



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA  
REVELA POTENCIAIS BIOMARCADORES E VIAS NA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Por

HELENA MARIANA PITANGUEIRA TEIXEIRA

**Trabalho de Conclusão do Curso**  
apresentado ao Instituto de Biologia  
da Universidade Federal Bahia como  
exigência para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas

Salvador, BA

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA  
REVELA POTENCIAIS BIOMARCADORES E VIAS NA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Por

HELENA MARIANA PITANGUEIRA TEIXEIRA

**Trabalho de Conclusão do Curso**  
apresentado ao Instituto de Biologia  
da Universidade Federal Bahia como  
exigência para obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientadora: Patricia Sampaio Tavares  
Veras

Salvador, BA

2023

Data da Defesa: 30/06/2023

**Banca examinadora**

---

**Orientador Prof.<sup>a</sup> Dr. Patrícia Sampaio Tavares Veras  
(LAIPHE – IGM - FIOCRUZ - BA)**

---

**Membro I - Prof.<sup>a</sup> Dr. Emílio Lanna  
(Departamento de Ciências Biológicas - UFBA)**

---

**Membro II - Prof.<sup>a</sup> Dr. Pablo Oliveira  
(Departamento de Ciências Biológicas - UFBA)**

## RESUMO

**Introdução:** Os cães são os principais reservatórios urbanos de *Leishmania infantum*, o agente causador da leishmaniose visceral (LV). Quando infectados, os cães podem apresentar uma ampla gama de sinais clínicos, alguns dos quais se assemelham aos observados em humanos, tornando-os um modelo valioso para estudar a progressão da LV. O curso da doença é influenciado por vários fatores, incluindo a resposta imune montada após a infecção. A medula óssea (MO) é um dos tecidos preferidos para a infecção por *L. infantum*, e as células mieloides estão entre os principais hospedeiros do parasito. **Objetivo:** Caracterizar o transcriptoma da resposta celular de cães naturalmente infectados com diferentes quadros clínicos e realizar validação de genes diferencialmente expressos (DEGs) avaliados por *Machine Learning* e correlacionar as vias metabólicas e de sinalização nas quais esses genes estão envolvidos. **Métodos:** A análise de RNASeq foi realizada em células de MO de cães infectados por *L. infantum*, bem como de animais controle de uma área não endêmica, por aprendizado de máquina. **Resultados:** Na análise dos dados gerados, um conjunto de quatro DEGs (EGR2, FOS, ADCY9 e TINAGL1) mostrou potencial para diferenciar cães suscetíveis de resistentes e saudáveis. **Conclusão:** Foi possível validar o ADCY9 com o RT-qPCR, apresentando esse gene como um importante biomarcador envolvido na resistência da doença. No entanto, os genes EGR2, FOS e TINAGL1 apesar de não terem sido validados estão inseridos em vias importantes da regulação imune do hospedeiro. Este estudo fornece uma melhor compreensão da patogênese da leishmaniose visceral e oferece informações relevantes para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas e prognósticas mais eficazes.

## ABSTRACT

**Introduction:** Dogs are the main urban reservoirs of *Leishmania infantum*, the causative agent of visceral leishmaniasis (VL). When infected, dogs can show a wide range of clinical signs, some of which resemble those seen in humans, making them a valuable model to study the progression of VL. The course of the disease is influenced by several factors, including the immune response mounted after infection. Bone marrow (BM) is one of the preferred tissues for *L. infantum* infection, and myeloid cells are among the main hosts of the parasite. **Objective:** To characterize the cellular response transcriptome of naturally infected dogs with different clinical conditions and perform validation of differentially expressed genes (DEGs) evaluated by Machine Learning and correlate the metabolic and signaling pathways in which these genes are involved. **Methods:** RNASeq analysis was performed on BM cells from dogs infected with *L. infantum*, as well as control animals from a non-endemic area, by machine learning. **Results:** In the analysis of the generated data, a set of four DEGs (EGR2, FOS, ADCY9 and TINAGL1) showed potential to differentiate susceptible dogs from resistant and healthy ones. **Conclusion:** It was possible to validate ADCY9 with RT-qPCR, presenting this gene as an important biomarker involved in disease resistance. However, the EGR2, FOS and TINAGL1 genes, despite not having been validated, are inserted in important host immune regulation pathways. This study provides a better understanding of the pathogenesis of visceral leishmaniasis and offers relevant information for the development of more effective therapeutic and prognostic approaches.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal da Bahia pela oportunidade de crescimento acadêmico;

Agradeço à todos os colegas do LAIPHE que de alguma forma contribuíram para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal;

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Patricia Veras, por quem tenho enorme admiração, agradeço por toda confiança deposita em mim; pela dedicação com a pesquisa, pelo comprometimento;

Agradeço a Deus e Santa Rita por me dar força e saúde para superar os desafios; por me guiar nas escolhas da vida e sempre me proteger; por me fazer persistir na busca dos meus objetivos;

Aos meus pais Aidil e David, meu noivo Maurício, irmãos David e Renato, afilhada Luísa e a toda minha família, que com muito carinho e motivação, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

À minhas queridas amigas, Talita, Ana Paula, Maria, Hátilla, e Raísa com quem eu pude dividir a bancada e os momentos da vida; obrigada pelo apoio e ajuda momentos difíceis, inúmeros momentos de alegria e pela contribuição neste trabalho.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIÇÕES

|             |  |
|-------------|--|
| ADCY9       | Adenilato ciclase tipo 9 ( <i>Adenylate Cyclase 9</i> )  |
| DEGs        | Genes diferencialmente expressos   |
| EGR2        | Resposta de crescimento precoce 2 ( <i>Early Growth Response 2</i> )   |
| ELISA       | Ensaio imunoenzimático   |
| FOS         | Fos Proto-Oncogene, Subunidade do Fator de Transcrição AP-1<br>( <i>Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i> )  |
| FoxO        | <i>Forkhead Box O1</i>   |
| IFI         | Imunofluorescência indireta  |
| IRE1        | Enzima que requer Inositol 1 ( <i>Inositol-Requiring Enzyme 1</i> )  |
| LINC        | RNA longo intergênico não codificador de proteínas ( <i>Long intergenic non-protein coding RNA</i> )                             |
| LncRNAs     | RNA longo não-codificante ( <i>Long non-coding RNAs</i> )  |
| LV          | Leishmaniose visceral  |
| LVC         | Leishmaniose visceral canina   |
| MALAT1      | Transcrição do Adenocarcinoma Pulmonar Associado à Metástase 1 ( <i>Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1</i> ) |
| MAPK        | Proteína Quinase Ativada por Mitógeno ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )  |
| MAPKAPK5-AS | Proteína Quinase 5 Ativada por MAPK ( <i>MAPK Activated Protein Kinase 5</i> )   |
| mTOR        | Alvo Mecanístico da Rapamicina Quinase ( <i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i> )   |
| NF-κB       | Fator nuclear-B  |
| NK          | <i>Natural killer</i>  |
| NOD-like    | Domínio de Oligomerização Contendo Ligação de Nucleotídeos ( <i>Nucleotide Binding Oligomerization Domain Containing</i> )       |
| NUTM2A-AS1  | NUTM2A Antisense RNA 1   |
| OMS         | Organização Mundial da Saúde   |
| PCR         | Reação em cadeia da polimerase   |
| PI3K-AKT    | Fosfoinositídeo-3-quinase-AKT  |

|         |   |
|---------|---|
| RNAseq  | Sequenciamento de RNA   |
| RT-qPCR | Reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa   |
| SNHG5   | Gene 5 do hospedeiro de RNA nucleolar pequeno ( <i>Small Nucleolar RNA Host Gene 5</i> )  |
| Th      | Células T <i>helper</i>   |
| TINAGL1 | Antígeno de Nefrite Tubulointersticial tipo 1 ( <i>Tubulointerstitial Nephritis Antigen Like 1</i> )  |
| TNF     | Fator de necrose tumoral  |
| XPC-AS1 | Subunidade Complexa XPC, Reconhecimento de Danos no DNA e Fator de Reparação RNA Antisense 1 ( <i>XPC Complex Subunit, DNA Damage Recognition And Repair Factor Antisense RNA 1</i> ) |
| ZFAS1   | Dedo de zinco tipo NFX1 contendo RNA antisense 1 ( <i>Zinc Finger NFX1-Type Containing Antisense RNA 1</i> )  |

## SUMÁRIO

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....                                 | 10                                   |
| 1.1 Epidemiologia .....                                  | 10                                   |
| 1.2 Leishmaniose visceral canina .....                   | 11                                   |
| 1.2.1 Agente etiológico e ciclo de vida .....            | 12                                   |
| 1.2.2 Aspectos clínicos .....                            | 13                                   |
| 1.2.3 Diagnóstico.....                                   | 14                                   |
| 1.3 Perfil Transcricional em Leishmaniose Visceral ..... | 14                                   |
| 2. JUSTIFICATIVA.....                                    | 16                                   |
| 3. OBJETIVOS.....  | 17                                   |
| 3.1. Objetivo Geral .....                                | 17                                   |
| 3.2. Objetivos Específicos .....                         | 17                                   |
| 4. CAPÍTULO ÚNICO .....                                  | 18                                   |
| 5. CONCLUSÃO GERAL .....                                 | 39                                   |
| REFERÊNCIA.....  | 40                                   |
| APÊNDICE .....   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |

