

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta dissertação será
disponibilizado somente a partir de
16/01/2028.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CAMPUS DE ARAÇATUBA

LUANA ARAUJO ZUTIN

***LEISHMANIA INFANTUM* AFFECTS ALTERNATIVE SPLICING IN HUMAN
NEUTROPHILS INFECTED *IN VITRO***

Araçatuba

2026

LUANA ARAUJO ZUTIN

***LEISHMANIA INFANTUM* AFFECTS ALTERNATIVE SPLICING IN HUMAN
NEUTROPHILS INFECTED *IN VITRO***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal (Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Pesquisadora Dra. Flavia Lombardi
Lopes

Araçatuba

2026

Z96l

Zutin, Luana Araujo

Leishmania infantum affects alternative splicing in human neutrophils infected in vitro / Luana Araujo Zutin. -- Araçatuba, 2026
94 f. : tabs., fotos

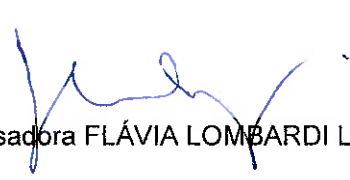
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba

Orientadora: Flavia Lombardi Lopes

1. Splicing alternativo. 2. Neutrófilos. 3. Leishmania infantum. 4.
Transcriptômica. 5. Ioformas. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUANA ARAUJO ZUTIN, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 16 de janeiro de 2026, às 9h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUANA ARAUJO ZUTIN, intitulada "*Leishmania infantum* affects alternative splicing in human neutrophils infected *in vitro*". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba / UNESP, Profa. Titular VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba / UNESP, Profa. Titular GLORIA REGINA FRANCO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Bioquímica e Imunologia / Universidade Federal de Minas Gerais, Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO _ _ _ _ . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES

Ao meu marido, que caminhou comigo com paciência,
cuidado e força nos momentos em que mais precisei.

Essa conquista também é sua.

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha fonte de sabedoria e sustento, não existem palavras nesta terra que expressem minha gratidão pelo grande amor e cuidado ao longo desse caminho, com a certeza de que Ele esteve presente em cada etapa dessa rotina intensa do mestrado. Reconheço que foi essa presença constante que me amparou e me deu discernimento e perseverança para concluir este trabalho, sendo este resultado reflexo da graça que me acompanhou durante todo o mestrado.

Ao meu marido, meu maior parceiro nessa etapa, deixo aqui minha gratidão mais profunda. Obrigada por cuidar de mim nesse processo árduo, pelas conversas que me acalmaram, por acreditar em mim nos momentos em que eu mesma duvidei, por celebrar comigo cada pequena conquista e principalmente pela paciência e compreensão em todos os meus momentos durante esse processo, o seu apoio constante foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais e à minha família, que desde sempre me ensinaram o valor do estudo e da curiosidade. Obrigada pelo incentivo silencioso e por nunca deixarem faltar amor, mesmo com a distância dos dias corridos.

Agradeço à minha orientadora, Dra. Flavia Lombardi Lopes, pelo acolhimento, pela confiança e por me permitir crescer na ciência, muito obrigada por acreditar em mim, pela paciência e por me dar a oportunidade de aprender com a senhora.

Sou muito grata ao Laboratório de Epigenômica da FMVA/UNESP, por ter sido um ambiente de pesquisa que me permitiu crescer como pesquisadora. Aos amigos de laboratório, Juliana, Mariana, Amanda e Matheus, obrigada pelas trocas, pela ajuda, pelos conselhos e pelos momentos de aprendizado compartilhado.

Agradeço também à minha banca de qualificação, Profa. Dra. Eliane Cervelatti, e à minha banca de defesa, Profa. Dra. Glória Regina e Profa. Dra. Valéria Marçal, por compartilharem conhecimentos que enriquecem o ambiente acadêmico. Vocês fazem a diferença na ciência, e minha admiração é genuína.

Sou grata à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, por me proporcionarem a realização do sonho de estar em uma das melhores universidades do Brasil e pela oportunidade de concluir meu mestrado. Ainda é um sonho para mim!

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido por meio do Processo nº 2018/26564-1.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Por fim, a realização deste trabalho só foi possível graças ao apoio e à colaboração de muitas pessoas que, de diferentes maneiras, contribuíram para a minha trajetória durante o mestrado. A todos que cruzaram meu caminho e, de algum modo, me ajudaram a chegar até aqui, deixo minha gratidão mais genuína.

