

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta dissertação será
disponibilizado somente a partir
de 14/06/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus Araçatuba

GIULIA GONÇALVES JUSSIANI

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

Araçatuba

2024

GIULIA GONÇALVES JUSSIANI

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

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

Orientadora: Prof. Dra. Gisele Fabrino Machado

Araçatuba

2024

J96e

Jussiani, Giulia Gonçalves

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

74 f. : il., tabs.

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

Orientadora: Gisele Fabrino Machado

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

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

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

Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO

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

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos,

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos da Leishmaniose

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

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

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

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

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

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

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

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

1.2 Resposta Imune na LVC

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

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

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

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

1.3 Leishmaniose e o Sistema Nervoso Central

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

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

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

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

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

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

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

1.4 MicroRNAs

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 MicroRNAs na Leishmaniose Canina

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

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

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

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

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

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

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

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

1.6 MicroRNAs na Neuroinflamação

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.7 Justificativa

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

1.8 Objetivos

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

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

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

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008. DOI: 10.1016/j.pt.2008.04.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18514028/>. Acesso em: 2 fev. 2023.

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

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

BRAGATO, J. P.; MELO, L. M.; VENTURIN, G. L.; REBECH, G. T.; GARCIA, L. E.; LOPES, F. L.; LIMA, V. M. F. Relationship of peripheral blood mononuclear cells miRNA expression and parasitic load in canine visceral leishmaniasis. **PloS One**, San Francisco, v. 13, n. 12, article e0206876, p. 1-16, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0206876. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6281177>. Acesso em: 2 jun. 2024.

BRAGATO, J. P.; REBECH, G. T.; FREITAS, J. H.; SANTOS, M. O.; COSTA, S. F.; EUGÊNIO, F. R.; SANTOS, P. S. P.; LIMA, V. M. F. miRNA-21 regulates CD69 and IL-10 expression in canine leishmaniasis. **PloS One**, San Francisco, v. 17 n. 3, article e0265192, p. 1-15, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0265192. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35324917/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10.1016/j.it.2020.07.007. Disponível em:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 51, n. 2, p. 527-538, 2014. DOI: 10.1177/0300985814521248. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24510947/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

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

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

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

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

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

MELO, G. D.; GOYARD, S.; FIETTE, L.; BOISSONNAS, A.; COMBADIÈRE, C.; MACHADO, G. F.; MINOPRIO, P.; LANG, T. Unveiling Cerebral Leishmaniasis: parasites and brain inflammation in *Leishmania donovani* infected mice. **Scientific Reports**, London, v. 7, article 8454, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09085-5>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5559479/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MELO, G. D.; GRANO, F. G.; SILVA, J. E. S.; KREMER, B. E.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F. Blood-brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 37, n. 12, p. 635-645, 2015. DOI: 10.1111/pim.12285. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26434684/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MELO, G. D.; MACHADO, G. F. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 346, n. 3, p. 293-304, 2011. DOI: 10.1007/s00441-011-1290-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22160561/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MELO, G. D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R. O.; MACHADO, G. F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, n. 3-4, p. 248-256, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19362424/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

MORALES, S.; MONZO, M.; NAVARRO, A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. **Biomolecular Concepts**, Berlin, v. 8, n. 5-6, p. 203–212, 2017. DOI: 10.1515/bmc-2017-0024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29161231/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

NEGI, N.; DAS, B. K. CNS: not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. **International Reviews of Immunology**, London, v. 37, n. 1, p. 57-68, 2018. DOI: 10.1080/08830185.2017.1357719. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28961037/>. Acesso em: 9 jan. 2024.

NEJAD, C.; STUNDEN, H. J.; GANTIER, M. P. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 285, n. 20, p. 3695-3716, 2018. DOI: 10.1111/febs.14482. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29688631/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Frontiers in Endocrinology**, Lausanne, v. 9, article 402, p. 1-12, 2018. DOI: 10.3389/fendo.2018.00402. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30123182/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19559536/>. Acesso em: 1 jun. 2024.

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