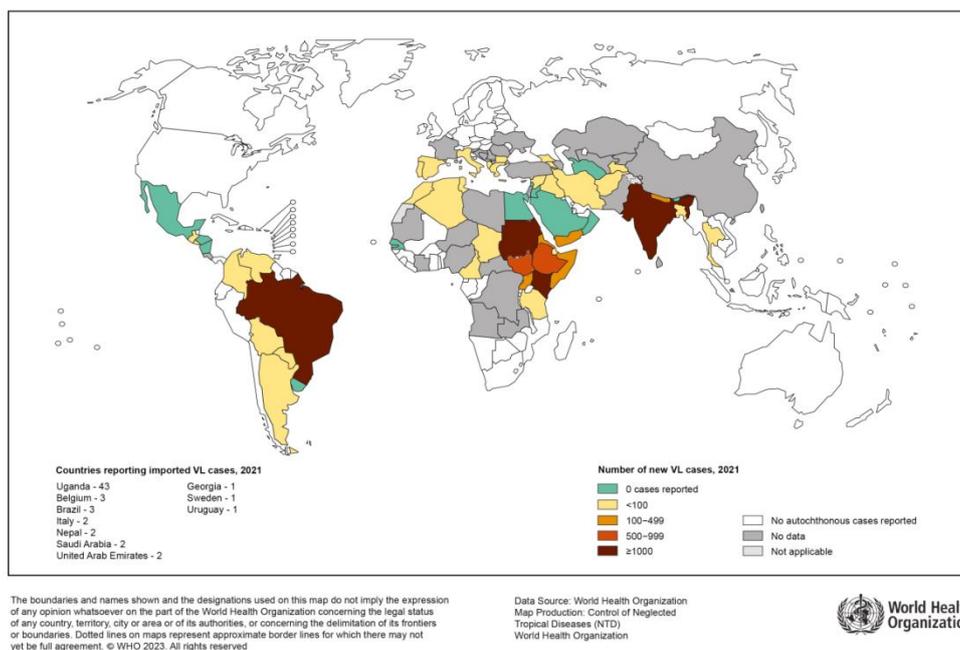
# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Epidemiologia

A leishmaniose é uma das seis principais doenças tropicais negligenciadas em todo o mundo, afetando mais de 12 milhões de pessoas, com um total de 30 mil óbitos. Países como Índia, Sudão, Brasil, Etiópia e Somália estão entre os mais afetados por essa doença (WHO, 2023). A infecção por diferentes espécies do gênero *Leishmania* pode resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam da forma mais comum, a cutânea, até as infecções mucocutâneas desfigurantes e a doença visceral, que é a forma mais grave e fatal em 95% dos casos não tratados (WHO, 2019).

Estima-se que ocorram anualmente de 50.000 a 90.000 novos casos de LV em todo o mundo, porém apenas 25% a 45% são relatados à Organização Mundial da Saúde (OMS). Essa forma da doença possui potencial de surto e alta taxa de mortalidade. A maioria dos casos ocorre no Brasil, leste da África e Índia (Figura 1) (WHO, 2023).

A LV tem mostrado uma expansão geográfica significativa no Brasil, sendo atribuída ao processo de urbanização da doença. Esse fenômeno está relacionado à migração da população rural para os centros urbanos, à adaptação do vetor ao ambiente domiciliar e à presença do cão (*Canis familiaris*) como reservatório doméstico. Essa enfermidade encontra-se em franca expansão, ocupando destaque no cenário nacional e evidenciando a necessidade de adquirir novos conhecimentos epidemiológicos e geográficos relacionados às rotas de transmissão (HENSCHER e FONSECA, 2021).



**Figura 1.** Status de endemicidade da LV no mundo. Fonte: WHO, 2021.

## 1.2 Leishmaniose visceral canina

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma doença crônica e fatal. O parasita responsável pela LV nas Américas é um protozoário intracelular obrigatório pertencente à família Trypanosomatidae, ao gênero e subgênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1988). No Brasil, a transmissão do agente causador *Leishmania infantum* ocorre por meio da picada do inseto hematófago flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Os cães desempenham um papel epidemiológico importante em áreas endêmicas, pois são os reservatórios domésticos da LV. A doença canina apresenta sintomas clinicamente semelhantes à infecção humana, mas difere no que diz respeito às lesões cutâneas, que são frequentemente encontradas em animais infectados e sintomáticos (SILVA, 2007).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) desempenha um papel de grande importância na epidemiologia da LV em áreas endêmicas, sendo o único reservatório doméstico conhecido da doença. Em áreas silvestres, outros canídeos também desempenham um papel semelhante, como o *Cerdocyon thous* e o *Lycalopex vetulus* (= *Dusicyon vetulus*), juntamente com outros animais que foram encontrados abrigando a *Leishmania infantum*, como marsupiais didelfídeos (CORREDOR et al., 1989).

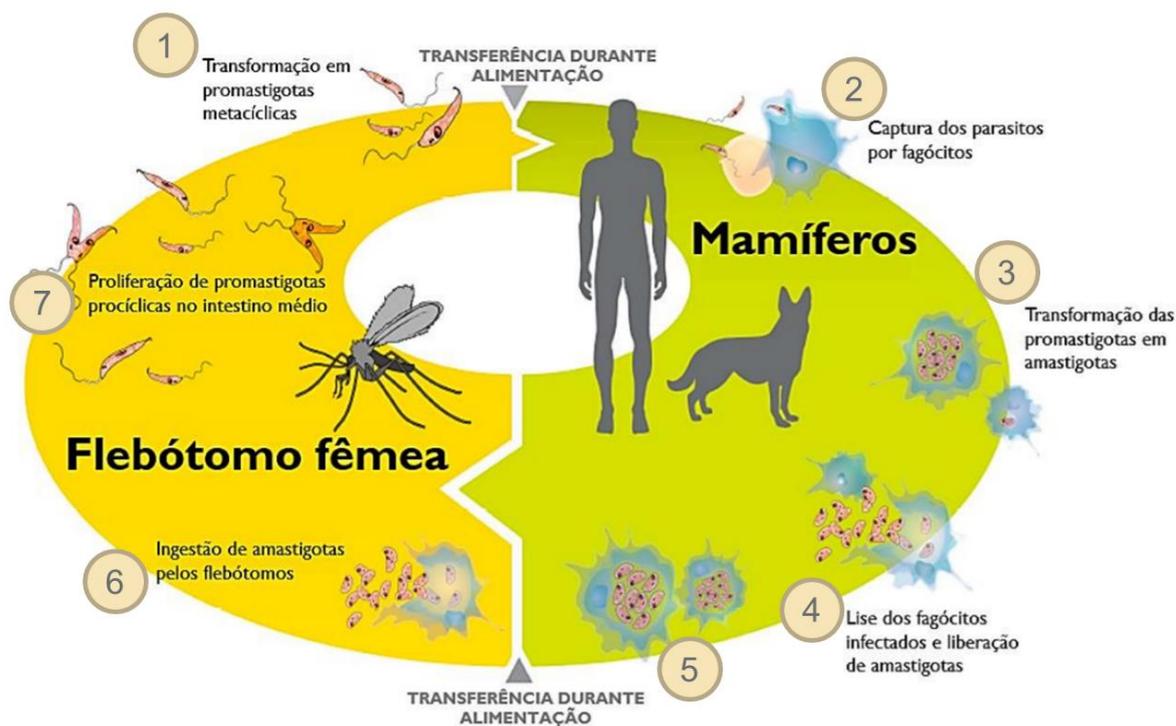
### 1.2.1 Agente etiológico e ciclo de vida

A LV pode ser ocasionada por diferentes espécies de *Leishmania*, variando de acordo com a região geográfica em que ocorre. No Sudeste da Ásia e na África Oriental, onde a LV é uma antroponose, o agente etiológico predominante é a *Leishmania donovani*. Já na Europa, na África Ocidental e nas Américas, a LV é considerada uma zoonose, e a espécie principal responsável por causar essa forma clínica é a *L. infantum* (ALVAR et al., 2004; MICHALICK, GENARO, 2005).

A transmissão da *Leishmania* ocorre quando fêmeas flebotomíneas, insetos hematófagos que necessitam de sangue para maturar seus ovos, picam um hospedeiro vertebrado (Figura 2). Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas regurgitam a forma promastigota metacíclica, na derme do hospedeiro (DIAS et al., 2003).

No local da picada, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente neutrófilos e macrófagos (CHANG, DWYER, 1978; PETERS et al., 2008). Dentro do vacúolo parasitóforo das células, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, que não possuem o flagelo exteriorizado, e começam a se multiplicar por divisão binária. Isso resulta no rompimento das células infectadas e na liberação de amastigotas, que podem infectar novas células (CHANG, DWYER, 1978;(KAYE; SCOTT, 2011)).

