such as TNF-α, modulating the parasite load in these animals.

Expression of miRNA 371 is increased in PBMC of dogs with VL and has a positive correlation with parasite load in blood. In patients with asthma, miR 371 targets Runx3 mRNA and is related to the Th1 and Th2 response balance, and its increased expression is related to a higher Th2 response [52]. In CVL, the response is both Th1 and Th2, but predominantly Th2, with high production of cytokines by these cells, as IL-10 and TGF-β, and decreased production of Th1-type cytokines [53,54]. Thus, miR 371 could be involved with pathways that regulate Th2 immune response polarization in CVL.

MicroRNA 21 showed a significant increase in PBMC of animals with CVL (3.7 fold change). This miRNA is involved with immune regulation, negatively regulating the activation of T lymphocytes [35]. Also, it shows a negative correlation with IL-6 and TNF-α production [55]. TNF-α is associated with resistance in canine visceral leishmaniasis, so possibly the high levels of miR 21 may be decreasing TNF-α, which could increase parasite load.

These findings suggest that the immune response in dogs infected with *L. infantum* may be post-transcriptionally modulated by miRNAs. We suggest

that their role in immune regulation and their correlation to parasite load may help in the identification of therapeutic targets in Canine Visceral Leishmaniasis (CVL).

References

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005;366: 1561–1577.
2. PAHO - Pan American Health Organization. Epidemiological Report of the Americas. US11. PAHO; 2017; 2–5. Available: http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/34112
3. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol. 2002;18: 399–405.
4. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1988;82: 566–7.
5. Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) The example of the Priorat focus. Vet Parasitol. 1999;83: 87–97.
6. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. Trends Parasitol. 2008;24: 324–330.
7. Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-André I, Chabanne L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 1997;56: 345–51.
8. Lima VMF de, Fattori KR, de Souza F, Eugênio FR, Santos PSP dos, Rozza DB, et al. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of L. (L.) chagasi naturally infected dogs. Vet Parasitol. 2012;184: 147–153.
9. Santana CC, Vassallo J, De Freitas LAR, Oliveira GGS, Pontes-De-

Carvalho LC, Dos-Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. Parasite Immunol. 2008;30: 515–524.

10. Cabral M, O'Grady J, Alexander J. Demonstration of Leishmania specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. Parasite Immunol. 1992;14: 531–9.
11. Alves CF, de Amorim IFG, Moura EP, Ribeiro RR, Alves CF, Michalick MS, et al. Expression of IFN-γ, TNF-α, IL-10 and TGF-β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. Vet Immunol Immunopathol. 2009;128: 349–358.
12. Pinelli E, Rutten VP, Bruysters M, Moore PF, Ruitenberg EJ. Compensation for decreased expression of B7 molecules on Leishmania infantum-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. Infect Immun. 1999;67: 237–43.
13. Liu G, Abraham E. MicroRNAs in Immune Response and Macrophage Polarization. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013;33: 170–177.
14. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. Cell. 2004;116:281-297.
15. Geraci NS, Tan JC, Mcdowell MA. Characterization of microRNA expression profiles in Leishmania-infected human phagocytes. Parasite Immunol. 2015;37: 43–51.
16. Ghosh J, Bose M, Roy S, Bhattacharyya SN. Leishmania donovani targets dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. Cell Host Microbe. Elsevier Inc.; 2013;13: 277–288.
17. Pandey RK, Sundar S, Prajapati VK. Differential expression of miRNA regulates T cell differentiation and plasticity during visceral leishmaniasis infection. Front Microbiol. 2016;7: 1–9.
18. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L,

et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. Vet Parasitol. 2009;165: 1–18.

19. Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Feitosa MM. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. Braz J Med Biol Res. 2003;36:485-89.
20. Sanches L da C, Martini CC de, Nakamura AA, Santiago MEB, Dolabela de Lima B, Lima VMF de. Natural canine infection by Leishmania infantum and Leishmania amazonensis and their implications for disease control. Rev Bras Parasitol Veterinária. 2016;25: 465–469.
21. Ranasinghe S, Rogers ME, Hamilton JGC, Bates PA, Maingon RDC. A real-time PCR assay to estimate Leishmania chagasi load in its natural sand fly vector Lutzomyia longipalpis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2008;102: 875–882.
22. Zhang X, Ng W-L, Wang P, Tian L, Werner E, Wang H, et al. MicroRNA-21 modulates the levels of reactive oxygen species by targeting SOD3 and TNFα. Cancer Res.; 2012;72: 4707–13.
23. Liu F, Liu C, Hu X, Shang Y, Wu L. MicroRNA-21: A positive regulator for optimal production of type I and type III interferon by plasmacytoid dendritic cells. Front Immunol. 2017;8: 1–14.
24. Yang N, Li Y, Wang G, Ding Y, Jin Y, Xu Y. Tumor necrosis factor-α suppresses adipogenic and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cell by inhibiting miR-21/Spry1 functional axis. Differentiation.; 2017;97: 33–43.
25. Garchow B, Kiriakidou M. MicroRNA-21 deficiency protects from lupus-like autoimmunity in the chronic graft-versus-host disease model of systemic lupus erythematosus. Clin Immunol.; 2016;162: 100–6.
26. Chamekh M. CD40-CD40L Interaction in Immunity Against Protozoan Infections. J Biomed Biotechnol. 2007;2007: 1–6.
27. Wang Q, Liu S, Tang Y, Liu Q, Yao Y. MPT64 protein from Mycobacterium tuberculosis inhibits apoptosis of macrophages through NF-kB-miRNA21-Bcl-2 pathway. PLoS One. 2014;9: 1–8.

