

RESSALVA

Atendendo
solicitação da autora, o
texto completo desta
TESE será
disponibilizado
somente a partir
de **09/10/2023.**

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

GABRIELA TORRES REBECH

microRNA-148a REGULA CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E
ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE CANINA

ARAÇATUBA
2022

GABRIELA TORRES REBECH

**microRNA-148a REGULA CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E
ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE 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
2022

R289m Rebech, Gabriela Torres
microRNA-148a regula citocinas inflamatórias e atividade
microbicida na leishmaniose canina / Gabriela Torres Rebech.
– Araçatuba, 2022
66 p. : tabs., fotos

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

1. Leishmaniose canina. 2. microRNA-148a. 3. Resposta
imune. 4. Fator de transcrição. 5. Citocina. 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: microRNA-148a REGULA CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE CANINA

AUTORA: GABRIELA TORRES REBECH

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

Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)

Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária 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

Prof. Dr. ALEXANDRE BARBOSA REIS (Participação Virtual)

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

Dra. SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)

Especialista de Laboratório e Pesquisadora no Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo

Araçatuba, 08 de abril de 2022.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: microRNA-148a REGULA CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE CANINA

AUTORA: GABRIELA TORRES REBECH

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


Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária 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

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

Dra. SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)
Especialista de Laboratório e Pesquisadora no Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo

Araçatuba, 08 de abril de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: **microRNA-148a REGULA CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE CANINA**

AUTORA: GABRIELA TORRES REBECH

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

Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba/UNESP

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

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

Dra. SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)
Especialista de Laboratório e Pesquisadora no Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo

Araçatuba, 08 de abril de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: **microRNA-148a REGULA CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE CANINA**

AUTORA: GABRIELA TORRES REBECH

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

Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária 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

Alexandre Reis

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

Dra. SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)
Especialista de Laboratório e Pesquisadora no Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo

Araçatuba, 08 de abril de 2022.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: microRNA-148a REGULA CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ATIVIDADE MICROBICIDA NA LEISHMANIOSE CANINA

AUTORA: GABRIELA TORRES REBECH

ORIENTADORA: VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

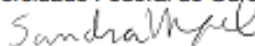
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

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

Profa. Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária 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

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


Dra. SANDRA MARCIA MUXEL (Participação Virtual)
Especialista de Laboratório e Pesquisadora no Laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo

Araçatuba, 08 de abril de 2022.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter proporcionado saúde a mim e a minha família durante toda minha caminhada e principalmente durante a pandemia. Por ter nos abençoado e me permitir chegar até aqui!

Aos meus pais por estarem ao meu lado oferecendo suporte e todo apoio necessário para que eu pudesse realizar este sonho.

À minha orientadora Profa. Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima, por me aceitar como orientada e me proporcionar a oportunidade de vivenciar inúmeras emoções e experiências as quais possibilitaram grande crescimento profissional e pessoal.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo: 2019/04240-2 pela concessão da bolsa de mestrado no início do curso.

Aos colaboradores e amigos do laboratório de Imunologia Jaqueline Bragato, Flavia Yamamoto, Jéssica Freitas, Sidnei Costa, Marilene Oliveira, Matheus Soares e Gabriela Venturin que ajudaram na execução dos experimentos com conselhos e opiniões, coletas e processamento das amostras, com palavras de apoio e carinho, pois, de diversas formas vocês estiveram presentes em meus dias, tornando-os especiais e motivadores

A todos os cães envolvidos no experimento, pois estes contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa e avanço da ciência.

Aos componentes de minha banca de qualificação e defesa Prof^a Dr^a Flavia Lopes, Prof^a Dr^a Gisele Machado, Prof Dr Alexandre Reis e Prof^a Dr^a Sandra Muxel pelas dicas e correções as quais foram de grande importância para o aperfeiçoamento do trabalho e desenvoltura profissional.

Por fim, sinto-me grata, pois cada um desempenhou papel especial em meus dias. Não tenho como retribuí-los, mas muito obrigada a todos por tudo.

“Aparta-te do mal, e pratica o que é bom; procura a paz, e empenha-te por alcançá-la”

Bíblia Sagrada: Salmos, 34:14.

“A gente Brilha. Forte ou fraco, mas brilha!

Um dia é sol e no outro é lua.

Brilho que ilumina a rua.

A casa, o beco ou a avenida.

Brilho de vela, de estrela e de lanterna.

Intensidade? Não importa!

