

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

JAQUELINE POLETO BRAGATO

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

ARAÇATUBA
2021

JAQUELINE POLETO BRAGATO

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

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

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

ARAÇATUBA
2021

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

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

1. Leishmaniose Canina. 2. miRNA-21. 3. Resposta Imune.
4. CD69. 5. IL-10. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

Valéria M. F. de Lima

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

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

Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)

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

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Virtual)

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

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

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

Prof. Dr. ALEXANDRE BARBOSA REIS (Participação Virtual)

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

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

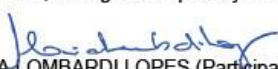
Título: miRNA-21 na regulação da resposta imunológica na Leishmaniose Visceral Canina

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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


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

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

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

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

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

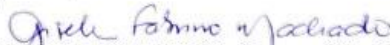
AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

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


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

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

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

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

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

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

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

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

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

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

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: JAQUELINE POLETO BRAGATO

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

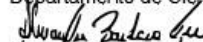
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

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

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

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

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


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

Araçatuba, 06 de agosto de 2021.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

Chico Xavier

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose Visceral	13
1.2 Resposta imune na LCan	16
1.3 MicroRNAs e a resposta imune	18
2 CAPÍTULO 1 - MIRNA-21 REGULATES CD69 AND IL-10 EXPRESSION IN CANINE LEISHMANIASIS	22
2.1 Resumo	23
2.2 Abstract	24
2.3 Introduction	25
2.4 Materials and methods	26
2.4.1 Animals screening and collection of samples	26
2.4.2 Isolation of splenic leukocytes	27
2.4.3 Serological diagnosis by ELISA	27
2.4.4 DNA extraction and determination of the <i>Leishmania</i> species	28
2.4.5 Extraction and quantification of total RNA	28
2.4.6 Real-time PCR for miR-21	28
2.4.7 Transfection with miR-21 mimic and inhibitor in splenic leukocytes	29
2.4.8 Flow cytometry analysis in splenic leukocytes	29
2.4.9 Dosage of cytokines by ELISA	30
2.4.10 Statistical analysis	31
2.5 Results	31
2.5.1 miR-21 expression is increased in CanL	31
2.5.2 Expression of proteins in splenic leukocytes of CanL and healthy dogs	31
2.5.3 miR-21 mimics lead to decreased CD69 expression by B lymphocytes in healthy dogs and those with CanL	33
2.5.4 IL-10 expression decreased in the presence of miR-21 inhibitor	35
2.6 Discussion	36
2.7 References	38
2.8 Supporting Information	42
APÊNDICE A: REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	46
ANEXO A: NORMAS DA REVISTA PLOS ONE	56
ANEXO B: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	59

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (L.), da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae [1]. O gênero *Leishmania* compreende um grupo importante de parasitos 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 grave que é a forma visceral [2].

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 [1]. Leishmaniose Visceral (LV) é causada pela espécie *L. donovani* na Ásia e África, e pela espécie *L. infantum* no Mediterrâneo e nas Américas [3], e é a forma clínica mais severa das leishmanioses devido a frequentes complicações, podendo levar a morte se não tratada [4].

Essa doença está presente em quase 100 países do mundo e afeta mais de 1,3 milhão de pessoas anualmente (0,3 milhão na forma visceral e 1 milhão na forma cutânea) [3] e causa aproximadamente entre 20.000 e 40.000 mortes por ano [1].

Nas Américas a LV está presente em 12 países, sendo que 96% dos casos são no Brasil [4]. A expansão da LV na América Latina tem sido associada com: destruição de ecossistemas e modificação de ambientes naturais devido ao desmatamento, estabelecimento de assentamentos rurais, industrialização e construção de estradas, rodovias, gasoduto Bolívia-Brasil, campos de mineração, barragens e usinas hidrelétricas; urbanização, associada à migração em massa de pessoas das áreas rurais para as cidades; a migração concomitante de cães domésticos infectados; movimento de cães com leishmaniose visceral canina para impedir que sejam sacrificados; pobreza e falta de saneamento; e medidas de controle de vetores e doenças ineficazes ou parcialmente eficazes [5–11].

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 [12]. 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 [13].

Originalmente, a doença era limitada a ambientes rurais, entretanto, com o tempo, houve uma transição epidemiológica, com incidência crescente nas áreas urbanas, associada à colonização do flebotomíneo e à disseminação e adaptação dos hospedeiros a esses ambientes doméstico e antrópico [6,7,9,10].

A transmissão entre hospedeiros vertebrados no Novo Mundo é feita pela picada do flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis* e no Velho Mundo pelo gênero *Phlebotomus* [14], porém, além dessas, outras espécies já foram identificadas como vetores da doença, como o *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia forattinii* [15]. Mesmo com a dispersão dos flebotomíneos para quase todas as regiões do Brasil, a ausência do vetor em áreas onde existem casos de LV sugere a existência de outros modos de transmissão [16]. Pulgas [17] e carrapatos [17,18] também já foram demonstrados como possíveis transmissores de *L. infantum*. Já foi descrita também a ocorrência de transmissão venérea [19], vertical [20–22] e por transfusão sanguínea [23].

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 [24].

Embora haja um número crescente de mamíferos hospedeiros, incluindo o homem, que tem servido como reservatório para a infecção do flebotomíneo vetor, os cães permanecem uma fonte indireta essencial em muitas situações em que o ciclo de transmissão de *L. infantum* ocorre [25], sendo eles de extrema importância na manutenção do ciclo epidemiológico da doença, devido ao parasitismo intenso na pele [26]. Sendo assim, os cães são o principal reservatório do parasito em ambiente doméstico [27,28].

O aumento no número de casos no homem pode ser relacionado ao aumento do número de casos da doença em cães [29,30]. A prevalência de LCan em áreas endêmicas pode atingir 20 a 40% da população [29], porém estudos

epidemiológicos que utilizam técnicas moleculares em áreas endêmicas mostram que a prevalência de infecção canina pode ser consideravelmente maior que a soroprevalência [28].

Alguns cães infectados por *L. infantum* podem ser assintomáticos [31], porém o parasita pode causar lesões e sintomas que são característicos da LCan, que são dermatite difusa cutânea, linfadenopatia, onicogribose, perda de peso, caquexia, febre e doença renal [32]. Além da sintomatologia clássica, o parasito pode eventualmente causar danos ao sistema reprodutor masculino [33], podendo inclusive ser detectado no sêmen [34]. Alterações laboratoriais também são encontradas nos cães com LCan, dentre elas anemia não regenerativa, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, trombocitopenia, proteinúria, azotemia renal, aumento de enzimas hepáticas [32].

O estadiamento clínico da LCan é realizado com base no resultado sorológico, sinais clínicos e alterações laboratoriais, onde são classificados em estágio de I a IV da doença, facilitando assim, que o clínico determine a melhor conduta para o tratamento e determinação do prognóstico do animal. O cão no estágio I (doença discreta) apresenta titulação de anticorpos anti-leishmania negativa, sinais clínicos menos evidentes, como linfadenopatia periférica ou dermatite papular, normalmente sem anormalidade nos exames laboratoriais. No estágio II (doença moderada), o cão pode apresentar: titulação de anticorpos anti-leishmania variando de baixa a alta, sinais clínicos do estágio I e também lesões cutâneas, úlceras nasais, anorexia, perda de peso e febre, com anormalidades nos exames clínico-patológicos como hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia porém ainda apresenta funções renais dentro dos parâmetros de normalidade. No estágio III (doença grave), a titulação de anticorpos anti-leishmania pode variar de média a alta, e além dos sinais clínicos listados nos estágios I e II apresenta sinais oriundos de lesões do complexo imune como vasculite, artrite e uveíte, com anormalidades clínico patológicas listadas no estágio II e ainda doença renal crônica. O estágio IV é classificado como doença muito grave, e os cães apresentam níveis elevados de anticorpos, com sinais clínicos listados no estágio III além de tromboembolismo pulmonar e doença renal terminal, com anormalidades clínico-patológicas demonstradas por uma doença renal crônica e síndrome nefrótica [32].

O diagnóstico clínico da LCan é complexo, e não pode ser baseado apenas em anormalidades clínico-patológicas e exames como hemograma, perfil bioquímico

e urinálise. 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 [32].

Os principais métodos diagnósticos utilizados são técnicas parasitológicas, como 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 [32].

Na LCan, os animais tem aumento de imunoglobulinas de todas as classes [35]. O principal anticorpo que aumenta nos cães infectados é o IgG [36], 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 [37]. O diagnóstico parasitológico apesar de ter alta especificidade, pode apresentar baixa sensibilidade quando o parasitismo do tecido é baixo [38].

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 LCan no Brasil [39].

1.2 Resposta imune na LCan

Os cães com LCan apresentam uma resposta imunológica complexa, e esta resposta é determinante para a resistência ou susceptibilidade a doença [40,41]. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra *L. infantum*. A pele atua como uma barreira de proteção por meio da ativação do sistema complemento [41]. Porém, a saliva do flebotomíneo pode inibir a ação do complemento e consequentemente induzir a falha da resposta imune já no momento da inoculação [42]. Moléculas dos parasitos sobreviventes à ação do complemento são detectadas por receptores da imunidade inata presentes em células dendríticas, células natural killer e macrófagos [43]. 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 que ativam momentaneamente mecanismos leishmanicidas dos macrófagos infectados e induzem a resposta imune adaptativa [44,45].