As células infectadas por amastigotas podem ser capturadas por uma nova fêmea flebotomínea durante o repasto sanguíneo. No tubo digestivo do inseto vetor, as amastigotas são liberadas e se diferenciam em promastigotas metacíclicas. Em seguida, essas promastigotas são regurgitadas na derme de um novo hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo biológico da *Leishmania* (SCHLEIN, 1993) (Figura 2).



**Figura 2.** Ciclo biológico de *Leishmania infantum*. Figura adaptada de (VERAS; DE MENEZES, 2016).

### 1.2.2 Aspectos clínicos

A sintomatologia da leishmaniose visceral canina (LVC) é inespecífica e dificulta o diagnóstico preciso devido à influência de fatores como hospedeiro, vetor e parasita (CONTRERAS et al., 2019). Em áreas endêmicas, cães podem ser clinicamente assintomáticos ou sintomáticos, e sua importância como fonte de infecção para os flebotomíneos tem sido amplamente discutida (TRAVI et al., 2001).

Estudos mostraram que cães assintomáticos podem ser fonte de infecção para os flebotomíneos, mas as taxas de infecção são mais consistentes em cães sintomáticos. Cães assintomáticos naturalmente infectados podem apresentar maior parasitismo nos linfonodos do que cães oligo e sintomáticos. Cães sintomáticos com infecção por *L. infantum* podem não apresentar formas amastigotas na pele, reduzindo sua participação como fonte de infecção para os insetos vetores (TRAVI et al., 2001).

A manifestação clínica pode variar de leve a grave, e sintomas comuns incluem, anemia, alterações oftálmicas e comprometimento da condição corporal. Os principais sinais clínicos da LVC incluem caquexia, hipergamaglobulinemia, hepatomegalia, esplenomegalia, anemia, linfadenopatia, hiporexia, onicogribose,

emaciação (LEMOS, SOUSA, E SILVA 2019; CONTRERAS et al., 2019). Na pele, são comuns úlceras crostosas, descamação escamosa e alopecia multifocal, podendo-se encontrar formas amastigotas em análises citológicas (CONTRERAS et al. 2019). As áreas mais afetadas são membros, coxins, plano nasal e orelhas (KRAUSPENHAR et al. 2007).

### **1.2.3 Diagnóstico**

O diagnóstico da LV é realizado por meio da coleta de amostras de sangue para exames sorológicos, como imunofluorescência indireta (IFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) e também por meio da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) de aspirado de tecido infectado, baço, sangue ou medula óssea.

Os testes sorológicos, como a imunofluorescência indireta, são geralmente sensíveis, mas podem apresentar reações cruzadas com antígenos de outros organismos, como *Trypanosoma*, *Mycobacterium*, *Plasmodium* e *Schistosoma* (LEMOS, SOUSA, e SILVA 2019). A detecção de antígenos de *Leishmania* por PCR é altamente sensível e específica, porém deve ser interpretada com cautela, especialmente em pacientes oriundos de áreas endêmicas com alta exposição antigênica (NUZUM et al. 2016).

A PCR quantitativa (qPCR) é uma técnica altamente sensível e específica capaz de diagnosticar a Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e monitorar a carga parasitária no animal ao longo da infecção ou durante o tratamento (RAMPAZZO et al., 2017). A imunossupressão causada pela *Leishmania* pode levar a infecções oportunistas, o que também dificulta o diagnóstico preciso da LV em cães (SILVA, 2007).

### **1.3 Perfil Transcricional em Leishmaniose Visceral**

Estudos de sequenciamento de RNA (RNAseq) podem avaliar a expressão diferencial de genes envolvidos na infecção e resposta do hospedeiro ao parasita. Através desta técnica, é possível compreender mais profundamente os mecanismos moleculares envolvidos na imunopatogênese da LV, desenvolver estratégias de imunoterapia para prevenção da progressão da doença (SANZ et al. 2022), e fornecer novas perspectivas para o diagnóstico da leishmaniose (LI et al. 2023).

Um estudo recente realizado por Sanz et al. (2022) investigou a resposta imune do hospedeiro durante a infecção por *L. infantum* em cães com LVC. As células do aspirados de linfonodos poplíteos de cães com LVC apresentaram alterações na expressão de citocinas Th1, Th2, Th17 e Tr1, além de marcadores de exaustão de células T e células NK. Houve também uma interrupção na funcionalidade de células B, monócitos e macrófagos. Genes relacionados ao estresse do retículo endoplasmático foram superexpressos, indicando a ativação do ramo IRE1 da resposta de proteína desdobrada. Além disso, foi identificado um módulo de coexpressão associado a esses processos, sugerindo que a *L. infantum* pode induzir mecanismos para evitar a apoptose das células hospedeiras e modular a formação de novos vasos sanguíneos nos linfonodos inflamados (SANZ et al. 2022).

O estudo de Li e colaboradores (2023) investigou a expressão diferencial de LncRNAs (*Long non-coding RNAs*) na leishmaniose, por meio da análise de soros de pacientes com leishmaniose e indivíduos não infectados. Os genes alvo diferencialmente expressos estavam associados a processos como autofagia, sinalização FoxO, sinalização mTOR e apoptose. Nove LncRNAs foram selecionados como os principais (MALAT1, NUTM2A-AS1, LINC00963 com alta expressão; LINC00622, MAPKAPK5-AS1, LINC02289, XPC-AS1, ZFAS1 e SNHG5 com baixa expressão) (LI et al. 2023).

Em Shadab (2019) foram investigados os fatores do hospedeiro e do parasita envolvidos na capacidade da *Leishmania* em ser resistente ou não à ação de macrófagos. Estes autores utilizaram macrófagos murinos infectados com parasitas virulentos (vAG83) ou não virulentos (nvAG83) de *L. donovani*. A análise de sinalização celular indicou que esses dois parasitas ativaram vias de sinalização MAPK e PI3K-AKT de forma diferencial nas células hospedeiras. Os genes relacionados à virulência e sobrevivência do parasita foram regulados positivamente nas amastigotas intracelulares do vAG83, enquanto os genes envolvidos em estímulos do sistema imunológico e regulação negativa do ciclo celular e da transcrição foram regulados positivamente no nvAG83 (SHADAB et al. 2019).

No estudo de Mas (2022) foi investigada a interação entre diferentes isolados de *L. infantum* e macrófagos caninos para compreender os mecanismos moleculares envolvidos nessa interação. Foi observado que um dos isolados do surto, chamado BOS1FL1, apresentava um fenótipo diferente em comparação com

a linhagem de referência BCN150, manifestando menor infectividade ao interagir com os macrófagos caninos. Foi observado também que ambos os parasitas induziram regulação em comum nas vias de sinalização do receptor fosfoinositídeo-3-quinase-proteína (PI3K) B/Akt e NOD-like. No entanto, outras vias, como fagocitose e transdução de sinal, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), quinases ativadas por mitógenos e fator nuclear-B (NF-κB), foram reguladas apenas após a infecção pelo BOS1FL1. Essas diferenças na regulação gênica podem contribuir para a redução da capacidade de infecção dos isolados do surto em células caninas (MAS et al. 2022).

Estudos transcricionais abordam diferentes aspectos da leishmaniose e fornecem insights importantes sobre a interação entre o parasita e o hospedeiro, além de potenciais mecanismos moleculares envolvidos na resposta imune e na patogênese da doença. Além disso, ressaltam a importância de investigar os diferentes isolados do parasita e sua capacidade de adaptação a diferentes espécies de hospedeiros. Portanto, essas pesquisas contribuem para o avanço do conhecimento sobre a leishmaniose e podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e imunoterapia mais eficazes.

Este trabalho é um recorte do projeto “RESPOSTA MEDULAR DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM *Leishmania infantum* APRESENTANDO DIFERENTES DESFECHOS CLÍNICOS”, no qual foi realizado o RNAseq para avaliar a expressão de genes nas células da medula óssea de cães naturalmente infectados, classificados em resistentes (não sintomáticos) e susceptíveis (sintomáticos). Sendo um dos resultados o painel baseado em aprendizado de máquina, no qual os genes envolvidos serão validados por RT-qPCR e as suas vias serão melhor exploradas neste TCC.

## **2. JUSTIFICATIVA**

A epidemiologia da leishmaniose visceral no Brasil mudou devido à urbanização, a ocorrência de migração de populações provindas de zonas rurais e desmatamento, resultando em surtos epidêmicos em populações pobres assistidas pelo SUS. A LV continua endêmica em alguns países devido ao controle ineficaz do vetor, falta de vacina eficiente e tratamentos inadequados. Estudos sobre os mecanismos da doença em cães suscetíveis podem contribuir para o entendimento

da patogênese em humanos e o desenvolvimento de abordagens imunoterapêuticas. Reduzir a transmissão da doença terá um impacto social, econômico e ambiental positivo, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e reduzindo custos de tratamento e hospitalização.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Realizar validação dos genes diferencialmente expressos (DEGs) avaliados por aprendizado de máquina (*Machine Learning*) e correlacionar as vias metabólicas e de sinalização as quais esses genes estão envolvidos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar o transcriptoma da resposta celular de cães naturalmente infectados com diferentes quadros clínicos.
- Validar os DEGs (EGR2, FOS, TINAGL1 e ADCY9) avaliados por aprendizado de máquina (*Machine Learning*) por RT-qPCR.