**“Por isso não temas, pois estou com você;
não tenha medo, pois sou o seu Deus. Eu o
fortalecerei e o ajudarei; eu o segurarei com a
minha mão direita vitoriosa”**

Isaías 41:10

RESUMO

A leishmaniose visceral, causada por *Leishmania infantum*, permanece como um importante problema de saúde pública no Brasil e em outros países endêmicos, especialmente em regiões caracterizadas por vulnerabilidade socioeconômica. Após a infecção, o parasito interage com células do sistema imune inato, incluindo os neutrófilos, podendo modular processos moleculares essenciais para a resposta do hospedeiro. Entre esses processos, destaca-se o splicing alternativo, um mecanismo co-transcricional que amplia a diversidade de transcritos e proteínas a partir de um único gene e desempenha papel crítico na regulação da imunidade. Embora alterações de splicing já tenham sido descritas em diferentes contextos infecciosos, seus efeitos em neutrófilos humanos infectados por *L. infantum* ainda não haviam sido investigados. Neste estudo, analisou-se o transcriptoma de neutrófilos humanos infectados e não infectados, obtidos de doadores saudáveis em condições pareadas. Após o sequenciamento de RNA, foram realizados controle de qualidade, alinhamento, montagem e quantificação dos transcritos. A análise de splicing alternativo, conduzida por meio da ferramenta SUPPA2, permitiu identificar eventos e isoformas diferencialmente regulados entre as condições avaliadas, considerando como significativos os eventos com variações de inclusão iguais ou superiores a 0,1 e valores de p inferiores ou iguais a 0,05. Embora numerosos eventos de splicing tenham sido detectados nos neutrófilos, apenas uma fração apresentou diferenças significativas após a infecção, com predominância de eventos de exclusão de éxons. No nível de isoformas, dez transcritos foram diferencialmente regulados, sendo observada troca completa de isoformas nos genes *CCM2L* e *SLC25A52*. A predição estrutural dessas isoformas por meio do AlphaFold2 revelou alterações sutis em *SLC25A52*, enquanto *CCM2L* apresentou modificações estruturais marcantes, sugerindo possíveis implicações funcionais na resposta inicial à infecção. Esses achados indicam que *L. infantum* modula o splicing alternativo de forma seletiva em neutrófilos humanos, introduzindo uma camada adicional de regulação co-transcricional que pode influenciar a dinâmica da interação parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: splicing alternativo; neutrófilos; *Leishmania infantum*; transcriptômica; isoformas.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis, caused by *Leishmania infantum*, remains a major public health problem in Brazil and other endemic countries, particularly in regions marked by socioeconomic vulnerability. After infection, the parasite interacts with innate immune cells, including neutrophils, and can modulate essential molecular processes that shape the host response. Among these processes, alternative splicing stands out as a co-transcriptional mechanism that expands transcript and protein diversity from a single gene and plays a critical role in immune regulation. Although splicing alterations have been described in several infectious contexts, their effects on human neutrophils infected with *L. infantum* had not yet been investigated. In this study, the transcriptomes of infected and uninfected human neutrophils, obtained from healthy donors under paired conditions, were analyzed. Following RNA sequencing, quality control, alignment, transcript assembly, and quantification were performed. Alternative splicing analysis, conducted using SUPPA2, enabled the identification of differentially regulated events and isoforms between conditions, considering as significant those with inclusion changes ≥ 0.1 and p-values ≤ 0.05 . Although numerous splicing events were detected in neutrophils, only a subset showed significant differences after infection, with exon skipping events being the most prevalent. At the isoform level, ten transcripts were differentially regulated, and complete isoform switching was observed in the *CCM2L* and *SLC25A52* genes. Structural prediction of these isoforms using AlphaFold2 revealed subtle changes in *SLC25A52*, whereas *CCM2L* displayed pronounced structural and domain alterations, suggesting potential functional implications in the early response to infection. These findings indicate that *L. infantum* selectively modulates alternative splicing in human neutrophils, introducing an additional layer of co-transcriptional regulation that may influence parasite-host interaction dynamics.

Keywords: alternative splicing; neutrophils; *Leishmania infantum*; transcriptomics; isoforms.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1	Panorama clínico e epidemiológico das leishmanioses	13
1.2	Leishmaniose visceral humana.....	14
1.3	Resposta imune inata à infecção por leishmania e neutrófilos.....	14
1.4	Regulação pós-transcricional na resposta imune: splicing alternativo	17
1.4.1	<i>Biogênese do splicing e principais eventos de splicing alternativo.....</i>	17
2	OBJETIVOS	22
3	CAPITULO 1 - <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> AFFECTS ALTERNATIVE SPLICING IN HUMAN NEUTROPHILS INFECTED <i>IN VITRO</i>	23
3.1	Abstract	23
3.2	Introdução	24
3.3	Materials and methods	27
3.3.1	<i>Ethics statement</i>	27
3.3.2	<i>Experimental procedures</i>	28
3.3.3	<i>RNA-Seq data processing</i>	28
3.3.4	<i>Quantification of isoform and transcript expression levels</i>	28
3.3.5	<i>Alternative splicing analysis</i>	29
3.3.6	<i>Protein structural modeling of isoforms</i>	29
3.4	Results.....	29
3.4.1	<i>Detection and classification of alternative splicing events</i>	29
3.4.2	Isoform-level regulation and integration with differential expression ...	31
3.4.3	<i>Prediction of protein structure</i>	33
3.5	Discussion	36
3.6	References	39
3.7	Disclosure statement	42
3.8	Acknowledgements	43
3.9	Funding	43
3.10	Supporting information.....	43
	REFERENCIAS INTRODUÇÃO GERAL	77
	ANEXO A – NORMAS DA REVISTA EMERGING MICROBES & INFECTIONS.....	80