Inflamassomas, também participam da resposta imune inata, 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-1 β 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 [43]. No rim, os produtos do inflamassoma IL-1 β e IL-18 são mediadores importantes da doença renal [46]. Os cães infectados com *Leishmania infantum* são um modelo natural de glomerulonefrite associada a LV. O complexo inflamassoma é regulado positivamente e ativado nos rins de cães infectados com *L. infantum*. Assim, os complexos inflamassoma possuem papéis potenciais no dano glomerular durante a LV e autofagia nas respostas celulares subsequentes [47].

Outros mecanismos atuantes na defesa inata são promovidos pelos neutrófilos. Os neutrófilos têm a capacidade de descondensar a cromatina e expulsar o DNA no ambiente extracelular circundante, resultando na captura e inativação de patógenos [48]. Este fenômeno é conhecido como armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e estudos mostraram que esses NETs não são apenas importantes para a destruição de bactérias e vírus, mas também em infecções por protozoários, incluindo *Leishmania* [49].

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 [50]. Na doença moderada os cães apresentaram 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 [51].

Apesar de mecanismos inatos desempenharem um papel importante nas defesas anti-*Leishmania* [52], a montagem eficiente de uma resposta imune adaptativa é indispensável para o controle da infecção. A resposta imune adaptativa envolvida no reconhecimento e controle das infecções por patógenos intracelulares, incluindo a infecção causada por *L. infantum*, é a resposta imune celular ou Th1 [53].

Durante essa resposta, células apresentadoras de antígeno, incluindo células dendríticas, capturam o parasito ou fragmentos dele na pele e migram para a região T do linfonodo de drenagem [54,55]. As células dendríticas que amadurecem em condições de estimulação intensa desenvolvem a capacidade de expressar moléculas co-estimulatórias e produzir IL-12 [56]. No linfonodo, após processamento de antígenos do protozoário, células dendríticas que expressam peptídeos da *Leishmania* acoplados a moléculas do MHC (classe I e classe II), moléculas co-estimulatórias membros da família B7 como (por exemplo, CD80 e CD86) [57], produzem IL-12 [58] e são capazes de estimular a proliferação e a diferenciação de linfócitos T naíve em linfócitos T efetores (T CD4+ e T CD8+). Com a diferenciação, as células T CD4+ Th1 produzem INF- γ e TNF- α nos tecidos afetados pela infecção e essas citocinas ativam mecanismos leishmanicidas, incluindo a produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (H_2O_2 e íon superóxido) nos macrófagos infectados pelo protozoário [58–60] e, dessa maneira, eliminam o parasito.

A resposta imune protetora contra *Leishmania* em cães está relacionada ao aumento da resposta Th1 com a produção de IFN- γ e IL-2, que são citocinas que promovem ativação de macrófagos e de linfócitos T citotóxicos [36]. A eliminação do parasito em macrófagos depende da produção de óxido nítrico mediada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), sendo esta induzida por IL-12 e TNF- α [61].

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 parasito [62]. No baço de animais com LCan, foi verificada uma resposta imune mista, envolvendo IFN- γ e com prevalência de IL-10 [63]. Há uma correlação positiva entre a progressão da LCan e os níveis de IL-10 no baço [64], e também no sangue de cães com LCan, onde o aumento da IL-10 tem sido associado a detecção de DNA parasitário [65].

1.3 MicroRNAs e a Resposta Imune

MicroRNAs (miRNAs) são 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.

Durante os últimos anos essas moléculas foram evidenciadas por apresentarem um papel crítico no desenvolvimento e função da resposta imunológica [66]. Os miRNAs tem a capacidade de atingir simultaneamente centenas de RNAs mensageiros (mRNA) transcritos, e promover a diferenciação em macrófagos com um fenótipo inflamatório ou não [67,68]. Uma alteração da expressão de miRNA também está envolvida na resposta a infecção por *Leishmania* spp. e pode promover a indução da imunidade [69,70].

Os miRNAs estão envolvidos na resposta adaptativa regulando a ativação, proliferação e apoptose de linfócitos T e B. Na LV a expressão diferencial de miRNAs já foi observada em diferentes modelos regulando a imunidade. A indução do miR-346 em células de linhagem humanas infectadas com *L. infantum* e *L. Viannia*, na análise *in silico* mostrou que o miRNA 346 pode desempenhar um papel na regulação das funções dos macrófagos, já que genes associados ao interferon ou MHC estão entre os alvos deste miRNA [71].

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 [70]. Em macrófagos humanos, a infecção *in vitro* por *L. major* altera o perfil de expressão de miRNAs já nas primeiras 24 horas pós infecção [72].

Em estudo *in vitro* em macrófagos humanos infectados por *L. donovani* a expressão de miR30A-3p foi significativamente aumentada e a transfecção transitória com um inibidor de miR30A-3p seguido de infecção por *L. donovani* promoveu a autofagia e diminuiu a carga de parasitas dos macrófagos, demonstrando o papel do miR30A-3p na regulação da eliminação de *L. donovani* mediada por autofagia tendo como alvo o gene BECN1 [73].

Em células mononucleares de sangue periférico de cães infectadas *in vitro* com *Leishmania infantum*, o microarranjo mostrou a alteração na expressão de 14 miRNAs, sendo um aumento do miR-206, miR-302d, miR-433, miR-214, miR-493, miR-514, miR-1835, miR-210, miR-539, miR-432, miR-188, miR-345 e diminuição na expressão do miR-489 e miR-503. Análise *in silico* demonstrou que os miRNAs com expressão aumentada tem como alvo 1541 genes, que podem modular importantes vias da resposta imune, como a MAPK, uma das vias mais importantes para a sobrevivência da *Leishmania* no interior das células do hospedeiro [74].

O microarranjo em células mononucleares de sangue periférico de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e saudáveis mostrou que a expressão dos miRNAs miR-21, miR-192, miR-194, miR-424, miR-371, miR-451 e miR-503 aumentou e dos miRNAs miR-150 e miR-574 diminuiu. A carga parasitária dos animais apresentou correlação positiva forte com a expressão de miR-194, correlação positiva regular com a expressão de miR-371 e correlação negativa regular com a expressão de miR-150 [75]. Em leucócitos esplênicos, o microarranjo mostrou aumento da expressão dos miR-21, miR-148a, miR-7, miR-615 e diminuição dos miR-125a, miR-125b e miR-150. A carga parasitária do baço desses animais apresentou correlação negativa com a expressão de miR-21 [76].

Análise *in silico* das vias e alvos dos miRNAs diferencialmente expressos e validados realizada utilizando o programa Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN®) mostrou vias canônicas importantes da imunidade que são reguladas por esses miRNAs, são elas a via de sinalização de p53, crosstalk entre células dendríticas e células NK, STAT3, papel antiproliferativo do TOB na sinalização de células T, sinalização de PTEN e sinalização de receptor de morte. Essas vias canônicas apresentaram diversos alvos para esses miRNAs, muitos deles estão diretamente relacionados a resposta imune na LCan, dentre eles TNF- α , IL-12, FAS, FASL, CCR7 e CD69 [75].

A citocina TNF- α está relacionada a resistência na LCan [77] e tem sua expressão diminuída por miR-21 [78,79]. Em cães com LCan assintomáticos há uma alta expressão de TNF- α em linfonodos com baixo parasitismo, e essa expressão é menor em cães sintomáticos, com maior carga parasitária, sugerindo que essa citocina possui uma função de proteção na infecção por *L. infantum* [80], porém a associação dessa citocina com miR-21 na LCan ainda não foi estudada.

FAS e FASL, moléculas importantes na apoptose de leucócitos na leishmaniose visceral canina [81], são suprimidos por miR-21 [82,83]. Os níveis de expressão de FAS e FASL estão diminuídos em células CD4⁺ do baço e do sangue periférico de cães infectados [81], e também os níveis solúveis de sFAS de leucócitos do baço são menores em cães com LCan em comparação com os controles [84].

CCR7, receptor de quimiocina importante para migração celular, é expresso em células dendríticas e tem sua expressão modulada por miR-21 [85]. As células dendríticas de camundongos infectados por *L. donovani* apresentaram comprometimento da migração da zona marginal para a região periarteriolar do baço,

em parte atribuída pela inibição da expressão CCR7 [86]. A interação entre células T e células dendríticas é essencial para gerar resposta imune adaptativa, células dendríticas maduras de camundongos com deficiência de CCR7 não migram para os gânglios linfáticos drenantes após a ativação impossibilitando uma resposta rápida das células primárias B ou T [87].

miR-21 altera a expressão de CD69 [88], marcador de ativação de linfócitos, incluindo células NK [89,90]. As células NK desempenham um papel fundamental na indução e polarização para Th1 ou Th2. As promastigotas de *Leishmania* podem induzir diretamente as células NK do sangue periférico humano de doadores saudáveis a secreção de IFN- γ na presença de IL-12 e células apresentadoras de antígenos profissionais [91], e isso pode ser relevante para o estabelecimento da resposta imune Th1, que é a resposta celular de proteção na LCan.

Na LCan, a supressão da resposta celular é determinante para a progressão da doença, portanto o conhecimento de fatores associados à regulação imunológica é essencial para a mudança do padrão de resposta. Sendo assim o objetivo dessa pesquisa foi analisar os alvos de miR-21 nos leucócitos esplênicos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, para desse modo, melhorar a nossa compreensão sobre a patogênese da LCan no hospedeiro, e como tal, revelar novos caminhos que possam constituir alvos terapêuticos.