#### 4. CAPÍTULO ÚNICO

##### **Análise transcriptômica de células da medula óssea revela potenciais biomarcadores na leishmaniose visceral canina**

Helena Mariana Pitangueira Teixeira<sup>1+</sup>, Bruna Martins Macedo Leite<sup>1+</sup>, Maria Borges Rabelo de Santana<sup>1</sup>, Milena Neves Carvalho de Jesus<sup>1</sup>, Felipe Almeida Guimarães<sup>1</sup>, Manuela Solcà<sup>1</sup>, Claudia Ida Brodskyn<sup>1</sup>, Juliana P. B. de Menezes<sup>1</sup>, Deborah Bittencourt Mothé Fraga<sup>1,2,3</sup>, Patrícia Sampaio Tavares Veras<sup>1,3\*</sup>

1 Laboratório de Interação Parasita-Hospedeiro e Epidemiologia, Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz-Bahia, Salvador, Brasil.

2 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

3 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais - Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq).

+ Esses autores contribuíram igualmente para este trabalho.

\*Autor correspondente: pstveras@gmail.com

Este artigo será submetido à Nature Communications  
(<https://www.nature.com/ncomms/submit>)

## 1. Introdução

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença progressiva e potencialmente fatal que representa um grande desafio para a saúde pública, causando aproximadamente 30.000 mortes e 50-90.000 novos casos por ano<sup>1,2</sup>. Em alguns países do sul da Europa e no Novo Mundo, a LV zoonótica é causada principalmente por *Leishmania infantum*<sup>3</sup>. Evidências sugerem fortemente que os cães servem como o principal reservatório urbano de *L. infantum*, já que a LV canina (CVL) é prevalente em aproximadamente 50 países onde a LV humana é endêmica<sup>4</sup>. Epidemias caninas que precedem o surgimento de casos humanos também foram documentadas<sup>5,6</sup>. Além disso, a prevalência da LVC supera a da LV humana em áreas endêmicas, pois cães infectados com *Leishmania* são uma fonte de infecção para o vetor (ou seja, flebotomíneo) devido ao alto parasitismo cutâneo<sup>7,8</sup>. Além disso, cães infectados assintomáticos que abrigam parasitas na derme também podem levar à transmissão da doença em áreas urbanas<sup>9,7,10</sup>.

A LVC é uma doença sistêmica crônica que apresenta uma variedade de manifestações clínicas, desde infecção subclínica até doença grave e potencialmente fatal<sup>11,12</sup>. Os cães desenvolvem sinais clínicos altamente variáveis, semelhantes aos apresentados em humanos, tornando a CVL um bom modelo para estudar a progressão da doença na LV humana<sup>13,14,15</sup>. Semelhante à LV humana, a LVC afeta os órgãos linfóides, causando hepatoesplenomegalia, imunossupressão e alterações hematológicas<sup>16</sup>. A progressão da LVC depende de vários fatores, incluindo a virulência do parasita, fatores genéticos do hospedeiro e o tipo de resposta imune desencadeada pelo hospedeiro à infecção<sup>17</sup>. Além disso, o papel da resposta imune na patogênese das formas mais graves de LVC não é totalmente compreendido, principalmente no que diz respeito ao envolvimento da resposta imune celular<sup>18</sup>. A medula óssea (MO) é um dos principais tecidos que abriga *L. infantum*, e as células mielóides são as células hospedeiras nas quais os parasitas são encontrados principalmente<sup>19,20,18,21</sup>. No entanto, pouco se sabe sobre o papel dessas células na evolução clínica da LVC<sup>22,23</sup>. Conforme relatado por Nicolato et al. (2013), a hipoplasia eritróide é a principal observação na medula óssea (MO) de cães com LV sintomática, que se correlaciona com níveis reduzidos de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito na corrente sanguínea. Os autores também observaram

que cães doentes com neutrofilia exibiam níveis elevados de precursores de neutrófilos na BM. Em termos de contagem de linfócitos, os cães soropositivos sem sinais clínicos de LV apresentaram linfocitose tanto na MO quanto no sangue periférico. Por outro lado, animais sintomáticos, apesar de apresentarem níveis elevados de linfócitos na MO, apresentavam níveis diminuídos de linfócitos circulantes<sup>23</sup>. Esses achados lançam luz sobre o papel desempenhado pela BM na patogênese dessa doença, particularmente na LVC grave, onde os parasitas infectam os macrófagos estromais da BM, levando ao aumento da mielopoiese<sup>24</sup>.

Embora esses achados contribuam para nossa compreensão do papel da MO na patogênese da LVC, poucos estudos tentaram estabelecer correlações entre os fenótipos celulares encontrados na MO de cães infectados por *L. infantum* com os desfechos clínicos. Em modelo experimental murino, *L. donovani* induziu a expansão de precursores de granulócitos hematopoiéticos residentes na MO, bem como de precursores de mielócitos com fenótipo regulador, sendo que estes últimos se mostraram mais susceptíveis à infecção e, portanto, cruciais para a patogênese de VL<sup>25</sup>.

Portanto, a fim de obter informações mais profundas sobre o significado das células da medula óssea (MO) na patogênese da LVC, este estudo teve como objetivo caracterizar o transcriptoma da resposta celular de cães naturalmente infectados com diferentes quadros clínicos. Os animais foram inicialmente selecionados a partir de um estudo de coorte anterior com seguimento de dois anos<sup>26</sup> e posteriormente categorizados como resistentes ou suscetíveis. Para melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à imunopatogênese da infecção por *L. infantum*, células da MO foram coletadas para análise transcriptômica, com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) quando comparados com células obtidas de cães não infectados<sup>26</sup>, e então classificados como resistente ou suscetível. Para fornecer uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à imunopatogênese da infecção por *L. infantum*, células da MO foram coletadas para análise transcriptômica na tentativa de identificar DEG em comparação com células obtidas de cães não infectados.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1 Seleção dos animais

Os cães foram selecionados de uma coorte previamente descrita de caninos classificados por parâmetros clínicos, parasitológicos e imunológicos como resistentes e suscetíveis à leishmaniose visceral canina (LVC) por Solcà et al. (2021)<sup>26</sup>. Após obter o consentimento dos proprietários, os animais que permaneceram sob seus cuidados e não foram tratados para LVC foram incluídos no presente estudo. Um total de 8 cães suscetíveis e 8 resistentes foram incluídos e então submetidos a novas avaliações clínicas.

Para fins de comparação, foi incluído um grupo controle de cães (n=8) não infectados por *L. infantum* residentes no Abrigo São Francisco de Assis, localizado em Salvador, Bahia (região não endêmica para LVC). Todos esses animais testaram negativo para LVC em dois testes sorológicos (RT-DPP® CVL Bio-Manguinhos e EIE® CVL Bio-Manguinhos) e por testes moleculares (qPCR).

### 2.2 Aspectos éticos

O Comitê de Ética em Pesquisa (protocolo CEUA nº 014/2017) do Instituto Gonçalo Moniz (IGM-Fiocruz, Bahia-Brasil) aprovou o presente estudo. Todos os proprietários de cães cujos animais participaram deste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

### 2.3 Avaliação clínica dos cães

Cada cão da coorte anterior<sup>26</sup> passou por uma nova avaliação clínica para determinar a permanência das classificações previamente estabelecidas (resistente ou suscetível). Uma equipe de veterinários treinados realizou as avaliações clínicas por meio de uma ficha clínica padronizada. O prontuário documentou a presença e a intensidade dos sinais clínicos mais frequentemente associados à LVC, incluindo estado nutricional, coloração das mucosas, dermatite periocular, crostas e/ou ulceração da orelha, despigmentação e/ou hiperqueratose do focinho, lesões focinho, alopecia, dermatite seborreica, onicogribose, linfadenopatia e esplenomegalia. Todos os animais receberam novas pontuações clínicas refletindo

pontuações recalculadas para cada sinal clínico que estava presente em qualquer uma das avaliações anteriores.

#### 2.4 Coleta de aspirado de medula óssea

A punção da medula óssea foi realizada no esterno de cada cão para obtenção do aspirado. As amostras coletadas de aspirado de medula óssea foram armazenadas em RNAlater (Thermo Fisher Scientific – Massachusetts, EUA).

#### 2.5 Extração e sequenciamento de RNA

A extração e o sequenciamento do RNA foram terceirizados para a Omega Bioservices (Geórgia, EUA). O RNA total foi isolado usando um E.Z.N.A.® Total RNA Kit II (Omega Bio-Tek, Georgia, EUA). Para minimizar a contaminação por rRNA e mRNA derivados da globina, foram utilizadas esferas magnéticas ribo-zero (Life Technologies - Carlsbad, Califórnia, EUA) para depleção. A qualidade do mRNA foi verificada por eletroforese em um sistema Agilent TapeStation e quantificada usando um aparelho NanoDrop. Apenas amostras com um número de integridade de RNA (RIN) > 8 foram usadas.