ANEXO B – TAYLOR & FRANCIS STANDARD REFERENCE STYLE
(NLM)83

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Panorama clínico e epidemiológico das leishmanioses

As leishmanioses constituem um complexo de doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania spp.*, transmitidos ao hospedeiro vertebrado pela picada de flebotomíneos hematófagos. As leishmanioses apresentam uma grande diversidade clínica, epidemiológica e biológica, refletindo uma heterogeneidade das espécies parasitárias envolvidas, dos vetores, dos reservatórios animais e das respostas imunes do hospedeiro (Alvar *et al.*, 2012; Burza; Croft; Boelaert, 2018).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as leishmanioses como doenças tropicais negligenciadas que estão associadas principalmente a populações em situação de vulnerabilidade socioeconômica, com acesso limitado a diagnóstico e tratamento (Pan American Health Organization - PAHO, 2024). Além disso, estima-se que milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção, com impacto substancial na morbidade, mortalidade e qualidade de vida em regiões consideradas endêmicas (Alvar *et al.*, 2012; Pareyn *et al.*, 2025). Entretanto, esse cenário tende a se agravar, uma vez que, nos últimos anos, as mudanças climáticas têm favorecido a expansão geográfica dos vetores, que são tipicamente termofílicos, para áreas anteriormente consideradas ambientalmente desfavoráveis, ampliando o risco de transmissão da doença em regiões não endêmicas (González *et al.*, 2025; Koch *et al.*, 2017).

Do ponto de vista biológico, as leishmanioses representam um modelo complexo de interação parasito-hospedeiro, uma vez que o estabelecimento da infecção depende não apenas da capacidade do parasito de sobreviver em células fagocíticas, mas também da sua habilidade de modular respostas inflamatórias, vias de sinalização celular e mecanismos regulatórios do hospedeiro (Burza; Croft; Boelaert, 2018; Pareyn *et al.*, 2025).

As leishmanioses apresentam diferentes manifestações clínicas que resultam tanto da diversidade das espécies do gênero *Leishmania spp.* quanto da forma como o hospedeiro responde à infecção. De maneira geral, são classificadas

em leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral (Burza; Croft; Boelaert, 2018; PAHO, 2024).

1.2 Leishmaniose Visceral Humana

A leishmaniose é classificada em três formas clínicas principais, formas cutâneas, mucocutâneas e viscerais, sendo essa última a manifestação clínica mais grave. A leishmaniose visceral (LV), causada por *Leishmania infantum*, é caracterizada por suscitar infecção sistêmica, comprometimento de órgãos linfoides e aumentar a letalidade quando não tratada adequadamente (Burza; Croft; Boelaert, 2018; Costa *et al.*, 2010). O Global Burden of Disease estimou que, em 2023, a LV foi responsável por aproximadamente 4.627 mortes, evidenciando a persistência do impacto letal da doença (Pareyn *et al.*, 2025).

O Brasil continua sendo o principal foco de LV, respondendo por 92% dos casos notificados na América do Sul e Central, em virtude da manutenção do reservatório de *L. infantum* em cães, da urbanização acelerada e da adaptação do vetor *Lutzomyia longipalpis* ao ambiente urbano, amplificado pela grande população do Brasil e pela detecção de casos mais eficientes em comparação com países vizinhos (Pareyn *et al.*, 2025).