2 CAPÍTULO 1 - MIRNA-21 REGULATES CD69 AND IL-10 EXPRESSION IN CANINE LEISHMANIASIS

Short title: miR-21 in the immunoregulation in canine leishmaniasis

Jaqueline Poleto Bragato, Gabriela Torres Rebech, Jéssica Henrique de Freitas, Marilene Oliveira dos Santos, Sidnei Ferro Costa, Flavia de Rezende Eugênio, Paulo Sérgio Patto dos Santos, Valéria Marçal Felix de Lima*

Department of Animal Clinic, Surgery and Reproduction, São Paulo State University, School of Veterinary Medicine, Araçatuba, São Paulo, Brazil.

*** Corresponding Author:**

E-mail: valeria.lima@unesp.br

2.1 Resumo

A Leishmaniose Visceral em humanos é uma doença crônica e fatal se não tratada. A Leishmaniose Canina (LCan) é um grave problema de saúde pública porque os animais infectados são poderosos transmissores do parasita para humanos por meio de vetores flebotomíneos. Portanto, os cães são um alvo importante para medidas de controle. A progressão da infecção canina é acompanhada por falha da imunidade celular com redução dos linfócitos circulantes e aumento das citocinas que suprimem a função dos macrófagos. Estudos mostraram que a regulação da função efetora de macrófagos e células T parece depender de miRNAs; miRNA-21 (miR-21) apresenta expressão aumentada em leucócitos esplênicos de cães com LCan e tem como alvos genes relacionados à resposta imune. Mimics e inibidores de miR-21 foram usados *in vitro* para transfectar leucócitos esplênicos de cães com LCan. Após a transfecção, os níveis de expressão das proteínas FAS, FASL, CD69, CCR7, TNF- α , IL-17, IFN- γ e IL-10 foram mensurados. Os níveis de expressão de FAS, FASL, CD69 e CCR7 diminuíram em leucócitos esplênicos de cães com LCan. O mimic de miR-21 diminuiu a expressão de CD69 em leucócitos esplênicos de cães com LCan e saudáveis. O inibidor de miR-21 diminuiu os níveis de IL-10 em sobrenadantes de cultura de leucócitos esplênicos no grupo CanL. Essas descobertas sugerem que miR-21 altera a resposta imune na LCan; portanto, miR-21 pode ser usado como um possível alvo terapêutico para LCan.

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

2.2 Abstract

Visceral leishmaniasis in humans is a chronic and fatal disease if left untreated. Canine leishmaniasis (CanL) is a severe public health problem because infected animals are powerful transmitters of the parasite to humans via phlebotomine vectors. Therefore, dogs are an essential target for control measures. Progression of canine infection is accompanied by failure of cellular immunity with reduction of circulating lymphocytes and increased cytokines that suppress macrophage function. Studies showed that the regulation of the effector function of macrophages and T cells appears to depend on miRNAs; miRNA-21 (miR-21) shows increased expression in splenic leukocytes of dogs with CanL and targets genes related to the immune response. Mimics and inhibitors of miR-21 were used *in vitro* to transfect splenic leukocytes from dogs with CanL. After transfection, expression levels of the proteins FAS, FASL, CD69, CCR7, TNF- α , IL-17, IFN- γ , and IL-10 were measured. FAS, FASL, CD69, and CCR7 expression levels decreased in splenic leukocytes from dogs with CanL. The miR-21 mimic decreased CD69 expression in splenic leukocytes from CanL and healthy groups. The miR-21 inhibitor decreased IL-10 levels in culture supernatants from splenic leukocytes in the CanL group. These findings suggest that miR-21 alters the immune response in CanL; therefore, miR-21 could be used as a possible therapeutic target for CanL.

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

2.3 Introduction

Visceral leishmaniasis (VL), also known as *kala-azar*, is caused by the protozoan *Leishmania infantum* (syn *Leishmania chagasi*) and is fatal if left untreated in over 95% of cases. An estimated 50000 to 90000 new cases of VL occur worldwide annually, and most cases occur in Brazil, East Africa, and India [1]. Dogs are considered the primary domestic reservoirs of *L. infantum* [2]. In humans and dogs, the parasite causes characteristic symptoms of the disease [3, 4]. The most frequent clinical signs of canine leishmaniasis (CanL) are lymphadenopathy, onychogryphosis, cutaneous lesions, weight loss, cachexia, fever, and locomotor abnormalities [5].

Dogs with CanL present a complex immune response, which is decisive for disease resistance or susceptibility [6, 7]. The protective immune response against *Leishmania* sp. in dogs is related to the increase in the Th1 response with the production of IFN- γ and IL-2, cytokines that promote activation of macrophages and cytotoxic T lymphocytes [8]. Susceptibility to infection has been associated with the predominance of IL-4 and IL-10; reducing the effects of Th1 cytokines that decrease the production of nitric oxide in macrophages prevents the destruction of the parasite [9].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that work as post-transcriptional regulators of gene expression, regulating the translation of proteins fundamental to the immune response [10]. In splenic leukocytes [11] and peripheral blood mononuclear cells from dogs with CanL [12], microarray analysis showed increased expression of miR-21 in the CanL group. The parasitic load in the spleens of these animals negatively correlated with the expression of miR-21 [11].

In silico analysis of pathways and targets of differentially expressed miRNAs in splenic leukocytes from dogs naturally infected by *L. infantum*, some genes related to the immune response in CanL were targets of miR-21 [11]. The canonical pathways included the miR-21 target mRNAs of FAS, FASL, CCR7, CD69, and TNF- α [11, 12].

IL-10 is associated with susceptibility in CanL, and high levels of this cytokine are detected in the spleens of dogs with CanL [13]. There was a positive correlation between splenic levels of this cytokine and the progression of CanL [14]. In peripheral blood mononuclear cells of dogs with CanL, increased IL-10 levels were

associated with the detection of parasitic DNA [15]. IL-10 mRNA was a target of miR-21 in a murine model of adenovirus [16] and autoimmune encephalomyelitis [17].

IFN- γ is a Th1 cytokine associated with resistance in CanL [13]. Significantly higher IFN- γ concentrations were noted in dogs in stage I of the disease [18]. IFN- γ -producing dogs presented lower antibody levels and lower blood parasitemia [18]. IL-17 is a mediator of inflammatory reactions in CanL, and the infection inhibited IL-17A mRNA expression in the spleen, especially in symptomatic dogs [19]. IL-17A acts synergistically with IFN- γ to promote protection against *L. infantum* infection [20]. IL-17 and IFN- γ mRNA were targets of CD69 in murine CD4⁺ cells [21, 22].

In the present study, we demonstrate that miR-21 overexpression leads to a decreased CD69 expression in splenic leukocytes of infected and healthy dogs, whereas decreased miR-21 expression leads to lower expression of IL-10 in culture supernatants from dogs with CanL.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Animal screening and collection of samples

The Committee for Ethics in Animal Experimental Research approved the study, with the approval of the Committee for Ethics in Animal Use of São Paulo State University, School of Veterinary Medicine, Araçatuba (process number 00624-2018).

Five healthy dogs were used in the control group. These animals were selected following clinical examination, complete blood count, and serum biochemical profile within the normal range for the species and negative results for CanL (serological [23] and molecular [24]; Table S1).

In the infected group, ten dogs were naturally infected with *L. infantum*; all animals were positive for leishmaniasis by serology and molecular testing and were kept at the Zoonosis Control Center of Araçatuba. These animals carried at least three characteristic clinical signs of the disease, including onychogryphosis, weight loss, ear-tip injuries, periocular lesions, alopecia, skin lesions, or lymphadenopathy (Table S1).

Blood samples from the healthy and infected groups were collected in tubes without EDTA to obtain serum for biochemical profiles (Table S2) and indirect ELISA (Table S1) to measure anti-leishmanial antibodies [23]. Blood was collected in EDTA-containing tubes for complete blood count (Table S3). Infected dogs were euthanized by barbiturate anesthesia (Tiopental, Cristália Itapira, SP), followed by intravenous

injection of 19.1% potassium chloride, as recommended for VL control in compliance with local legislation. After euthanasia, a 2-cm³ fragment of the spleen was collected for isolation of splenic leukocytes. Splenic fragments in control dogs were removed by surgical excision [25].

2.4.2 Isolation of splenic leukocytes

Splenic leukocytes were obtained from a 2-cm³ fragment that was macerated and added to 10 ml RPMI-1640 medium (Sigma, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 0.03% L-glutamine, and 100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. After removal of cell debris through a 100-µm cell strainer (BD Falcon Cell strainer, USA), suspensions were processed with 5 mL of red blood cell lysis buffer containing 7.46 g/L ammonium chloride (NH₄ClO₃) at 4° C for 10 minutes, centrifuged at 2000 rpm for 5 minutes, and washed with phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.2 three times. Cells were counted in a Neubauer chamber.