A biblioteca de cDNA preparada com o kit Illumina TruSeq Stranded Total RNA (Califórnia, EUA) foi sequenciada na plataforma HiSeqX10 (Illumina - Califórnia, EUA). Os dados brutos da sequência estão disponíveis para download no portal Illumina BaseSpace.

#### 2.6 Pré-processamento e mapeamento de RNA-seq

Trimmomatic V0.36 (Jülich, Alemanha) foi usado para remover bases e adaptadores de baixa qualidade. Salmon v1.2.1 (Boston, EUA) foi usado para mapear as leituras limpas para a versão CanFam3.1 do transcriptoma de referência canino. Além disso, leituras de amostras de cães suscetíveis e resistentes foram submetidas a alinhamento com o genoma de *L. infantum* para determinação da carga parasitária.

## 2.7 Análise de bioinformática

Após o alinhamento das sequências geradas, todo o pré-processamento e análise dos dados foram realizados no R versão 4.0.0. O pacote tximport foi usado para converter a saída do Salmon em tabelas de contagem. O pacote edgeR foi empregado para identificar DEGs comparando cães resistentes e suscetíveis com aqueles não infectados com *L. infantum*. A significância dos DEGs foi determinada com base em um valor de p ajustado por FDR < 0,05 e *fold change* > ±1,4. Após análise dos DEGs foi realizado *Machine Learning* para identificar o número mínimo de DEGs capaz de distinguir cães suscetíveis de resistentes, o algoritmo Random Forest foi aplicado usando o pacote *randomForest R*, e o modelo resultante foi avaliado usando análise de curva ROC. Um mapa de calor foi plotado usando valores de log-cpm para visualizar o agrupamento de amostras.

## 2.8 Validação dos DEGs por RT-PCR

Para quantificar os níveis de expressão de mRNA de quatro DEGs que foram identificados no *Machine Learning* para diferenciar cães suscetíveis e resistentes, RT-qPCR foi empregado. Posteriormente, quatro cães suscetíveis e quatro resistentes foram submetidos a novos procedimentos de coleta de amostras de aspirado de MO. O mRNA foi extraído de células da BM usando um RNeasy Mini Kit (Qiagen) e a síntese de cDNA foi realizada usando SuperScript™ III Reverse Transcriptase (ThermoFisher). Foram utilizadas sondas inventariadas de Ensaios TaqMan™ específicos para cães (Thermo Fisher). A etapa da transcriptase reversa foi mantida a 50°C por 15 minutos e a 95°C por 2 minutos. A PCR foi realizada com 40 ciclos de 95°C por 3 segundos e 62,5°C por 30 segundos em modo rápido. Os níveis relativos de expressão gênica foram determinados normalizando os níveis de expressão gênica endógena usando o método da curva relativa.

## 3. Resultados

### 3.1. Caracterização dos cães selecionados

A análise transcriptômica das células da MO de cães categorizados como suscetíveis ou resistentes à LVC foi realizada. Como resultado, um total de 8 cães resistentes, 8 cães suscetíveis e 8 cães não infectados com *L. infantum* foram

incluídos no estudo. A Tabela 1 fornece uma visão geral das características clínicas dos cães selecionados suscetíveis e resistentes à LVC, não revelando diferenças significativas entre os animais.

**Tabela 1.** Caracterização dos cães suscetíveis e resistentes.

| Características       | Cães Suscetíveis | Cães Resistentes | p value |
|-----------------------|------------------|------------------|---------|
|                       | (N = 8)          | (N = 8)          |         |
|                       | n (%)            | n (%)            |         |
| <b>Sexo</b>           |                  |                  |         |
| Fêmea                 | 5 (62.5)         | 6 (75)           | 1       |
| Macho                 | 3 (37.5)         | 2 (25)           |         |
| <b>Idade estimada</b> |                  |                  |         |
| Adulto (5-7 anos)     | 5 (62.5)         | 7 (87.5)         | 0.57    |
| Idoso (> 8 anos)      | 3 (37.5)         | 1 (12.5)         |         |
| <b>Raça</b>           |                  |                  |         |
| Raça misturada        | 8 (100)          | 7 (87.5)         | 1       |
| Pura (Labrador)       | 0                | 1 (12.5)         |         |
| <b>Tamanho</b>        |                  |                  |         |
| Pequeno (4-10 kg)     | 1 (12.5)         | 3 (37.5)         | 0.76    |
| Médio (11-20 kg)      | 4 (50)           | 1 (12.5)         |         |
| Grande (21-40 kg)     | 3 (37.5)         | 4 (50)           |         |

Sexo, idade estimada e raça: teste exato de Fisher; Tamanho: teste qui-quadrado para tendência.

Quanto às manifestações clínicas, observou-se que todos os cães suscetíveis (8/8) apresentavam linfadenopatia, enquanto apenas 25% (2/8) dos animais resistentes apresentavam esse sintoma (Figura 1). Por outro lado, a onicogribose foi o sinal clínico mais comum observado nos animais resistentes, com prevalência de 50% (4/8) (Figura 1).

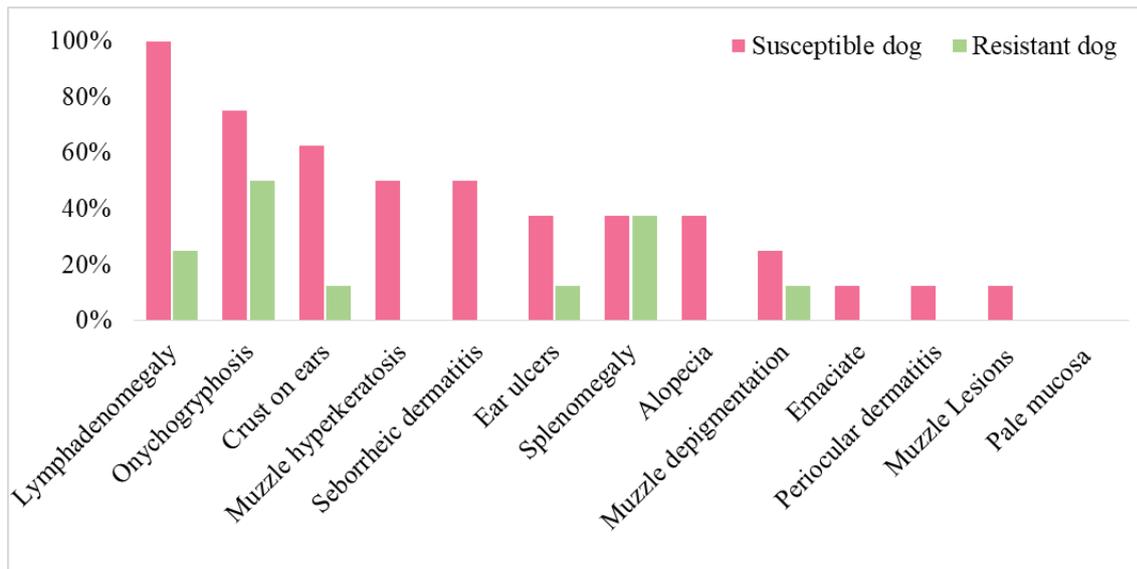
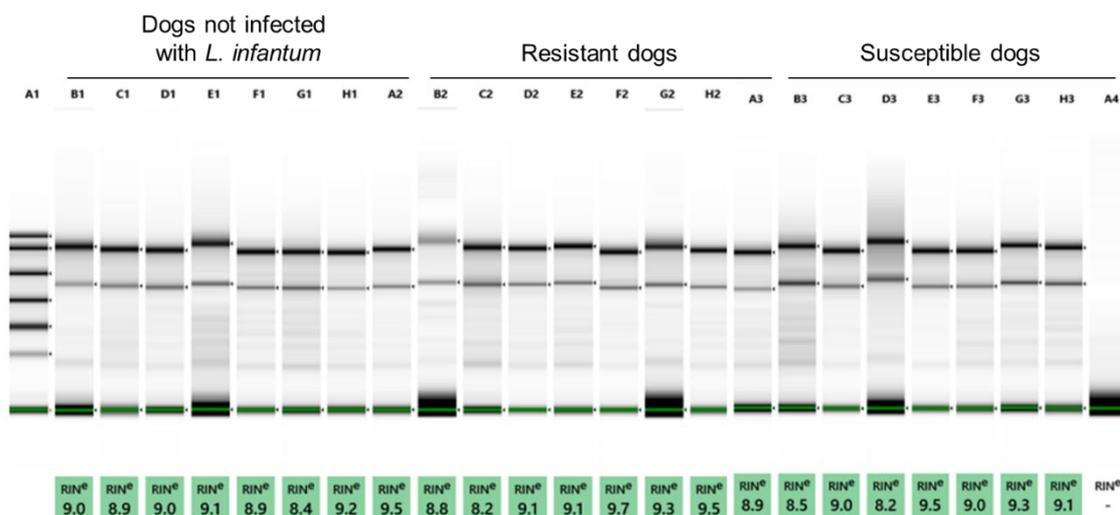


Figura 1 – Frequência dos sinais clínicos observados na avaliação de cães suscetíveis e resistentes à LVC selecionados de um estudo de coorte anterior.