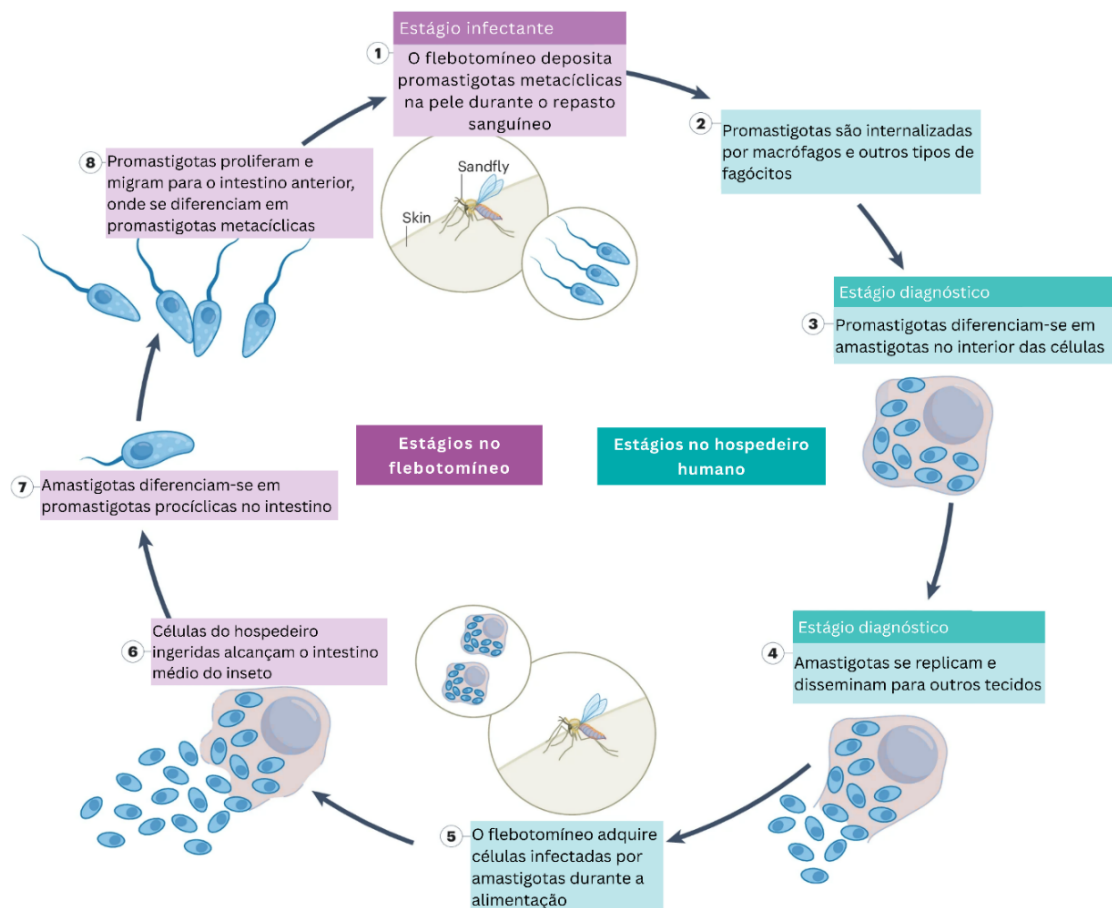
Clinicamente, a LV se manifesta por febre prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia e trombocitopenia, determinando um grande impacto da infecção sobre o sistema imune e a hematopoese (Burza; Croft; Boelaert, 2018; PAHO, 2024). Esse cenário reforça a necessidade de aprofundar o conhecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na infecção, principalmente nas fases iniciais da interação parasito-hospedeiro, que podem influenciar diretamente o estabelecimento e a progressão da doença.

1.3 Resposta Imune Inata à Infecção Por *Leishmania* e Neutrófilos

A infecção por leishmania inicia-se com a inoculação das formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo vetor. Nesse momento inicial, os parasitos são depositados na pele juntamente com a saliva do inseto, passando a interagir com o microambiente local. Em resposta a essa inoculação, ocorre o recrutamento rápido de células da imunidade

inata para o local da infecção no qual os parasitos, em sua forma promastigota, são rapidamente reconhecidos e internalizados por células fagocíticas, incluindo neutrófilos e macrófagos. Uma vez fagocitados, os parasitos começam a diferenciar-se em formas amastigotas, adaptadas a sobrevivência intracelular e iniciam a replicação no interior das células hospedeiras. Esses eventos iniciais estabelecem as bases para a disseminação do parasito e para a modulação da resposta imune do hospedeiro, conforme esquematizado no ciclo de vida da *Leishmania spp.* (Figura 1) (Pareyn *et al.*, 2025; Peters; Sacks, 2009)

Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania spp.* e estágios iniciais da infecção no hospedeiro humano e no flebotomíneo vetor.



Fonte: Adaptado de Pareyn *et al.*, 2025.

A leishmania possui dois estágios diferentes durante o seu ciclo de vida, sendo a forma promastigota predominante no vetor e a forma amastigota responsável pela infecção intracelular no hospedeiro vertebrado. Os neutrófilos representam um dos primeiros componentes celulares da resposta imune inata a entrar em contato

com as formas promastigotas de *L. infantum*, embora os macrófagos sejam reconhecidos como o principal nicho replicativo da forma amastigota de leishmania (Laskay; Van Zandbergen; Solbach, 2008; Peters; Sacks, 2009). Os neutrófilos são células que desempenham importantes funções no reconhecimento e controle inicial do patógeno, mas também apresentam uma atuação ambígua, pois embora possam liberar espécies reativas de oxigênio, armadilhas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps* - NETs) e citocinas inflamatórias também podem ser explorados pelo parasito como abrigo temporário ou veículo para alcançar os macrófagos, células que ocorrem a multiplicação do parasito (Hurrell; Regli; Tacchini-Cottier, 2016).

O reconhecimento inicial de *Leishmania spp.* pelas células da imunidade inata é mediado por receptores de reconhecimento padrão (*pattern recognition receptors* - PRRs), responsáveis pela detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e pela ativação das primeiras respostas inflamatórias do hospedeiro (Gurung; Kanneganti, 2015). Esses receptores estão expressos em diferentes células fagocíticas, incluindo neutrófilos e macrófagos permitindo a detecção das formas promastigotas logo após a inoculação do parasito na pele (Costa-da-Silva *et al.*, 2022). Entre os PRRs envolvidos nesse processo, destacam-se os receptores do tipo Toll (TLRs), como TLR2, TLR4 e TLR9, que têm sido associados ao reconhecimento de moléculas de *Leishmania* e à indução de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, modulando a intensidade da resposta imune local (Costa-da-Silva *et al.*, 2022). No entanto, evidências indicam que a ativação dessas vias nem sempre resulta em eliminação eficiente do parasito, uma vez que *Leishmania spp.* é capaz de interferir nos mecanismos de sinalização mediados por PRRs, favorecendo sua sobrevivência intracelular e contribuindo para a complexidade e ambiguidade da resposta imune inata observada durante a infecção (Carneiro; Peters, 2021; Gurung; Kanneganti, 2015).