2.4.3 Serological diagnosis by ELISA

Samples were analyzed by ELISA using total antigen from lysed promastigotes [26]. The antigen was coated overnight with 20 µg/ml protein pH 9.6, then washed three times in PBS containing 0.05% Tween 20 (washing buffer) and saturated for 1 hour with 150 µl/well of a mixture of PBS and 10% FBS at room temperature. Next, the preparation was washed three times with washing buffer. Blocking buffer/Tween (100 µl of serum sample (1/400) diluted in PBS, pH 7.2, containing 0.05% Tween 20 and 10% FCS) was added to each well and incubated at room temperature for 3 h, followed by three washes with washing buffer. Subsequently, 100 µl/well of anti-dog IgG conjugated with horseradish peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) at appropriate dilution in blocking buffer/Tween was added, incubated at room temperature for 1 hour, and washed. Substrate solution (0.4 mg/ml o-phenylenediamine (Sigma) and 0.4 µl/ml H₂O₂ in phosphate citrate buffer, pH 5.0) was added at 100 µl/well and developed for 5 min at room temperature. The reaction was stopped with 50 µl of 3M H₂SO₄. Absorbance was measured at 490 nm using a Tecan microplate reader (Sunrise model ref. 16039400). Negative and positive controls were included on each plate. Positive controls obtained from a hyperimmune animal were

included. The cut-off was determined using the mean +3 SD of the readings obtained from serum samples of healthy dogs from non-endemic areas for leishmaniasis.

2.4.4 DNA extraction and determination of the *Leishmania* species

DNA extraction from splenic leukocytes samples from the experimental dogs was performed using 5×10^6 cells with the commercial DNAeasy kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's recommendations. Extracted DNA was quantified in a spectrophotometer 260/280 (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific) to measure purity and concentration and were then stored at -20°C until analysis.

Determination of the *Leishmania* species was performed by polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism [24], 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 a negative control (Fig. S1).

2.4.5 Extraction and quantification of total RNA

Extraction of total RNA, including miRNAs, from 5×10^4 splenic leukocytes post-transfection, was performed using the commercial mirVana kit for isolation of total RNA with phenol (Life Technologies, USA), following manufacturer's instructions. After RNA isolation, samples were stored at -80°C .

RNA samples were analyzed in a spectrophotometer (NanoDrop, Thermo Scientific, USA) for purity evaluation (260/280) and quantification.

2.4.6 Real-time PCR for miR-21

To confirm that miR-21 is upregulated in dogs with CanL obtained by [11], real-time quantitative PCR (qPCR) was performed. cDNA production was performed using the miScript RT II kit (Qiagen, USA), as recommended by the manufacturer. A total of 1 μg of RNA was used for each sample with the 5x miScript Hiflex Buffer, in a final volume of 20 μl . Mix was incubated for 60 min at 37°C , followed by 5 min at 95°C to inactivate the miScript Reverse Transcriptase. Next, qPCR was performed using commercially available specific primer for *Canis familiaris* miR-21 and the endogenous reference SNORD96A (miScript, Qiagen). The SYBR Green system (MyScript SYBR

Green PCR Kit, Qiagen) was used in a real-time thermal cycler (RealPlex, Eppendorf). Amplification conditions consisted of an initial activation step of 95 °C for 15 min followed by 40 cycles of 94 °C for 15 seconds, 55 °C for 30 seconds, and 70 °C for 30 seconds denaturation, annealing, and extension, respectively. For miRNA analysis, a standard curve was generated with serial dilution of a pool of cDNAs. The absolute quantification of miR-21 was performed by converting the sample cycle threshold values to a concentration (ng/μl) based on the standard curves generated using 10-fold serial dilutions of the cDNA pool. Values obtained for the target miRNA were then divided by SNORD96A values to obtain normalized target values for each sample. All samples were run in duplicate.

2.4.7 Transfection with miR-21 mimic and inhibitor in splenic leukocytes

Splenic leukocytes were cultured (1.6×10^5 cells/replicate) in triplicate in 24-well plates for 48 h at 37 °C in 5% CO₂. All-Stars Negative control siRNA (scrambled), miR-21 mimic (5 nM), and miR-21 inhibitor (50 nM) (miScript miRNA Mimic and Inhibitor Qiagen, USA) were used, and splenic leukocytes were transfected using 3 μL of Hiperfect (Qiagen, USA) in each well, following manufacturer's instructions. To evaluate transfection rates, AllStars HS Cell Death Control siRNA (Qiagen, USA) was used at a final concentration of 50 nM. The transfection rate was measured by flow cytometry using 7-AAD Viability Staining Solution (BioLegend, USA) according to the manufacturer's instructions. Cell death was evaluated using Trypan blue in a Neubauer chamber for optical microscopy. A medium transfection rate of 20% was obtained for both groups.

2.4.8 Flow cytometry analysis in splenic leukocytes

For flow cytometry analysis, 1×10^4 cells were incubated with Fc blocking buffer (10% FBS) for 30 min at room temperature. Cells were centrifuged at 1800 rpm for 7 minutes and then incubated with phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human CD95 (FAS) monoclonal antibody (BD Biosciences, USA), anti-human CD178 (FASL) monoclonal antibody (BD Biosciences, USA), and anti-human CD69 polyclonal antibody (Lifespan Biosciences, USA). To measure CCR7 in dendritic cells, splenic leukocytes were incubated with PE-conjugated anti-human CCR7 monoclonal antibody (Invitrogen, USA), anti-dog MHC class II conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (Bio-Rad, USA), or anti-human CD11c conjugated with peridinin-

chlorophyll-protein (Lifespan Biosciences, USA). To avoid non-specific binding, cells were incubated with respective control isotypes. Acquisition of 10,000 events was counted by experimental replicate on channels FL1, FL2, and FL3, and cytometric analysis was performed using an Accuri C5 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) with BD Accuri C6 software, version 1.0.264.21 (BD Biosciences, USA).

To determine CD69 expression on lymphocytes, splenic leukocytes were incubated with Fc blocking buffer (10% FBS) for 30 min at room temperature. Cells were centrifuged at 1800 rpm for 7 minutes and then incubated with anti-dog CD4 monoclonal antibody (FITC) (ABD Serotec, USA), anti-dog CD8 monoclonal antibody (FITC) (ABD Serotec, USA), or anti-human CD21 monoclonal antibody (FITC) (ExBio, Czech Republic) in different tubes, and with PE-conjugated anti-human CD69 polyclonal antibody (Lifespan Biosciences, USA) to obtain double tagging of CD69 in T CD4+, T CD8+, and B lymphocytes, respectively. To avoid non-specific binding, cells were incubated with respective control isotypes. Acquisition of 10,000 events was counted by experimental replicate on channels FL1 and FL2, and cytometry was performed using an Accuri C5 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) using BD Accuri C6 software version 1.0.264.21 (BD Biosciences, USA).

2.4.9 Dosage of cytokines by ELISA

After 48 h of transfection, supernatants from splenic leukocyte cultures were collected, centrifuged at 2500 rpm, and stored at -80°C until further analysis. Concentrations of TNF- α [12], IL-10 [17], IL-17, and IFN- γ [21] in the supernatant were determined by capture ELISA using a Canine DuoSet ELISA Kit (R&D Systems, USA) for the respective cytokines. The assay was performed according to the manufacturer's instructions. The plates were read using a Spectra Count™ reader (Packard BioScience Company) with a 450-nm filter. All measurements were performed in duplicate.

2.4.10 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). D'Agostino & Pearson, Shapiro–Wilk, and Kolmogorov-Smirnov tests were determined to assess for normality of distribution, and then non-parametric tests were used. The Mann–Whitney test was used for group

comparison. Treatment comparisons were evaluated using the Friedman test with Dunn multiple comparisons. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

2.5 Results

2.5.1 miR-21 expression is increased in CanL

Because miR-21 is an important regulator of the immune response, to confirm the increase in miR-21 expression in CanL, real-time PCR was performed with samples of splenic leukocytes from dogs of both groups. We found a higher expression of miR-21 in dogs with CanL than healthy dogs (Fig. 1).

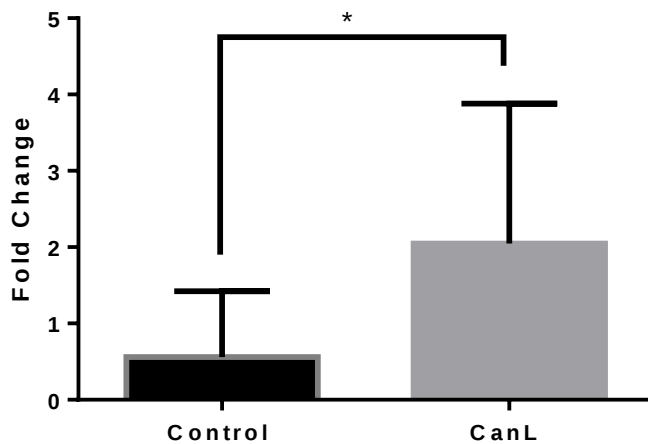


Figure 1. Expression of miR-21. miR-21 expression using real-time PCR. Expression of miR-21 was quantified using real-time PCR in splenic leukocytes of CanL and control dogs. Data represent the mean values of miRNA expression $\pm$ standard deviation, and the asterisks represent statistically significant data following the Mann–Whitney test. Results were considered significant when $p < 0.05$.

2.5.2 Expression of proteins in splenic leukocytes of CanL and healthy dogs

Expression of FAS, FASL, CD69, and CCR7 were compared between control and CanL groups. Proteins FAS (Fig. 2A), FASL (Fig. 2B), CD69 (Fig. 2C), and CCR7 (Fig. 2D), which mRNA is targeted by miR-21 [11,12] were decreased in splenic leukocytes from the CanL group.