Só não deixe de brilhar. ”

Gabriela T. Rebech

Rebech, GT. **microRNA-148a regula citocinas inflamatórias e atividade microbicida na leishmaniose canina**. 2022. 66 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

A leishmaniose canina (LCan) é um grave problema de saúde pública, pois animais infectados facilitam a transmissão do protozoário *Leishmania* para humanos pela picada do vetor flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. A progressão da LCan está relacionada à supressão efetiva da resposta imune, possivelmente associada a pequenos RNAs chamados microRNAs (miR), que podem afetar a tradução do mRNA em proteínas e, conseqüentemente, regular o funcionamento das células. O aumento de miR-148a em leucócitos esplênicos (LS) de cães com LCan foi observado em estudos anteriores e análises *in silico* identificaram possíveis vias envolvidas na regulação da resposta imune que são afetadas por este miR. Portanto, através do uso de cultura celular e transfecção, *in vitro*, avaliamos o envolvimento de miR-148a, na regulação de citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β , iNOS, expressão de MHCII, CD80, CD3, dos fatores de transcrição T-bet (Th1) e GATA-3 (Th2) e sua relação com a carga parasitária em LS de cães com LCan. Primeiramente, LS coletados de cães saudáveis e doentes (LCan), foram transfectados com oligonucleotídeos inventariados de inibidor e mimetizador de miR-148a. Após 48 horas, a expressão das proteínas MHCII, CD80, iNOS, CD3, Tbet, GATA-3 foi avaliada por citometria de fluxo e a concentração de TNF- α , IL-12, IL-6 e IL-1 β foi medida no sobrenadante de cultura por ELISA de captura. A transfecção de LS com mimetizador de miR-148a diminuiu a concentração de iNOS nas células e de TNF- α , IL-6 e IL-12 no sobrenadante do LS cultivado de cães LCan. Curiosamente, a transfecção com inibidor de miR-148a diminuiu a carga parasitária nas células. Esses resultados sugerem um papel regulador negativo deste miR na resposta imune à infecção por *L. infantum*. Concluímos que miR-148a pode afetar a resposta imune regulando citocinas inflamatórias durante LCan. Nossos resultados contribuem para o entendimento da complexa interação hospedeiro/parasito na leishmaniose canina e podem auxiliar no desenvolvimento de possíveis tratamentos.

Palavras-chave: LCan. microRNA-148a. Resposta imune. Fator de transcrição. Citocina.

Rebech, GT. **microRNA-148a regulates inflammatory cytokines and microbicidal activity in canine leishmaniasis**. 2022. 66 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Canine leishmaniasis (CanL) is a serious public health concern, because infected animals facilitate transmission of the *Leishmania* protozoan to humans by the bite of sandfly vector during the blood meal. Progression of CanL is related to effective suppression of immune response, possibly associated with small RNAs called microRNAs (miR), which can affect mRNA translation into proteins and, consequently, regulate cells function. The increase of miR-148a in splenic leukocytes (SL) of dogs with CanL was observed in previous studies and *in silico* analysis identified possible pathways involved in immune response regulation that are affected by this miR. Therefore, through the use of, *in vitro*, cell culturing and transfection, we evaluated the involvement of miR-148a, in regulation of inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β , iNOS, MHCII expression, CD80, CD3, of the T-bet (Th1) and GATA-3 (Th2) transcription factors and their relationship with parasite load in SL of dogs with CanL. Primary, SL obtained from healthy and diseased dogs (CanL), were transfected with miR-148a mimic and inhibitor inventoried oligonucleotides. After 48 hours, expression of MHCII, CD80, iNOS, CD3, Tbet, GATA-3 proteins was evaluated by flow cytometry and concentration of TNF- α , IL-12, IL-6 and IL-1 β was measured in culture supernatant by capture ELISA. Transfection of SL with miR-148a mimic decreased iNOS concentration in the cells and TNF- α , IL-6 and IL-12 in the supernatant of the cultured SL from CanL dogs. Interestingly, transfection with miR-148a inhibitor decreased parasite load in cells. These results suggest a negative regulatory role of this miR in immune response to *L. infantum* infection. We conclude that miR-148a can affect immune response by regulating inflammatory cytokines during CanL. Our results contribute to the understanding of the complex host/parasite interaction in canine leishmaniasis and could assist the development of possible treatments.

Keywords: CanL, microRNA-148a. Immune response. Transcription factor. Cytokine.