Estudos *in vitro* e *ex vivo* demonstram que neutrófilos humanos são capazes de internalizar *L. infantum* e responder à infecção com ativação funcional e produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas (Oualha *et al.*, 2019). Entretanto, essa resposta nem sempre resulta em eliminação eficiente do parasito. Além disso, a *Leishmania spp.* pode explorar os neutrófilos como um compartimento transitório, utilizando-os como um “refúgio inicial” que facilita a evasão imune e a posterior transferência do parasito para macrófagos, fenômeno

frequentemente descrito como estratégia do “cavalo de Troia” (Hurrell; Regli; Tacchini-Cottier, 2016; Laskay; Van Zandbergen; Solbach, 2008).

1.4 Regulação pós-transcricional na resposta imune: *splicing* alternativo

A regulação da expressão gênica em células imunológicas não se limita ao nível transcricional. Mecanismos *co* e pós-transcricionais, como o *splicing* alternativo (AS), desempenham papel importante na geração de diversidade funcional do transcriptoma humano (Nilsen; Graveley, 2010; Pan *et al.*, 2008).

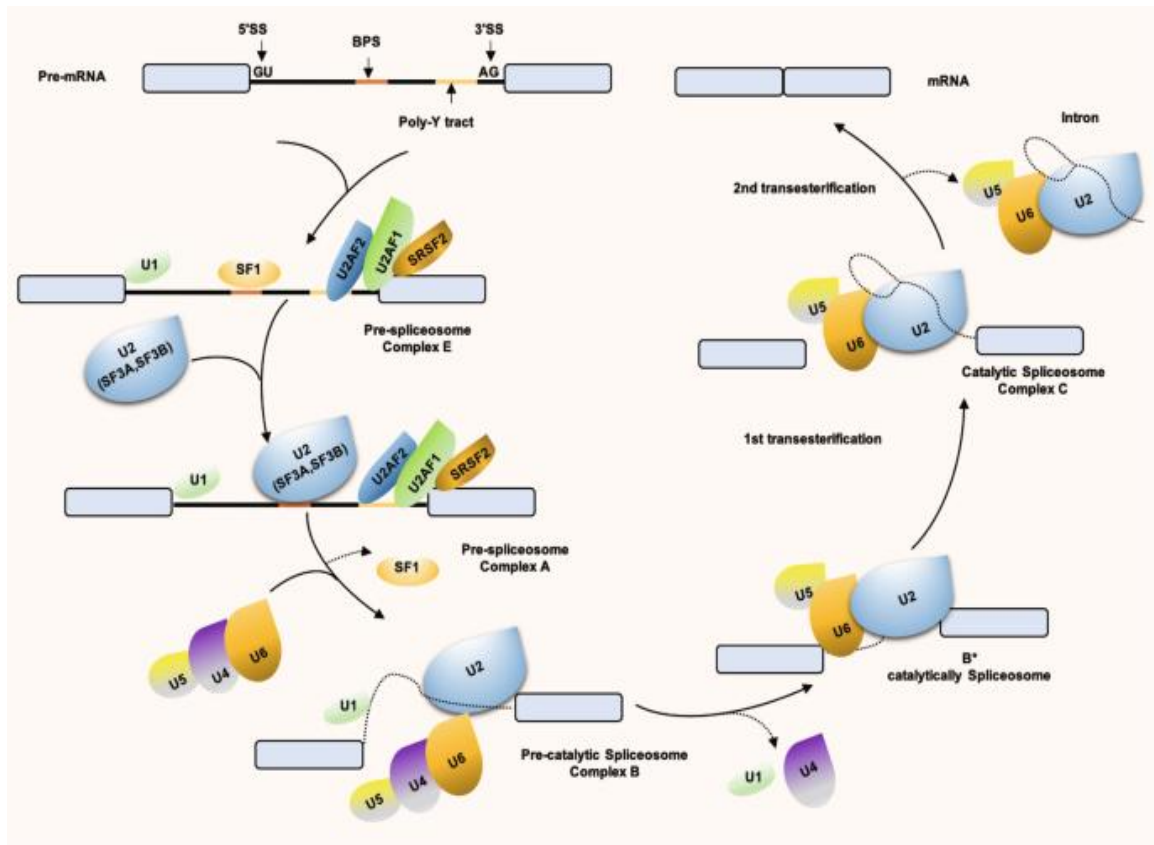
Estima-se que mais de 95% dos genes humanos expressem múltiplas isoformas de RNA por AS, permitindo o desenvolvimento de doenças infecciosas (Lyu *et al.*, 2023). Em células do sistema imune, esse mecanismo influencia diretamente vias de sinalização, ativação celular, produção de citocinas e decisões de sobrevivência ou morte celular (Tao *et al.*, 2024). Estudos demonstram que processos infecciosos podem remodelar padrões de *splicing* por meio da modulação de proteínas reguladoras de *splicing* (*RNA-binding proteins*), alterações no estado inflamatório e ativação de vias de estresse celular (Marasco; Kornblihtt, 2023).