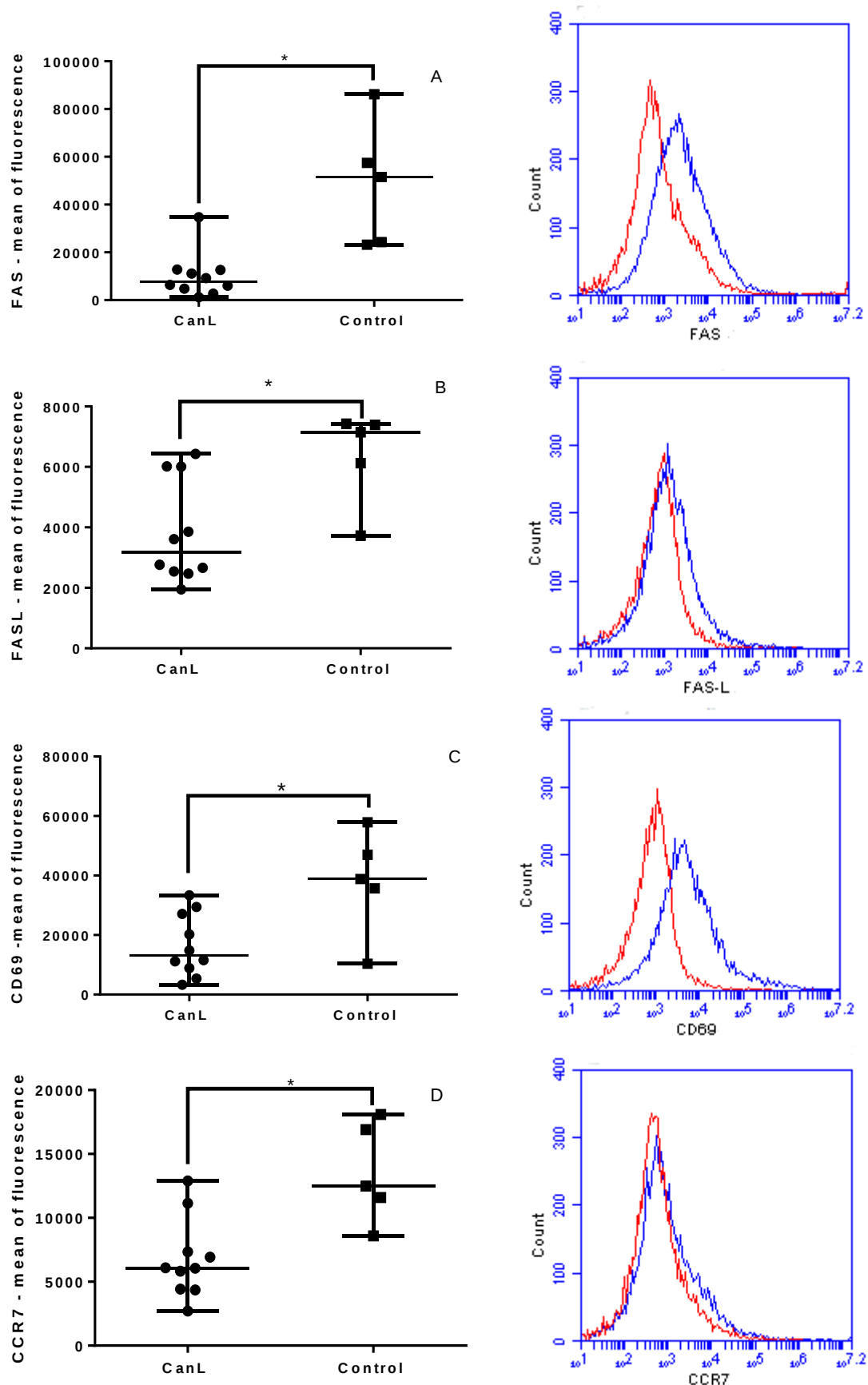


Figure 2. Expression of proteins which mRNA is target of miR-21 in CanL.
Expression of FAS (A), FASL (B), CD69 (C), and CCR7 (D) in splenic leukocytes from

CanL and healthy dogs after culture and respective representative histograms obtained from flow cytometry analysis. The red line represents the CanL group, and the blue line represents the control group. Cells were cultured for 48 h at 37 °C and 5% CO₂ without treatment (medium) and then incubated with monoclonal antibodies. Data are presented as median $\pm$ range. Asterisks represent statistical significance (Mann–Whitney, * $p < 0.05$).

2.5.3 miR-21 mimics lead to decreased CD69 expression by B lymphocytes in healthy dogs and those with CanL

To determine whether miR-21 affects the expression of FAS, FASL, CD69, and CCR7, splenic leukocytes were transfected with miR-21 mimics and inhibitors, and after 48 hours, protein expression was measured using flow cytometry. Expression of FAS, FASL, and CCR7 presented no statistically significant difference after transfection with mimics and inhibitors of miR-21 in CanL and healthy groups (data not shown). A decrease in CD69 protein expression was found in splenic leukocytes after transfection with miR-21 mimic in the control group (Fig. 3A) and the CanL group (Fig. 3B).

To determine which cell subpopulation showed decreased CD69 expression, splenic leukocytes from the CanL group were transfected with miR-21 mimics and inhibitors, and CD69 expression in CD4+, CD8+, and CD21+ cells was obtained by double tagging (Table S4). We found significantly lower CD69 expression only in B lymphocytes (CD21+) after transfection with miR-21 mimics compared with scrambled (Fig. 4).

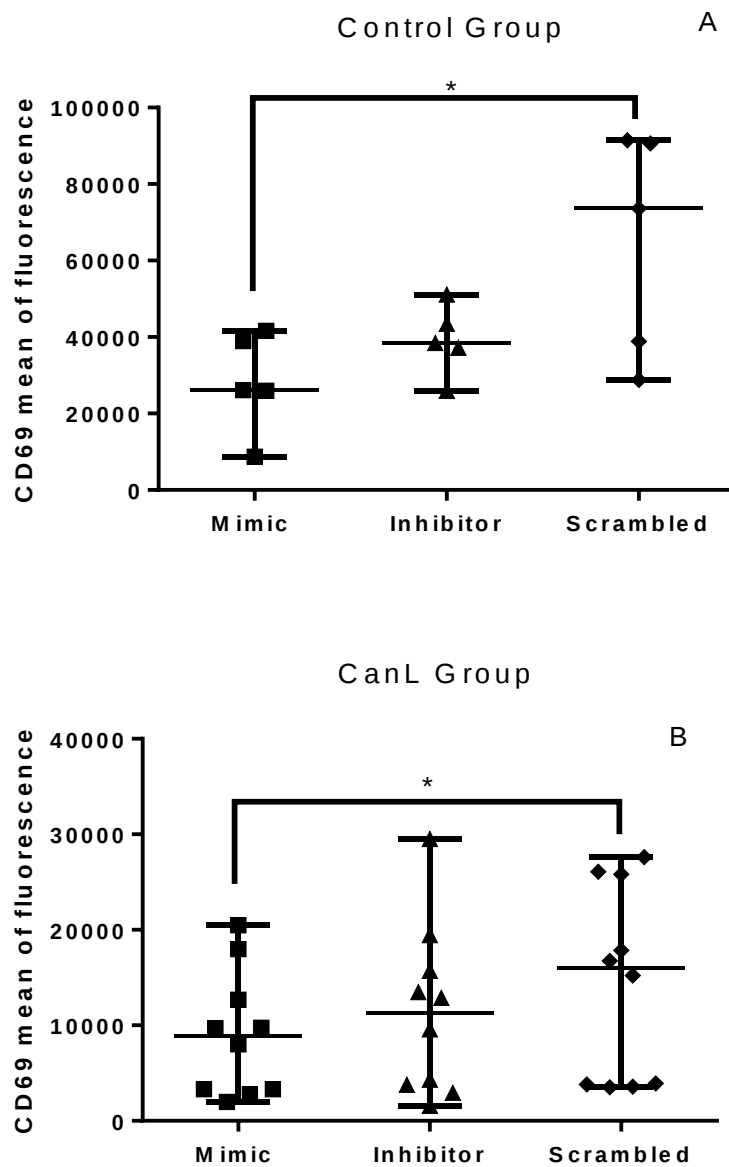


Figure 3. Expression of CD69 after transfection. Expression of CD69 protein in splenic leukocytes of the control (A) and CanL group (B). Splenic leukocytes of dogs naturally infected by *L. infantum* and healthy dogs were transfected with scrambled, miR-21 mimic, and miR-21 inhibitor, all in the presence of Hiperfect, following 48 h in culture at 37 °C and 5% CO₂. Data are presented as median ± range. The asterisk indicates significant differences (Friedman's multiple comparison test, * p < 0.05).

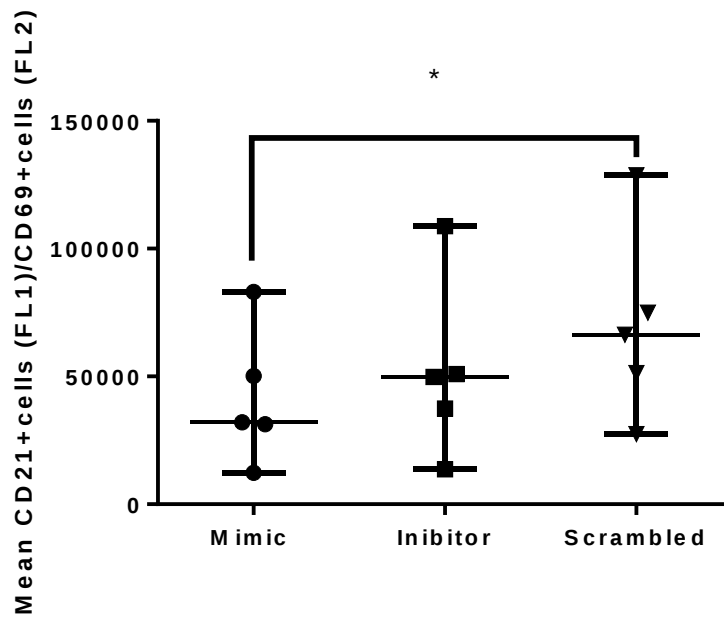


Figure 4. CD69 expression in B lymphocytes. Expression of CD69 protein in B lymphocytes (CD21+ cells) in the CanL group. Splenic leukocytes of dogs naturally infected by *L. infantum* were transfected with scrambled, miR-21 mimic, and miR-21 inhibitor, all in the presence of Hiperfect, following 48 h in culture at 37 °C and 5% CO₂. Data are presented as median $\pm$ range, and the asterisk indicates significant differences (Friedman's multiple comparison test, * $p < 0.05$).