### 3.2 Controle de qualidade do RNA

Para investigar os perfis transcricionais de cães infectados com *L. infantum*, realizamos análise de RNA-Seq em células da medula óssea obtidas de animais suscetíveis e resistentes a CVL e cães saudáveis. Após a extração do RNA das células da medula óssea, quantificamos os níveis de RNA e avaliamos sua integridade por espectrofotometria e eletroforese (Figura 2).

Após análise de controle de qualidade, uma amostra obtida de um animal suscetível foi excluída do estudo devido à baixa quantificação de mRNA por espectrofotometria, e o teste de integridade do RNA por eletroforese não teve sucesso (Figura 2 – amostra A4). No entanto, as amostras restantes exibiram concentrações de RNA superiores a 100 ng/μL e pontuações RIN acima de 8, indicando RNA de alta qualidade adequado para análise subsequente.



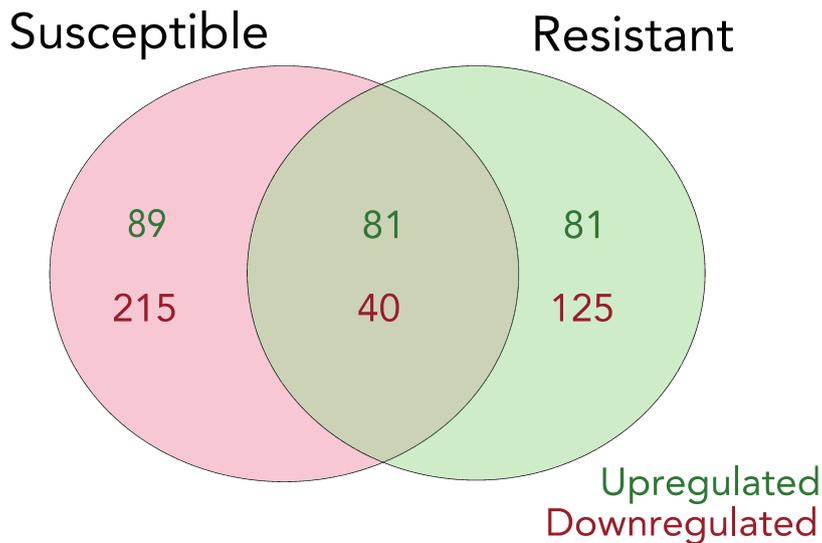
**Figura 2** – Eletroforese em gel para avaliação da integridade do RNA em amostras obtidas de cães suscetíveis e resistentes à LVC, bem como de outros não infectados por *L. infantum*. A1 – Marcador de Peso Molecular; B1–A2: cães não infectados com *L. infantum*; B2 – A3: cães resistentes à LVC; B3–A4: Cães suscetíveis a CVL.

### 3.3 Construção e mapeamento da biblioteca de cDNA e análise de dados

Após a extração do RNA, uma biblioteca de cDNA foi construída a partir das amostras obtidas de 7 cães suscetíveis, 8 cães resistentes e 8 cães não infectados com *L. infantum*. Cada amostra foi sequenciada, gerando aproximadamente 58 milhões de leituras por amostra. Os dados brutos obtidos foram então submetidos a mapeamento e análise, resultando em uma taxa de mapeamento de aproximadamente 50% após a filtragem de RNAs e miRNAs não anotados.

### 3.4 Identificação de genes expressos diferencialmente (DEGs)

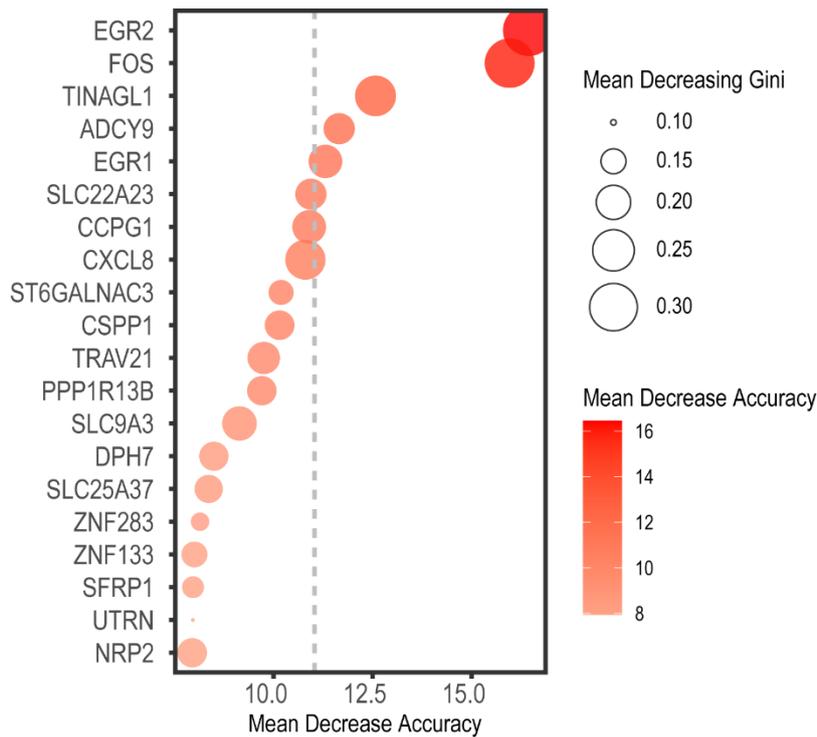
A análise bioinformática revelou um total de 425 DEGs na medula óssea de cães suscetíveis quando comparados ao grupo controle. Da mesma forma, nas células da medula óssea de cães resistentes, foram identificados 327 DEGs em comparação ao grupo controle. A distribuição de DEGs regulados para cima e para baixo nas células da medula óssea de cada grupo é ilustrada na Figura 3.



**Figura 3** – Diagrama de Venn comparando DEGs em células da medula óssea de cães suscetíveis e resistentes em relação ao controle avaliados por RNASeq e analisados por edgeR. DEGs são marcados como regulados para cima (verde) ou regulados para baixo (vermelho).

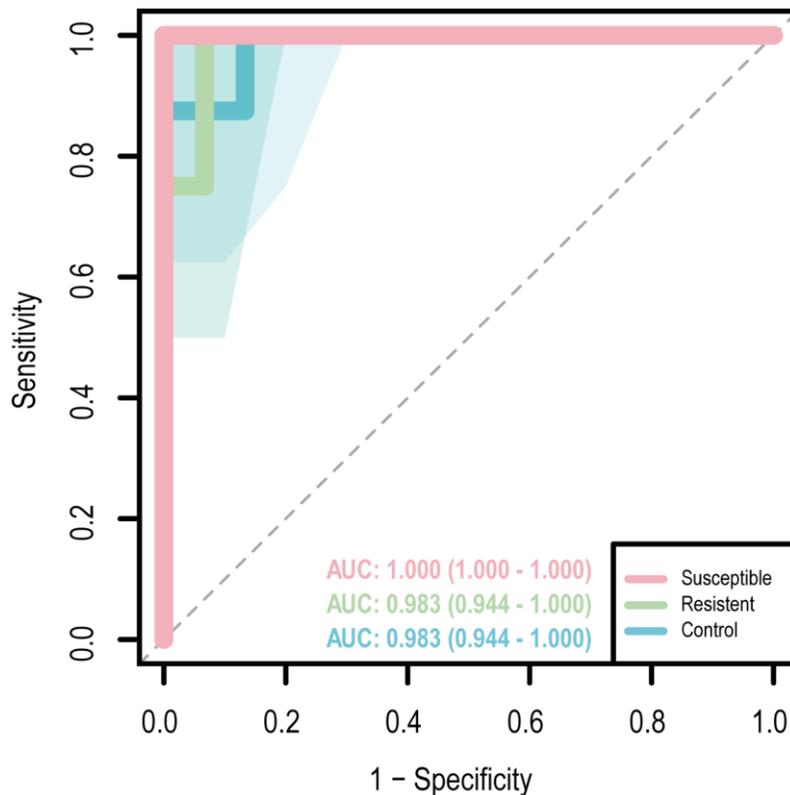
### 3.5 Identificação de DEGs para distinguir entre cães resistentes e suscetíveis

O algoritmo Random Forest foi empregado para identificar DEGs que podem efetivamente diferenciar entre cães resistentes e suscetíveis a LVC (Figura 4). DEGs com valores de Gini acima do 3º quartil foram selecionados para análise posterior. Especificamente, os níveis de expressão gênica, representados como log-cpm (contagem por milhão), de *EGR2* (*Early Growth Response 2*), *FOS* (Fos Proto-Oncogene, Subunidade do Fator de Transcrição AP-1), *TINAGL1* (*Tubulointerstitial Nephritis Antigen Like 1*) e *ADCY9* (Adenilato Ciclase 9) foram utilizados para classificar os cães como resistentes ou suscetíveis à LVC (Figura 4).