28. Glezer I, Marcourakis T, Avellar MCW, Gorenstein C, Scavone C. O fator de transcrição NF-kapaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. Rev Bras Psiquiatr. Associação Brasileira de Psiquiatria (ABP); 2000;22: 26–30.
29. Buates S, Matlashewski G. General suppression of macrophage gene expression during Leishmania donovani infection. J Immunol. 2001;166: 3416–22.
30. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of fas ligand. J Biol Chem. 2010;285: 20281–20290.
31. Wang K, Li PF. Foxo3a regulates apoptosis by negatively targeting miR-21. J Biol Chem. 2010;285: 16958–16966.
32. Silva KLO, Melo LM, Perosso J, Oliveira BB, Santos PSP dos, Eugênio F de R, et al. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with Leishmania spp. Vet Parasitol. 2013;197: 470–476.
33. Perosso J, Silva KLO, Ferreira SÍ de S, Avanço SV, dos Santos PSP, Eugênio F de R, et al. Alteration of sFAS and sFAS ligand expression during canine visceral leishmaniosis. Vet Parasitol. 2014;205: 417–423.
34. Leong JW, Wagner JA, Ireland AR, Fehniger TA. Transcriptional and post-transcriptional regulation of NK cell development and function. Clin Immunol.; 2017;177: 60–69.
35. Carissimi C, Carucci N, Colombo T, Piconese S, Azzalin G, Cipolletta E, et al. miR-21 is a negative modulator of T-cell activation. Biochimie. 2014;107: 319–326.
36. Zhang Z, Wu N, Lu Y, Davidson D, Colonna M, Veillette A. DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. J Exp Med. 2015;212: 2165–82.
37. Borrego F, Robertson MJ, Ritz J, Peña J, Solana R. CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. Immunology. 1999;97: 159–65.

38. Nylén S, Maasho K, Söderstrom K, Ilg T, Akuffo H. Live Leishmania promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. Clin Exp Immunol. 2003;131: 457–67.
39. Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C, Phillips JH, Linsley PS, Okumura K, et al. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. J Immunol. 1995;154: 97–105.
40. Zhou X, Mao Y, Zhu J, Meng F, Chen Q, Tao L, et al. TGF-beta promotes colorectal cancer immune escape by elevating B7-H3 and B7-H4 via the miR-155/miR-143 axis. Oncotarget. 2016;7: 67196–67211.
41. Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, Slezak-Prochazka I, Maat H, van den Bos H, et al. Dual Role of miR-21 in CD4+ T-Cells: Activation-Induced miR-21 Supports Survival of Memory T-Cells and Regulates CCR7 Expression in Naive T-Cells. PLoS One. 2013;8: 1–10.
42. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. Cell. 1999;99: 23–33.
43. Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. Nat Immunol. 2002;3: 1185–1191.
44. Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. Proc Natl Acad Sci. 2007;104: 7080–7085.
45. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai T-H, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 Controls B Cell Differentiation by Targeting the Transcription Factor c-Myb. Cell. 2007;131: 146–159.
46. Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, et al. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. Vet Immunol

Immunopathol. 2006;112: 102–116.

47. Schaut RG, Lamb IM, Toepp AJ, Scott B, Mendes-Aguiar CO, Coutinho JF V, et al. Regulatory IgDhi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. J Immunol.; 2016;196: 4100–9.
48. Bezman NA, Chakraborty T, Bender T, Lanier LL. miR-150 regulates the development of NK and iNKT cells. J Exp Med. 2011;208: 2717–2731.
49. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. Mol Biochem Parasitol. 2003;130: 65–74.
50. Nylén S, Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. J Glob Infect Dis.; 2010;2: 135–46.
51. Tian H, Liu C, Zou X, Wu W, Zhang C, Yuan D. MiRNA-194 Regulates Palmitic Acid-Induced Toll-Like Receptor 4 Inflammatory Responses in THP-1 Cells. Nutrients. 2015;7: 3483–3496.
52. Qiu Y-Y, Zhang Y-W, Qian X-F, Bian T. miR-371, miR-138, miR-544, miR-145, and miR-214 could modulate Th1/Th2 balance in asthma through the combinatorial regulation of Runx3. Am J Transl Res. 2017;9: 3184–3199.
53. Corrêa APFL, Dossi ACS, de Oliveira Vasconcelos R, Munari DP, de Lima VMF. Evaluation of transformation growth factor β1, interleukin-10, and interferon-γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. Vet Parasitol. 2007;143: 267–274.
54. Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by Leishmania chagasi. Vet Immunol Immunopathol. 2007;115: 135–145.
55. Mazloom H, Alizadeh S, Esfahani EN, Razi F, Meshkani R. Decreased expression of microRNA-21 is associated with increased cytokine production in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of obese type

2 diabetic and non-diabetic subjects. Mol Cell Biochem. 2016;419: 11–17.