2.5.4 IL-10 expression decreased in the presence of miR-21 inhibitor

To determine whether miR-21 regulates the expression of cytokines IL-10, TNF- α , IFN- γ , and IL-17, splenic leukocytes from the CanL group were transfected with miR-21 mimics and inhibitors, and after 48 hours, cytokine concentrations were measured by capture ELISA in cell culture supernatants. We observed a decrease in IL-10 in culture supernatants in the presence of miR-21 inhibitor in the CanL group (Fig. 5). TNF- α , IFN- γ , and IL-17 showed no significant differences (data not shown).

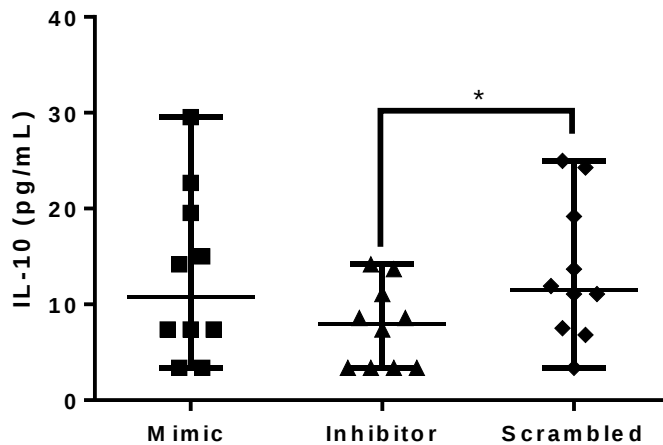


Figure 5. The concentration of IL-10 after transfection. IL-10 production was quantified in supernatants from splenic leukocytes cultures of dogs naturally infected by *L. infantum* and transfected with scrambled, miR-21 mimic, and miR-21 inhibitor, all in the presence of Hiperfect, following 48 h in culture. Data represent the median values of the IL-10 + range. Asterisks represent significance ($p < 0.05$) by the Friedman Test with the Dunn multiple comparisons.

2.6 Discussion

Dogs naturally infected with *L. infantum* that develop disease show an inability to mount a specific effective adaptive immune response; miRNAs, including miR-21, could be responsible for modulation of the immune system. To elucidate the role of miR-21 in the immune response of dogs with CanL, we evaluated target proteins of miR-21 after transfection with mimics and inhibitors. Real-time PCR confirmed higher expression of miR-21 in dogs with CanL than healthy dogs. *In silico* analysis showed that miR-21 targets mRNA of FAS, FASL, CCR7, CD69, TNF- α , and IL-10. Expression levels of proteins FAS, FASL, CCR7, and CD69 were decreased in dogs with CanL. Next, the role of miR-21 was evaluated using splenic leukocyte transfection with miR-21 mimics and inhibitors, and protein expression was studied. We found that FAS, FASL, and CCR7 expression was not regulated by miR-21; however, the miR-21 mimic decreased CD69 expression in B lymphocytes and the inhibition of miR-21 decreased IL-10 in culture supernatants from splenic leukocytes.

We observed lower expression levels of CD95 (FAS) and CD178 (FASL) in splenic leukocytes from infected dogs than dogs in the control group. FAS and FASL

play critical roles in the immune system, particularly in the death of target cells infected by pathogens and autoreactive lymphocytes' death. FASL-FAS signaling triggers apoptosis through recruitment mediated by FADD adapter proteins (FAS-associated protein with death domain, also called MORT1) and caspase-8 activation [27]. Similar to our finding, low FAS and FASL expression levels were observed in spleen and peripheral blood CD4⁺ cells from dogs with CanL [28]. The increase or decrease in miR-21 in cultures did not alter the expression of FAS and FASL, suggesting that, in dogs, these proteins may not be regulated by miR-21. The low transfection rate obtained may not have been sufficient to modulate the expression of these molecules.

CCR7 protein showed lower expression in splenic leukocytes from the CanL group than the control group. CCR7, a chemokine receptor important for cell migration, is expressed in dendritic cells and have the expression modulated by miR-21 in human CD4⁺ T cells [29]. Dendritic cells from mice infected with *L. donovani* showed impairment of migration from the marginal zone to the periarteriolar region of the spleen, partly attributed to the inhibition of CCR7 expression [30]. The interaction between T cells and dendritic cells is essential to generate an adaptive immune response; mature dendritic cells from mice with CCR7 deficiency do not migrate to draining lymph nodes after activation, making it impossible to mount a rapid response of primary B or T cells. [31]. These findings suggest that it is possible in CanL that the low expression of CCR7 compromises cell migration; nevertheless, we did not observe regulation of the expression of CCR7 by miR-21, which may be due to low transfection rates.

We also found lower expression of CD69 in splenic leukocytes from dogs with CanL than healthy dogs. CD69 mRNA is a target of miR-21 in splenic leukocytes of dogs with CanL [11]. CD69 is a cell surface molecule and is one of the first to be expressed after activation of T and B lymphocytes and other cells of hematopoietic origin [32, 33]. CD69 expression rapidly increases after activation in most leukocytes, highlighting its widespread use as a marker of activated lymphocytes and NK cells [21]. In addition to its intrinsic value as an activation marker, CD69 is also an essential regulator of immune responses [21]. Therefore, it is crucial to elucidate the role of CD69 expression in the function of immune cells in *L. infantum* infection of dogs.

A decrease in CD69 expression was observed in splenic leukocytes in the presence of miR-21 mimic compared to scrambled, both in dogs with CanL and in healthy dogs. The low expression of CD69 observed in dogs with CanL contrasts with

results in experimental models in mice infected with *L. infantum*, where an increase in the percentage of CD69+ cells was observed in the spleen in the acute phase [34] and in the chronic phase of the disease where activation of protective immunity reduces the splenic parasitic load [35]; this is not seen in CanL, where the disease is progressive. These results suggest that miR-21 reduces the expression of CD69 by B cells, possibly regulating B lymphocyte function.

There was a decrease in the expression of IL-10 in the presence of miR-21 inhibitor in the CanL group. IL-10 is the primary cytokine suppressing the immune response in humans and a murine model of VL [36, 37]. In CanL, increased levels of IL-10 were described [38], and this increase was associated with the detection of parasitic DNA [15], confirming the regulatory role of IL-10 in the spleen. Differently to our finding, in naive T cells from healthy humans, the induction of miR-21 led to an increase in IL-10 expression [39]. These findings suggest that the parasite may be using IL-10 as an escape mechanism, modulating immune responses through miR-21.

We conclude that *L. infantum* infection in dogs increases expression miR-21 that regulates CD69 and IL-10 expression, essential proteins involved in the immune response to the parasite.

2.7 References

1. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Apr 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002;18: 399–405. doi:10.1016/S1471-4922(02)02347-4
3. Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S. Studies on canine leishmaniasis control: Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82: 566–7.
4. Badaró R, Jones TC, Lorenço R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis.* 1986;154: 639–49.
5. 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. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022
6. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2006;28: 329–337. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x
7. Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163: 94–102. doi:10.1016/j.vetimm.2014.11.011
8. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenberg J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994;62: 229–35.
9. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999;112 Pt 18: 2993–3002.
10. Liu G, Abraham E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33: 170–177. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300068
11. Melo LM, Bragato JP, Venturin GL, Rebech GT, Costa SF, Garcia LE, et al. Induction of miR 21 impairs the anti-*Leishmania* response through inhibition of IL-12 in canine splenic leukocytes. *PLoS One.* 2019;14: 1–19. doi:10.1371/journal.pone.0226192
12. Bragato JP, Melo LM, Venturin GL, Rebech GT, Garcia LE, Lopes FL, et al. Relationship of peripheral blood mononuclear cells miRNA expression and parasitic load in canine visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2018;13: e0206876. doi:10.1371/journal.pone.0206876
13. Corrêa APFL, Dossi ACS, de Oliveira Vasconcelos R, Munari DP, de Lima VMF. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Vet Parasitol.* 2007;143: 267–274. doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.023
14. Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115: 135–145. doi:10.1016/j.vetimm.2006.10.001
15. Boggiatto PM, Ramer-Tait AE, Metz K, Kramer EE, Gibson-Corley K, Mullin K, et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17: 267–73.