APÊNDICE A- REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

1. Pan American Health (PAHO). Leishmaniasis. Jan 2022. Available from: <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>
2. World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Oct 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
3. Rangel EF, Vilela ML. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Cad Saúde Pública. 2008;24: 2948–2952.
4. World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean (WHO EMRO). Report on the intercountry meeting on leishmaniasis control strategies in the Eastern Mediterranean Region. 2008; Aleppo, Syrian Arab Republic.
5. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 2014;6: 147–154. doi:10.2147/CLEP.S44267
6. Pace D. Leishmaniasis. J Infect. 2014;69: S10–S18. doi:10.1016/j.jinf.2014.07.016
7. Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde : volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2019. 740 p.
8. Secretaria da Saúde (BR). Governo do Estado de São Paulo. Situação Atual. 2020. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/situacao-atual>
9. Secretaria da Saúde (BR). Governo do Estado de São Paulo. Dados Estatísticos. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, Estado de São Paulo. 2022. Disponível em: <http://saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/oldzoonoses/leishmaniose-visceral/dados-estatisticos>
10. Sapateiro MF. Vinte anos de leishmaniose visceral na região de araçatuba: histórico e desafios atuais para o controle da doença [Trabalho de Conclusão de Curso]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2020.

11. Nogueira, A. Araçatuba registra cinco casos de leishmaniose em humanos em 2021. RP 10. Disponível em: <https://www.rp10.com.br/2021/07/aracatuba-registra-cinco-casos-de-leishmaniose-em-humanos-em-2021/> |
12. De Ruiter CM, Van Der Veer C, Leeflang MMG, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER. Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. J Clin Microbiol. 2014;52: 3147–3155. doi:10.1128/JCM.00372-14
13. 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
14. Solano-gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, 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
15. Alexander J, Satoskar AR, Russel DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. J Cell Sci . 1999;112: 2993–3002. Available: <http://jcs.biologists.org/content/joces/112/18/2993.full.pdf>
16. Hosein S, Blake DP, Solano-Gallego L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. Parasitology. 2017;144: 95–115. doi:10.1017/S003118201600055X
17. Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, Romão P, Silveira H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. Vet Immunol Immunopathol. 2002;88: 21–30. doi:10.1016/S0165-2427(02)00134-4
18. Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Carneiro CM, Mayrink W, et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 2009;128: 87–95. doi:10.1016/j.vetimm.2008.10.307
19. Verçosa BLA, Melo MN, Puerto HLP, Mendonça LI, Vasconcelos AC. Apoptosis, inflammatory response and parasite load in skin of *Leishmania (Leishmania) chagasi* naturally infected dogs: a histomorphometric analysis. Vet Parasitol. 2012;189: 162–170. doi:10.1016/J.VETPAR.2012.04.035
20. Lima VMF, 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

21. Maia C, Campino L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the dog. J Trop Med. 2012;2012: 1-7. doi:10.1155/2012/541571
22. Pentcheva-Hoang T, Chen L, Pardoll DM, Allison JP. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104: 17765. doi:10.1073/PNAS.0708767104
23. Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: A metabolic perspective. Cell Microbiol. 2008;10: 301–308. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x
24. Dusse LMS, Vieira LM, Carvalho M das G. Revisão sobre óxido nítrico - Nitric oxide revision. J Bras Patol e Med Lab. 2003;39: 343–350.
25. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2: 1–8. doi:10.3389/fcimb.2012.00083
26. Panaro MA, Brandonisio O, Caprariis D De, Cavallo P, Cianciulli A, Mitolo V, et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy : a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection. Parasites & Vectors 2008;7: 1–7. doi:10.1186/1756-3305-1-10
27. Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Mitolo V, Sisto M, et al. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2001;24: 187–195. doi:10.1016/S0147-9571(00)00026-6
28. Cavalcanti AS, Ribeiro-Alves M, De O. R. Pereira L, Mestre GL, Ferreira ABR, Morgado FN, et al. Parasite load induces progressive spleen architecture breakage and impairs cytokine mRNA expression in *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. PLoS One. 2015;10. doi:10.1371/journal.pone.0123009
29. Abranches P, Santos-Comes G, Rachamim+ N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL, et al. An Experimental Model for Canine Visceral Leishmaniasis. Parasite Immunology. 1991; 1–30.
30. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, et al. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. Int J Parasitol. 2007;37: 683–693. doi:10.1016/J.IJPARA.2006.11.007