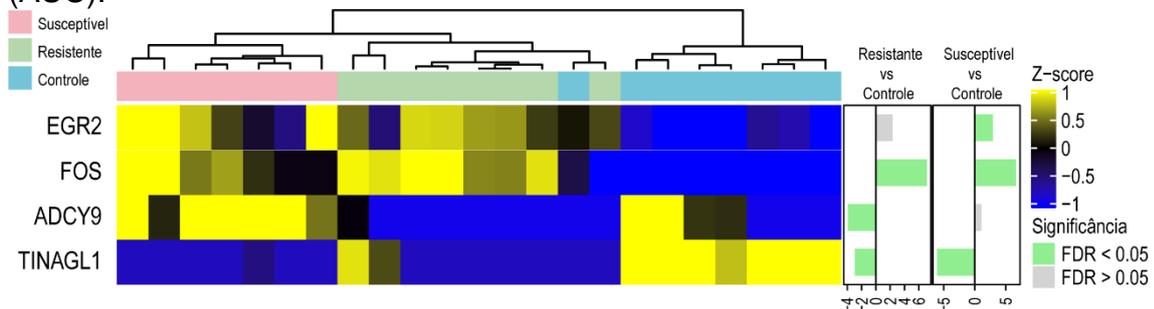


**Figura 4** - Modelo de gene de aprendizado de máquina da Random Forest. Gráfico de bolhas de precisão de diminuição média e valores de Gini decrescentes médios estimados a partir da expressão gênica log-cpm. A linha cinza pontilhada refere-se ao 3º quartil.

Os quatro DEGs identificados por meio de aprendizado de máquina foram empregados como modelo e avaliados pela curva ROC (Figura 5). Além disso, um mapa de calor foi gerado, retratando os valores de log-cpm de cada DEG, para avaliar o agrupamento de cães com base nesses valores. Notavelmente, o mapa de calor demonstrou que os quatro DEGs classificaram com sucesso os cães de acordo com sua classificação clínica como resistentes ou suscetíveis (Figura 6).



**Figura 5** - A avaliação dos genes do modelo *Machine Learning* (Random Forest) por ROC. A área sombreada mostra o intervalo de confiança da área sob a curva (AUC).

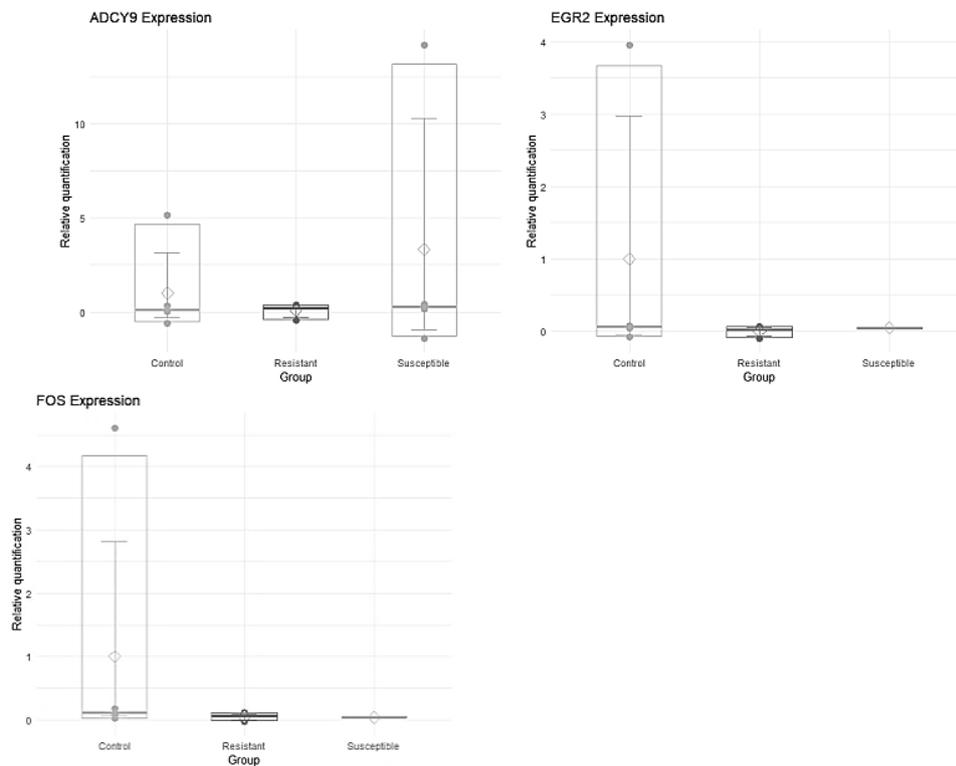


**Figura 6** - Mapa de calor dos genes do modelo *Machine Learning*. O gráfico de barras laterais mostra o valor da diferença de dobra de cada gene para ambas as comparações (Resistente x Controle e Suscetível x Controle). As barras verdes são os genes significativos do FDR, enquanto as barras cinzas são a mudança de dobra com o FDR maior que 0,05.

### 3.6 – Validação

RT-qPCR foi conduzido usando 5 amostras de controle, 4 amostras suscetíveis e 4 amostras resistentes. O resultado do ADCY9 RT-qPCR foi consistente com os dados de *Machine Learning* confirmando os padrões de expressão dos genes identificados. ADCY9 mostrou uma tendência a menor expressão na medula óssea de cães resistentes. Por outro lado, EGR2 e FOS não foram consistentes com o *Machine Learning*. Ambos exibiram tendência a menor expressão na medula óssea

de cães suscetíveis e resistentes em relação ao grupo controle. No entanto, devido ao baixo poder estatístico, a diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 7).



**Figura 7** - RT-qPCR de genes identificados por *Machine Learning*. A. ADCY9; B. EGR2; C. FOS. \* TINAGL1 está ausente devido ao atraso na entrega das sondas.

#### 4. Discussão

A análise de RNAseq de células da medula óssea de cães naturalmente infectados revelou a expressão dos genes EGR2, FOS, ADCY9 e TINAGL1, oferecendo informações valiosas sobre a resposta imune do hospedeiro à infecção por *L. infantum* nesses animais. Para aprofundar os papéis potenciais desses genes e sua interação na determinação do resultado da doença, este estudo teve como objetivo validar sua expressão e lançar luz sobre seu envolvimento na progressão da doença.

A família de genes EGR (*Early Growth Response 2*), incluindo EGR1, EGR2 e EGR3, é conhecida por regular a transcrição de genes da família SOCS (supressor de sinalização de citocina 1), contribuindo para a evasão imune e inativação da célula hospedeira em doenças infecciosas crônicas<sup>27</sup>. Nosso estudo descobriu que EGR2 exibiu maior expressão em cães suscetíveis (*fold change*:

2,94). No entanto, em RT-qPCR houve uma tendência de menor expressão de cães suscetíveis e resistentes. Curiosamente, esse fator de transcrição desempenha um papel crucial na regulação positiva de SOCS1, promovendo a supressão de citocinas pró-inflamatórias. Foi demonstrado que EGR2 e AHR (receptor de hidrocarboneto de arila) regulam positivamente a indução de SOCS1 em macrófagos infectados da medula óssea e SOCS3 em células T. Essa regulação positiva inibe a indução de IL-12 em macrófagos e a síntese de IFN- $\gamma$  em células T, mediada por STAT1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) e STAT4, respectivamente. A cascata de sinalização desse processo envolve a ativação do SRF (fator de resposta sérica) mediada por PI3K/Akt, facilitando a translocação nuclear de EGR2 e ligando-se ao promotor SOCS1 e resultando em sua indução precoce em macrófagos de medula óssea (Figura 8). Além disso, o silenciamento de SOCS1 e SOCS3 restaura os níveis de IL-12 e IFN- $\gamma$  e melhora a interação macrófago-célula T. EGR2 também desempenha um papel crucial na indução de anergia de células T, promovendo atividade reguladora em células T CD4+. Posteriormente, a IL-10 é induzida levando à expressão do gene 3 de ativação de linfócitos (LAG-3), que é essencial para a produção de IL-10 induzida por IL-27, mantendo o equilíbrio entre as citocinas reguladoras e efetoras<sup>28</sup>. A desregulação de EGR2, um fator de transcrição, pode ter impactos negativos em vários processos celulares, incluindo metabolismo lipídico, desenvolvimento, adesão, proliferação, diferenciação e metástase<sup>29</sup>. O papel desempenhado por esse fator de transcrição na LVC deve ser melhor investigado.

Os membros da família FOS (Fos Proto-Oncogene, Subunidade do Fator de Transcrição AP-1) e Jun formam os heterodímeros da Proteína Ativada-1 (AP-1), incluindo c-FOS, FOS B, FRA 1 e FRA 2<sup>30</sup>. A geração de c A proteína -Fos, codificada pelo gene c-FOS, requer a fosforilação de Elk1 por MAPKs. As MAPKs servem como efetores finais das vias de transdução de sinal iniciadas na membrana plasmática<sup>31</sup>. Especificamente, a expressão de c-Fos está associada à ativação de macrófagos e ativação de uma resposta do tipo Th1, e sua expressão reduzida é observada em resposta a PMA e iNOS mediante estimulação de IFN- $\gamma$ <sup>32</sup>. A infecção por *Leishmania* influencia fortemente o AP-1, um fator de transcrição crucial em resposta a infecções, desempenhando um papel crítico na produção de óxido nítrico (NO) induzido por IFN- $\gamma$ <sup>33</sup>.