- doi:10.1128/CVI.00456-09
16. Shi L, Guo H, Li Z, Wang Y, Wang Y, Cui Y. Adenovirus-mediated down-regulation of miR-21-5p alleviates experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2019;74. doi:10.1016/j.intimp.2019.105698
 17. Wang H, Xu W, Shao Q, Ding Q. miR-21 silencing ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting the differentiation of IL-10-producing B cells. *Oncotarget.* 2017;8: 94069–94079. doi:10.18632/oncotarget.21578
 18. Solano-Gallego L, Montserrat-Sangrà S, Ordeix L, Martínez-Orellana P. Leishmania infantum-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. *Parasites and Vectors.* 2016;9. doi:10.1186/s13071-016-1598-y
 19. Nascimento MSL, Albuquerque TDR, Nascimento AFS, Caldas IS, Do-Valle-Matta MA, Souto JT, et al. Impairment of Interleukin-17A Expression in Canine Visceral Leishmaniosis is Correlated with Reduced Interferon- γ and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. *J Comp Pathol.* 2015;153: 197–205. doi:10.1016/j.jcpa.2015.10.174
 20. Nascimento MSL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Costa DL, Ryffel B, Duthie MS, et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against leishmania infantum infection. *J Infect Dis.* 2015;211: 1015–1026. doi:10.1093/infdis/jiu531
 21. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur J Immunol.* 2017;47: 946–953. doi:10.1002/eji.201646837
 22. Martín P, Gómez M, Lamana A, Cruz-Adalia A, Ramírez-Huesca M, Ursa MÁ, et al. CD69 Association with Jak3/Stat5 Proteins Regulates Th17 Cell Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2010;30: 4877–4889. doi:10.1128/mcb.00456-10
 23. De Lima VMF, Biazzone L, Silva AC, Correa APFL, Luvizotto MCR. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein a in naturally infected dogs. *Pesqui Vet Bras.* 2005;25: 215–218. doi:10.1590/s0100-736x2005000400005
 24. 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. doi:10.1590/s1984-29612016071

25. 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. doi:10.1016/j.vetpar.2011.08.024
26. Lima VMF, Gonçalves ME, Ikeda FA, Luvizotto MCR, Feitosa MM. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36: 485–489.
27. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity.* 2009. doi:10.1016/j.immuni.2009.01.001
28. Silva KLO, Melo LM, Perosso J, Oliveira BB, Santos PSP dos, Eugênio F de R, et al. CD95 (FAS) and CD178 (FASL) induce the apoptosis of CD4+ and CD8+ cells isolated from the peripheral blood and spleen of dogs naturally infected with *Leishmania* spp. *Vet Parasitol.* 2013;197: 470–476. doi:10.1016/j.vetpar.2013.07.012
29. Smigielska-Czepiel K, van den Berg A, Jellema P, Slezak-Prochazka I, Maat H, van den Bos H, et al. Dual Role of miR-21 in CD4+ T-Cells: Activation-Induced miR-21 Supports Survival of Memory T-Cells and Regulates CCR7 Expression in Naive T-Cells. *PLoS One.* 2013;8: 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0076217
30. Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol.* 2002;3: 1185–91. doi:10.1038/ni861
31. 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.
32. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today.* 1994;15: 479–483. doi:10.1016/0167-5699(94)90193-7
33. 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.
34. Christodoulou V, Messaritakis I, Svirinaki E, Tsatsanis C, Antoniou M. *Leishmania infantum* and *Toxoplasma gondii*: Mixed infection of macrophages in vitro and in vivo. *Exp Parasitol.* 2011;128: 279–84. doi:10.1016/j.exppara.2011.02.022

35. Tsagozis P, Karagouni E, Dotsika E. CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2003;25: 569–79. doi:10.1111/j.0141-9838.2004.00672.x
36. Bacellar O, D'oliveira A, Jerônimo S, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 2000;12: 1228–31. doi:10.1006/cyto.2000.0694
37. Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90: 3442–3446. doi:10.1073/pnas.90.8.3442
38. Almeida BFM de, Silva KLO, Chiku VM, Leal AAC, Venturin GL, Narciso LG, et al. The effects of increased heme oxygenase-1 on the lymphoproliferative response in dogs with visceral leishmaniasis. *Immunobiology.* 2017;222: 693–703. doi:10.1016/j.imbio.2016.12.006
39. Namdari H, Ghayedi M, Hadjati J, Rezaei F, Kalantar K, Rahimzadeh P, et al. Effect of MicroRNA-21 transfection on in-vitro differentiation of human naive CD4⁺ T cells to regulatory T cells. *Iran J Allergy, Asthma Immunol.* 2017;16: 235–244.

2.8 Supporting Information

S1 Table. Screening of dogs. Optical density on ELISA and clinical signs of CanL and control groups.

Animal	O.D. (ELISA)	Sex	Clinical Signs	PCR
Infected 1	1,132	F	Onychogryphosis, skin lesions, cachexia, seborrhea	+
Infected 2	1,065	M	Lymphadenopathy, onychogryphosis, cachexia and skin lesions	+
Infected 3	0,978	F	Lymphadenopathy, onychogryphosis, ear injuries, alopecia, skin lesions	+
Infected 4	0,636	M	Lymphadenopathy, cachexia, skin lesions, periocular lesion	+
Infected 5	1,374	F	Onychogryphosis, cachexia, alopecia, skin lesions	+
Infected 6	1,208	M	Lymphadenopathy, onychogryphosis, cachexia, alopecia	+

Infected 7	1,267	F	Lymphadenopathy, onychogryphosis, seborrhea, alopecia, skin lesions, periocular lesion, hepatosplenomegaly	+
Infected 8	1,052	F	Lymphadenopathy, onychogryphosis, periocular lesion, hepatosplenomegaly	+
Infected 9	0,968	F	Lymphadenopathy, onychogryphosis, cachexia	+
Infected 10	1,049	F	Lymphadenopathy, onychogryphosis, seborrhea	+
Control 1	0,062	F	No clinical signs	-
Control 2	0,026	M	No clinical signs	-
Control 3	0,147	F	No clinical signs	-
Control 4	0,028	M	No clinical signs	-
Control 5	0,071	F	No clinical signs	-

S2 Table. Biochemical profiles of CanL and control groups.

Animal	Albumin (g/dL)	Total Protein (g/dL)	Globulin (g/dL)	ALT (U/L)	Alkaline phosphatase (U/L)	GGT (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	Urea (mg/dL)
Reference	2,6-3,3	5,4-7,1	2,7-4,4	21-102	20-156	1,2-6,4	0,5-1,5	10,03-50,03
Infected 1	1,6	10,4	8,8	26	66	5,9	0,6	42
Infected 2	1	7,6	6,6	42	243	2,9	0,7	33
Infected 3	1,6	8	6,4	26	120	2	0,8	32
Infected 4	1,8	6,1	4,3	36	43	1,2	0,7	28
Infected 5	0,94	7	6,1	21	29	4,9	0,8	70
Infected 6	1,1	6,3	5,2	21	109	1,9	1	60
Infected 7	1,9	8,7	6,8	92	92	1	0,7	49
Infected 8	2,2	6,8	4,6	70	70	1,5	0,5	35
Infected 9	1	8,4	7,4	25	135	1,9	1,5	87
Infected 10	1,2	8,8	7,6	30	42	1,4	1,5	120
Control 1	3,3	7	3,7	80	74	2,6	0,9	25
Control 2	2,9	6,7	3,8	105	148	5,9	0,7	30
Control 3	3,4	6,9	3,5	40	36	2,9	1	27
Control 4	2,9	7	4,1	32	33	1,2	1	50
Control 5	2,7	6,6	3,9	50	85	1,9	1,1	21

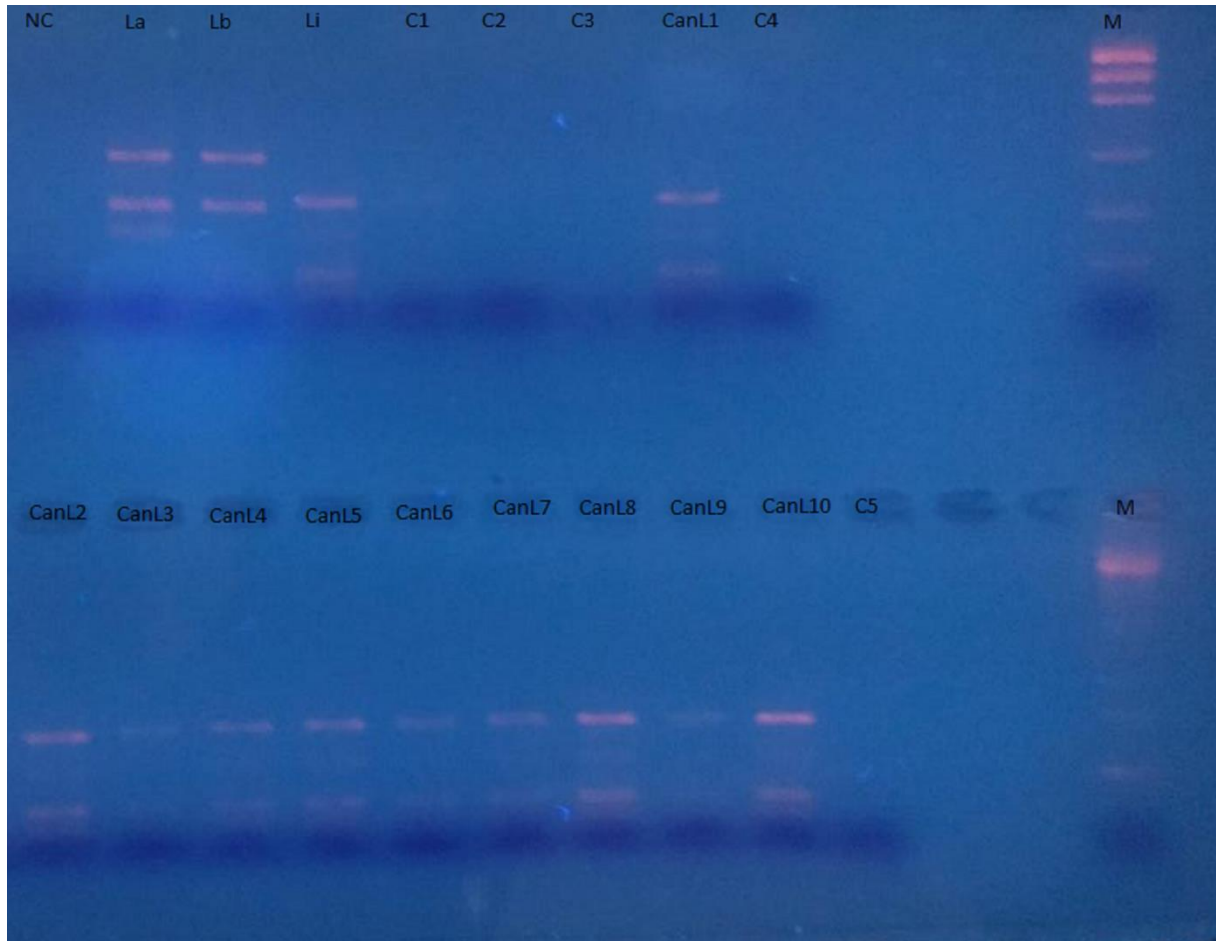
†ALT: alanine aminotransferase; GGT: gamma glutamyl transferase