31. Tripathi P, Singh V, Naik S. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;51: 229–242. doi:10.1111/J.1574-695X.2007.00311.X
32. Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007;28: 378–384. doi:10.1016/J.IT.2007.07.004
33. Alexandre-Pires G, de Brito MTV, Algueró C, Martins C, Rodrigues OR, da Fonseca IP, et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;137: 275–283. doi:10.1016/J.VETIMM.2010.06.007
34. Wang S, Chen L. Co-signaling molecules of the B7-CD28 family in positive and negative regulation of T lymphocyte responses. *Microbes Infect.* 2004;6: 759–766. doi:10.1016/j.micinf.2004.03.007
35. 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
36. Diaz S, da Fonseca IP, Rodrigues A, Martins C, Cartaxeiro C, Silva MJ, et al. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. *Vet Parasitol.* 2012;189: 137–144. doi:10.1016/J.VETPAR.2012.05.004
37. Balkhi MY, Ma Q, Ahmad S, Junghans RP. T cell exhaustion and Interleukin 2 downregulation. *Cytokine.* 2015;71: 339–347. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.024
38. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology.* 2006;28: 329–337. doi:10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x
39. Joosten LAB, Netea MG, Dinarello CA. Interleukin-1 β in innate inflammation, autophagy and immunity. *Semin Immunol.* 2013;25: 416–424. doi:10.1016/J.SMIM.2013.10.018
40. Grano FG, José JE, Melo GD, de Souza MS, Lima VMF, Machado GF. Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2018;253: 30–38. doi:10.1016/j.vetpar.2018.02.030
41. Rodríguez-Cortés A, Carrillo E, Martorell S, Todolí F, Ojeda A, Martínez-Flórez A, et al. Compartmentalized Immune Response in Leishmaniasis: Changing Patterns throughout the Disease. *PLoS One.* 2016;11: e0155224.

- doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0155224
42. 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
 43. Wu T, Chen G. MiRNAs Participate in MS Pathological Processes and Its Therapeutic Response. *Mediators Inflamm.* 2016;2016. doi:10.1155/2016/4578230
 44. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2010;1803: 1231–1243. doi:10.1016/J.BBAMCR.2010.06.013
 45. A M, D B. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat Rev Immunol.* 2016;16: 279–294. doi:10.1038/NRI.2016.40
 46. Chu C-Y, Rana TM. Small RNAs: Regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol.* 2007;213: 412–419. doi:10.1002/JCP.21230
 47. 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: 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0206876
 48. 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
 49. Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, Watowich SS. STAT3 signaling in immunity Introduction: STAT3 discovery, structure and transcriptional function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;31: 1–15. doi:10.1016/j.cytogfr.2016.05.001
 50. Kuroda S, Nishio M, Sasaki T, Horie Y, Kawahara K, Sasaki M, et al. Effective clearance of intracellular *Leishmania major* in vivo requires Pten in macrophages. *Eur J Immunol.* 2008;38: 1331–1340. doi:10.1002/EJI.200737302
 51. Mishra R, Banerjee AC. SARS-CoV-2 Spike Targets USP33-IRF9 Axis via Exosomal miR-148a to Activate Human Microglia. *Front Immunol.* 2021;12. doi:10.3389/FIMMU.2021.656700
 52. Friedrich M, Pracht K, Mashreghi MF, Jäck HM, Radbruch A, Seliger B. The role of the miR-148/-152 family in physiology and disease. *Eur J Immunol.* 2017;47:

- 2026–2038. doi:10.1002/EJI.201747132
53. Jiang K, Yang J, Yang C, Zhang T, Shaukat A, Yang X, et al. miR-148a suppresses inflammation in lipopolysaccharide-induced endometritis. *J Cell Mol Med*. 2020;24: 405–417. doi:10.1111/JCMM.14744
 54. Liu X, Zhan Z, Xu L, Ma F, Li D, Guo Z, et al. microRNA-148/152 Impair Innate Response and Antigen Presentation of TLR-Triggered Dendritic Cells by Targeting CaMKII α . *J Immunol*. 2010;185: 7244–7251. doi:10.4049/jimmunol.1001573
 55. Wu H, Bao Y, Wang L, Li X, Sun J. *Mycobacterium marinum* down-regulates miR-148a in macrophages in an EsxA-dependent manner. *Int Immunopharmacol*. 2019;73: 41. doi:10.1016/J.INTIMP.2019.04.056
 56. Porstner M, Winkelmann R, Daum P, Schmid J, Pracht K, Côte-Real J, et al. miR-148a promotes plasma cell differentiation and targets the germinal center transcription factors Mitf and Bach2. *Eur J Immunol*. 2015;45: 1206–1215. doi:10.1002/EJI.201444637

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.

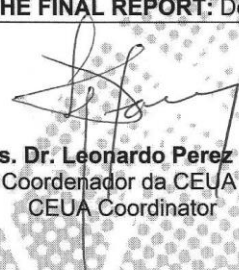
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 Dezembro de 2021.

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