1.4.1 Biogênese do *splicing* e principais eventos de *splicing* alternativo

O *splicing* do pré-mRNA é um processo fundamental da expressão gênica em eucariotos e ocorre no núcleo celular por meio da remoção de íntrons e da junção sequencial de éxons, resultando na formação do RNA mensageiro maduro. Esse processo é catalisado por um complexo altamente dinâmico denominado spliceossomo, composto por pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) associadas a um grande número de proteínas regulatórias. O spliceossomo atua no núcleo celular de forma coordenada com a transcrição do RNA pela RNA polimerase II, processando o pré-mRNA à medida que ele é sintetizado. Durante esse processo, o transcrito recém-formado já é reconhecido por componentes do spliceossomo, permitindo a remoção progressiva dos íntrons e a seleção de éxons para a junção correta dos mesmos. Essa ligação entre transcrição e *splicing* permite que a remoção de íntrons e a seleção de éxons ocorram de maneira dinâmica e regulada durante a síntese do RNA, contribuindo assim para a eficiência do processamento e para o controle de qualidade do RNA mensageiro antes da sua exportação para o citoplasma.

Dessa forma, a atuação do spliceossomo está diretamente relacionada a produção de RNAs mensageiros maduros funcionalmente competentes, que poderão ser traduzidos no citoplasma, conforme ilustrado na montagem do spliceossomo da Figura 2 (Marasco; Kornblihtt, 2023; Wahl; Will; Lührmann, 2009; Zhang *et al.*, 2021).

Figura 2 - Atuação do spliceossomo durante a maturação do pré-mRNA.



Fonte: Zhang *et al.*, 2021.

A montagem do spliceossomo ocorre de maneira ordenada ao longo do transcrito inicial e depende do reconhecimento preciso de sequências consideradas canônicas que estão localizadas nas extremidades dos íntrons, como o sítio doador (*5' splice site*), o sítio aceitador (*3' splice site*) e a região do ponto de ramificação. A precisão desse reconhecimento é essencial para a manutenção da integridade do transcriptoma e para a tradução correta das informações do transcrito, podendo ser controlada em diferentes contextos celulares e fisiológicos (Marasco; Kornblihtt, 2023; Wahl; Will; Lührmann, 2009).

O AS ocorre quando diferentes combinações de éxons e íntrons são selecionadas durante o processamento do mesmo pré-mRNA, originando múltiplas

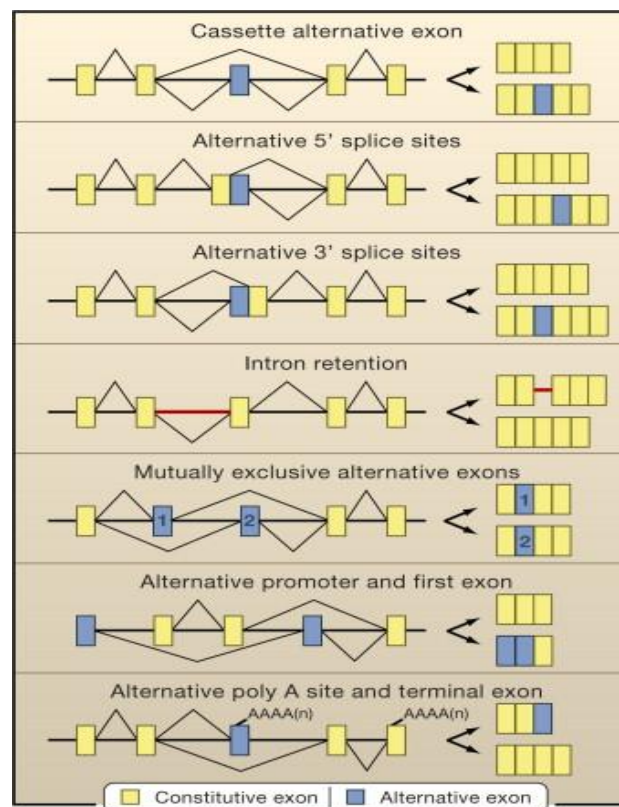
isoformas de RNA a partir de um único gene e, consequentemente, proteínas que podem variar estrutural e funcionalmente. Entretanto, o impacto do AS não se restringe à ampliação da diversidade proteica, uma vez que o processamento alternativo de transcritos também pode resultar na geração de isoformas não codificantes ou não produtivas, como transcritos processados desprovidos de uma open reading frame (ORF) funcional ou contendo códons de parada prematuros, além de transcritos longos não codificantes (lncRNAs), ampliando a diversidade funcional do transcriptoma (Liu *et al.*, 2023). Em mamíferos, esses eventos estão frequentemente associados a mecanismos regulatórios pós-transcricionais, incluindo a degradação seletiva de transcritos via nonsense-mediated decay (NMD), contribuindo para o controle fino da abundância de RNAs e proteínas (Liu *et al.*, 2023; Shin *et al.*, 2025). Dessa forma, o AS atua como um importante mecanismo de regulação da expressão gênica, modulando não apenas quais proteínas são produzidas, mas também quais RNAs são estáveis ou degradados, o que pode ser particularmente relevante em contextos de estresse celular e respostas adaptativas.