S3 Table. Complete blood counts of CanL and control groups.

Animal	Red blood cells (x10 ¹² /L)	Hemoglobin (g/dL)	GV (%)	MCV (fL)	MCHC (%)	Leukocytes (x10 ⁹ /L)	Neutrophils (x10 ⁶ /L)	Lymphocytes (x10 ⁶ /L)	Monocytes (x10 ⁶ /L)	Eosinophils (x10 ⁶ /L)	Basophils (x10 ⁶ /L)	Platelets (x10 ⁹ /L)	PP (g/dL)
Reference	5,5-8,5	12,0-18,0	37-55	60-77	32-36	6,0-17,0	3000-	1000-4800	150-1350	150-1250	rare	160-440	6,0-

							1150 0						8, 0
Infec ted 1	4,25	10,1	29	68, 24	34,8 3	5,4	4212	594	486	108	0	220	12
Infec ted 2	3,88	8,6	26	67, 01	33,0 8	13,3	1117 2	1995	133	0	0	160	9
Infec ted 3	3,84	9,1	25	65, 1	36,4	17,9	1378 3	2506	1253	358	0	400	8, 4
Infec ted 4	5,38	11	31	57, 62	35,4 8	16,2	1117 8	3402	1296	324	0	300	7
Infec ted 5	2,95	6,5	18	61, 02	36,1 1	9,3	6417	1860	837	186	0	280	8, 2
Infec ted 6	4,3	9,5	27	62, 79	35,1 9	7,2	4320	1800	288	72	0	140	7
Infec ted 7	4,06	10	28	68, 97	35,7 1	8,5	6035	2040	425	0	0	200	10
Infec ted 8	2,1	4,1	12	57, 14	34,1 7	3	2100	780	30	90	0	220	7
Infec ted 9	2,82	6,6	20	70, 92	33	12,4	9176	2976	248	0	0	160	8, 8
Infec ted 10	3,81	8,7	25	65, 62	34,8	14,6	1095 0	3358	146	146	0	280	9
Cont rol 1	7,89	17,8	53	67, 17	33,5 8	16,2	1069 2	2754	1496	1250	0	200	8
Cont rol 2	6,78	16,9	49	72, 27	34,4 9	15,7	1004 8	2983	628	2041	0	300	7, 8
Cont rol 3	7,89	17,8	52	65, 91	34,2 3	12,2	6588	4800	610	122	0	320	7, 8
Cont rol 4	6,78	17,3	50	73, 75	34,6	16,2	1085 4	3726	324	1296	0	220	8
Cont rol 5	7,44	17,1	51	68, 55	33,5 3	10,3	6077	3605	515	103	0	220	6, 6

¶GV: globular volume; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; PP: plasma protein



S1 Fig. PCR-RFLP. Restriction fragment length polymorphism analysis of ITS1-PCR fragments amplified from DNA samples using Hae III enzyme. NC: Negative control (water); M: molecular marker (123 bp); La: *Leishmania amazonensis* (IOC / L0575-MHOM / BR / 1967 / PH8); Lb: *Leishmania braziliensis* (IOC / L0566-MHOM / BR / 1975 / M2903); Li: *Leishmania infantum* (IOC / L0575-MHOM / BR / 2002 / LPC-RPV); C1 to C5: control group; CanL 1 to CanL10: CanL group. CanL sample profiles were identical to *L. infantum*.

S4 Table. CD69 expression in lymphocytes. Mean $\pm$ SD of CD69 in CD4+, CD8+ and CD21+ cells measured by flow cytometry in splenic leukocytes of CanL group after transfection with miR-21 mimics and inhibitors for 48h at 37°C and 5% CO₂.

Lymphocytes	Mimic (mean $\pm$ SD)	Inhibitor (mean $\pm$ SD)	Scrambled (mean $\pm$ SD)	P value*
CD69+CD4+	22955 $\pm$ 8768	19051 $\pm$ 9307	23076 $\pm$ 8611	0.5216
CD69 +CD8+	36462 $\pm$ 26928	21607 $\pm$ 8231	31327 $\pm$ 12309	0.0934
CD69+CD21+	41801 $\pm$ 26658	52115 $\pm$ 35065	69723 $\pm$ 37559	0.0394

*p value considering Friedman test

APÊNDICE A- REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

52. Faria MS, Reis FCG, Lima APCA. Toll-Like Receptors in Leishmania Infections: Guardians or Promoters? J Parasitol Res. 2012; 1–12. doi:10.1155/2012/930257
53. Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. Annu Rev Immunol. 2003; 21: 713-58. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.140942
54. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. PLoS Pathog. 2012;8. doi:10.1371/journal.ppat.1002536
55. Thalhofer CJ, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan leishmania infantum chagasi. Infect Immun. 2011;79: 108–117. doi:10.1128/IAI.00338-10
56. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. kinetics of DC activation. 2000;1: 311–316.
57. Pinelli E, Rutten VPMG, Bruysters M, Moore PF, Joost Ruitenber E. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-Cell proliferation and gamma interferon production. Infect Immun. 1999;67: 237–243.
58. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunol Rev. 2004;201: 239–253. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x
59. Murray HW, Cartelli DM. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. J Clin Invest. 1983;72: 32–44. doi:10.1172/JCI110972
60. Panaro MA, Fasanella A, Lisi S, Mitolo V, Andriola A, Brandonisio O. Evaluation of Nitric Oxide production by *Leishmania Infantum*-infected dog macrophages. Immunopharmacol Immunotoxicol. 1998;20: 147–158. doi:10.3109/08923979809034814
61. Belosevic M, Nacy CA. Interleukin-2, anti-interleukin-2 receptor antibody, and activation of macrophages. Cell Immunol. 1990;128: 635–640. doi:10.1016/0008-8749(90)90055-V
62. Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. J Cell Sci. 1999;112 Pt 18: 2993–3002.

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

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

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

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

ANEXO A – NORMAS DA REVISTA PLOS ONE

Manuscript Organization

Manuscripts should be organized as follows.

Beginning section	<i>The following elements are required, in order:</i> • Title page: List title, authors, and affiliations as first page of the manuscript • Abstract • Introduction
Middle section	<i>The following elements can be renamed as needed and presented in any order:</i> • Materials and Methods • Results • Discussion • Conclusions (optional)
Ending section	<i>The following elements are required, in order:</i> • Acknowledgments • References • Supporting information captions (if applicable)
Other elements	• Figure captions are inserted immediately after the first paragraph in which the figure is cited. Figure files are uploaded separately. • Tables are inserted immediately after the first paragraph in which they are cited. • Supporting information files are uploaded separately.

Style and Format

File format	Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, or RTF. Microsoft Word documents should not be locked or protected. LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. <u>Read the LaTeX guidelines.</u>
Length	Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.

	We encourage you to present and discuss your findings concisely.
Font	Use a standard font size and any standard font, except for the font named “Symbol”. To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.
Headings	Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.
Layout and spacing	Manuscript text should be double-spaced. Do not format text in multiple columns.
Page and line numbers	Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).
Footnotes	Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.
Language	Manuscripts must be submitted in English. You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.
Abbreviations	Define abbreviations upon first appearance in the text. Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text. Keep abbreviations to a minimum.
Reference style	PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the ICMJE sample references .

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model

		Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	100 characters	State the topic of the study Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)
- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled “current address.” At a minimum, the address must include the author’s current institution, city, and country.

ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

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

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Novembro de 2021.

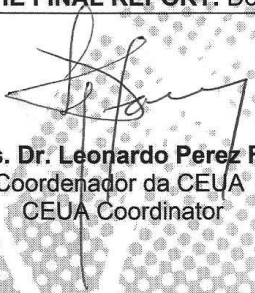
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 Dezembro de 2021.

CERTIFICATE

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

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 01, 2021.

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


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

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