A escolha entre sítios alternativos de *splicing* não é aleatória, mas é resultado de um equilíbrio dinâmico entre elementos regulatórios cis presentes no RNA, como os *enhancers* e *silencers*, e fatores regulatórios trans, como proteínas ligantes de RNA (*RNA-binding proteins*). Esses fatores modulam a montagem do spliceossomo e promovem ou inibem a inclusão de éxons específicos em resposta a sinais celulares e estímulos ambientais e de estresse, atribuindo ao AS um papel importante na adaptação funcional das células (Marasco; Kornblihtt, 2023; Pan *et al.*, 2008). Esses processos permitem à célula ajustar rapidamente o repertório de isoformas expressas, incluindo a geração de isoformas não codificantes ou degradáveis que participam da regulação fina da expressão gênica em diferentes condições fisiológicas (Liu *et al.*, 2023).

Os principais tipos de eventos canônicos de AS descritos em células humanas incluem a exclusão ou inclusão de éxons (*skipped exon*, SE), a utilização de sítios alternativos 5' ou 3' (A5SS e A3SS), a retenção de íntrons (RI), a inclusão de éxons mutuamente exclusivos (MX), o uso de primeiros éxons alternativos (*alternative first exon*, AF) e últimos éxons alternativos (*alternative last exon*, AL), em que observamos também terminações e início alternativos conforme esquematizado por Blencowe (2006) na Figura 3 (Blencowe, 2006; Marasco; Kornblihtt, 2023; Pan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2021). Esses diferentes eventos resultam em variações na

estrutura do transcrito, que pode alterar o seu comprimento, a composição de domínios proteicos específicos, a sua estabilidade e também sua localização celular. Consequentemente, o AS exerce um impacto direto sobre a função das proteínas codificadas, influenciando processos celulares básicos, como sinalização, sobrevivência celular e respostas adaptativas, especialmente em contextos de estresse ou ativação imunológica (Blencowe, 2006; Marasco; Kornblihtt, 2023; Pan *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2021).

Figura 3 - Principais tipos de splicing alternativo e terminação/início alternativo no transcriptoma humano.



Fonte: Blencowe, 2006.

Apesar do reconhecimento crescente da importância do AS na imunidade, há uma escassez de estudos que investiguem esse mecanismo em neutrófilos humanos durante infecções parasitárias, especialmente no contexto da LV, uma vez que os neutrófilos são uma das primeiras células recrutadas para o sítio de infecção e desempenham papel central na resposta imune inata. Estudos recentes indicam que a infecção por *L. infantum* é capaz de alterar a expressão de genes associados à regulação pós-transcricional, como as RBPs, em neutrófilos humanos, sugerindo que

o AS pode ser afetado durante a infecção (Scaramele *et al.*, 2024). No entanto, ainda não existem estudos sistemáticos dos eventos de AS diferencial nem da geração de isoformas com potencial impacto estrutural ou funcional. Essa lacuna limita a compreensão de como as alterações no AS observadas em neutrófilos se relacionam com a infecção e impede a identificação de novas camadas regulatórias relevantes para a patogênese da LV, bem como de possíveis alvos moleculares envolvidos na modulação da resposta do hospedeiro ao parasito.

REFERENCIAS INTRODUÇÃO GERAL

- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 5, art. e35671, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671.
- BLENCOWE, B. J. Alternative splicing: new insights from global analyses. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 1, p. 37-47, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.023.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2.
- CARNEIRO, M. B.; PETERS, N. C. The paradox of a phagosomal lifestyle: how innate host cell-leishmania amazonensis interactions lead to a progressive chronic disease. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, art. 728848, p. 1-22, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.728848.
- COSTA, C. H. N.; WERNECK, G. L.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; AGUIAR, G. B.; CARVALHO, A. S.; CAVALCANTI, J. C.; SANTOS, L. S. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? a case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 386-392, 2010. DOI: 10.1590/s0037-86822010000400010.
- COSTA-DA-SILVA, A. C.; NASCIMENTO, D. O.; FERREIRA, J. R. M.; GUIMARÃES-PINTO, K.; FREIRE-DE-LIMA, L.; MORROT, A.; DECOTE-RICARDO, D.; FILARDY, A. A.; FREIRE-DE-LIMA, C. G. Immune responses in leishmaniasis: an overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, Basel, v. 7, n. 4, art. 54, p. 1-16, 2022. DOI: 10.3390/tropicalmed7040054.
- GONZÁLEZ, C.; CALDERÓN, J. M.; LOPEZ, A. M.; BERNARDINI, I.; GRADONI, L.; POMBI, M.; BONGIORNO, G.; GRABRIELLI, S. Species-specific variation in predicted distribution and habitat suitability of phlebotomine sand flies in Italy under different climate change scenarios. **Scientific Reports**, London, v. 15, n. 1, art. 13297, p. 1-9, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-96296-w.
- GURUNG, P.; KANNEGANTI, T.-D. Innate immunity against Leishmania infections. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 1286-1294, 2015. DOI: 10.1111/cmi.12484.
- HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different leishmania species drive distinct neutrophil functions. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 392-401, 2016. DOI: 10.1016/j.pt.2016.02.003.
- KOCH, L. K.; KOCHMANN, J.; KLIMPEL, S.; CUNZE, S. Modeling the climatic suitability of leishmaniasis vector species in Europe. **Scientific Reports**, London, v. 7, n. 1, art. 13325, p. 1-10, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-13822-1.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, Amsterdam, v. 213, n. 3, p. 183-191, 2008. DOI: 10.1016/j.imbio.2007.11.010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION - PAHO. **Leishmaniasis**. Brasília-DF, 2025. Disponível em: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>. Acesso em: 26 set. 2025.

LIU, M.; ZHANG, S.; ZHOU, H.; HU, X.; LI, J.; FU, B.; WEI, M.; HUANG, H.; WU, H. The interplay between non-coding RNAs and alternative splicing: from regulatory mechanism to therapeutic implications in cancer. **Theranostics**, Wyoming, v. 13, n. 8, p. 2616-2631, 2023. DOI: 10.7150/thno.83920.

LYU, M.; LAI, H.; WANG, Y.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; WU, D.; CHEN, J.; YING, B. Roles of alternative splicing in infectious diseases: from hosts, pathogens to their interactions. **Chinese Medical Journal**, Beijing, v. 136, n. 7, p. 767-779, 2023. DOI: 10.1097/CM9.0000000000002621.

MARASCO, L. E.; KORNBLIHTT, A. R. The physiology of alternative splicing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 24, n. 4, p. 242-254, 2023. DOI: 10.1038/s41580-022-00545-z.

MARTINEZ, N. M.; LYNCH, K. W. Control of alternative splicing in immune responses: many regulators, many predictions, much still to learn. **Immunological Reviews**, Hoboken, v. 253, n. 1, p. 216-236, 2013. DOI: 10.1111/imr.12047.

NILSEN, T. W.; GRAVELEY, B. R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. **Nature**, London, v. 463, n. 7280, p. 457-463, 2010. DOI: 10.1038/nature08909.

OUALHA, R.; BARHOUMI, M.; MARZOUKI, S.; HARIGUA-SOUIAI, E.; AHMED, M. B.; GUIZANI, I. Infection of human neutrophils with leishmania infantum or leishmania major strains triggers activation and differential cytokines release. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 9, art. 153, p. 1-16, 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00153.

PAN, Q.; SHAI, O.; LEE, L. J.; FREY, B. J.; BLENCOWE, B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. **Nature Genetics**, New York, v. 40, n. 12, p. 1413-1415, 2008. DOI: 10.1038/ng.259.

PAREYN, M.; ALVES, F.; BURZA, S.; CHAKRAVARTY, J.; ALVAR, J.; DIRO, E.; KAYE, P. M.; GRIENSVEN, J. Leishmaniasis. **Nature Reviews Disease Primers**, London, v. 11, n. 1, art. 81, p. 1, 2025. DOI: 10.1038/s41572-025-00663-w.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 9, p. 1290-1296, 2009. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01348.x.

SCARAMELE, N. F.; TROIANO, J. A.; FELIX, J. S.; COSTA, S. F.; ALMEIDA, M. C.; ATHAYDE, F. R. F.; SOARES, M. F.; LOPES, M. F. S.; FURLAN, A. O.; LIMA, V. M. F.; LOPES, F. L. Leishmania infantum infection modulates messenger RNA, microRNA and long non-coding RNA expression in human neutrophils in vitro. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 18, n. 7, art. e0012318, p. 1-23, 2024. DOI: 10.1371/journal.pntd.0012318.

SHIN, J.; FREDERICKS, A. M.; ARMSTEAD, B. E.; AYALA, A.; COHEN, M.; FAIRBROTHER, W. G.; LEVY, M. M.; LILLARD, K. K.; RAGGI, E.; NAU, G. J.; MONAGHAN, S. F. Predicting nonsense-mediated mRNA decay from splicing events in sepsis using RNA-Sequencing data. **medRxiv**, Cold Spring Harbor, 2025.03.31.25324958, 2025. Preprint. DOI: 10.1101/2025.03.31.25324958.

TAO, Y.; ZHANG, Q.; WANG, H.; YANG, X.; MU, H. Alternative splicing and related RNA binding proteins in human health and disease. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 9, n. 1, art. 26, p. 1-33, 2024. DOI: 10.1038/s41392-024-01734-2.

WAHL, M. C.; WILL, C. L.; LÜHRMANN, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 701-718, 2009. DOI: 10.1016/j.cell.2009.02.009.

ZHANG, Y.; QIAN, J.; Gu, C.; YANG, Y. Alternative splicing and cancer: a systematic review. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, London, v. 6, n. 1, art. 78, p. 1-14, 2021. DOI: 10.1038/s41392-021-00486-7.