Em nossa análise de RNAseq, observamos níveis de expressão mais altos de FOS em cães suscetíveis (*fold change*: 6,68) e resistentes (*fold change*: 7,14). Entretanto, no RT-qPCR houve uma tendência de menor expressão tanto de suscetíveis quanto de resistentes. Contraditoriamente, a literatura existente sugere que a expressão de FOS é atenuada durante a infecção por *Leishmania*. Por exemplo, estudos demonstraram que em macrófagos infectados com *Leishmania*, a expressão de c-Fos na fração nuclear é diminuída<sup>34</sup>.

O heterodímero AP-1, um fator de transcrição vital, é conhecido por regular a expressão gênica em resposta a vários estímulos fisiológicos e patológicos<sup>34</sup>. Notavelmente, os Glicosilfosfatidilinositóis (GPIs)<sup>35</sup> e LPS (lipopolissacarídeo)<sup>36</sup> de *Leishmania* exibem atividades biológicas significativas, incluindo a inibição das funções dos macrófagos por meio da via de sinalização dependente da proteína quinase C (PKC). O domínio lipídico único dos GPIs de *Leishmania* contribui principalmente para a regulação negativa transitória da expressão de c-fos dependente de PKC (Figura 8)<sup>35,36</sup>. Adicionalmente, *L. donovani*, outra espécie de *Leishmania*, exerce efeitos pleiotrópicos ao influenciar a expressão de múltiplos genes em macrófagos, sugerindo uma regulação seletiva da transdução de sinal para promover sua sobrevivência nas células hospedeiras<sup>36</sup>.

O ADCY9 (Adenilato Ciclase 9) foi um dos genes expressos diferencialmente em nosso RNAseq em que o grupo de cães resistentes apresentou um *fold change* de -3,94 e o RT-qPCR também apresentou uma tendência à expressão reduzida em cães resistentes. No estudo de Solcà (2021), esses cães acompanhados que foram analisados e o grupo resistente apresentaram diminuição do envolvimento da IL-10 na rede após o diagnóstico da infecção<sup>26</sup> corroborando nosso achado. A indução de IL-10 é regulada por CREB (*CAMP Responsive Element Binding Protein 1*), um fator de transcrição que responde ao cAMP (adenosina monofosfato cíclico), que poderíamos supor ser produzido por uma via alternativa à PGE2 (Prostaglandina E), ADCY9 (Figura 8).

A adenilato ciclase é uma enzima localizada na membrana celular, responsável por catalisar a conversão do ATP (adenosina trifosfato) em AMP cíclico<sup>37</sup>. O cAMP intracelular tem impacto direto na expressão da citocina imunorreguladora IL-10 em células monocíticas. Este efeito é mediado pela ativação

de fatores de transcrição eucarióticos, nomeadamente CREB-1 e ATF-1 (*Activating Transcription Factor 1*), no acentuador a montante do promotor de IL-10<sup>38</sup>. No entanto, a produção de IL-10 na infecção por leishmaniose não é descrita pela via da adenilato ciclase, mas pela via da PGE2.

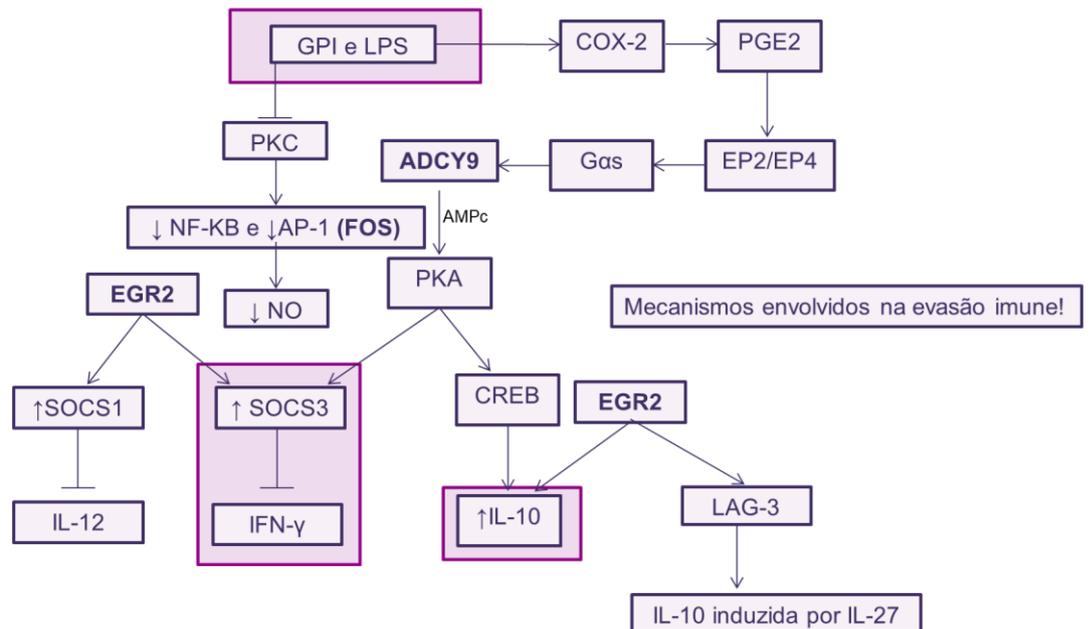
Durante a infecção por leishmanioses, o cAMP é produzido pela via COX-2/PGE2/EP2. Esse nível elevado de cAMP leva à inibição das funções microbicidas dos macrófagos<sup>39</sup>. Posteriormente, a PGE2, secretada de macrófagos infectados da medula óssea (BMMvs), induz a via cAMP-PKA ligando-se ao receptor EP2/EP4 das células T CD4+, levando à ativação de SP1, CREB e GATA1 e à expressão de SOCS3. O silenciamento mediado por RNA de pequena interferência de SOCS1 e SOCS3 em macrófagos e células T, respectivamente, restaurou os níveis de citocinas IL-12 e IFN-g e a interação BMMv–células T<sup>27</sup>.

Os fatores de transcrição CREB, que respondem ao cAMP, são regulados pela glicogênio sintase quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), que controla positivamente a expressão de IL-10. A infecção de macrófagos com *Leishmania* levou à fosforilação de CREB na serina 133, resultando em aumento da atividade de ligação de CREB ao DNA e subsequente indução de IL-10. Além disso, a inibição de Akt ou a superexpressão de GSK-3 $\beta$  reduziu significativamente a produção de IL-10 em resposta à *Leishmania*, indicando que GSK-3 $\beta$  regula negativamente a produção de IL-10 por células mielóides durante a infecção por *Leishmania*. Consequentemente, a supressão da GSK-3 $\beta$  promove a patogênese da doença<sup>40</sup>.

A indução de IL-10 é regulada pelo fator de transcrição CREB-1 e ATF-1 (*Activating Transcription Factor 1*), no acentuador a montante do promotor de IL-1038. Esses fatores de transcrição responde ao cAMP, produzido pelas adenilato ciclases, que são enzimas localizadas na membrana celular por catalisar a conversão de ATP (trifosfato de adenosina) em AMP cíclico (monofosfato de adenosina cíclico)<sup>37</sup>.

Sabe-se que a produção de IL-10 ocorre principalmente pela via da PGE2, e não pela via da adenilato ciclase. Em nosso estudo, observamos uma redução na expressão de ADCY9, enzima envolvida na produção de cAMP, em células da medula óssea de cães resistentes à infecção por *L. infantum*. Essa diminuição na expressão de ADCY9 pode resultar na redução da produção da citocina

moduladora, IL-10. Em desacordo com nossos achados, foi demonstrado que durante a infecção por *Leishmania*, o cAMP é produzido pela via COX-2/PGE2/EP2, e níveis elevados de cAMP resultantes da ativação dessa via inibem as funções microbicidas dos macrófagos<sup>39</sup>. Nossa hipótese é que a menor expressão de ADCY9 em cães resistentes resulta em uma redução na produção de cAMP devido à modulação negativa de uma via alternativa independente da via PGE2.



**Figura 8.** Interação entre as vias analisadas a partir dos DEGs (EGR2, FOS, ADCY9) selecionados a partir do *Machine Learning*.

Até onde sabemos, apenas um estudo investigou o papel de TINAGL1 na infecção por *Leishmania*. O estudo de Espitia e colaboradores (2014) examinou a resposta do baço de hamsters infectados com *L. donovani* após 28 dias e observou uma expressão diferencial de TINAGL1 (*fold change*: -2,88), que foi associada às funções da ontologia gênica "Resposta Imune" e "Resposta Inflamatória"<sup>42</sup>. Consistente com esses achados, nossa análise de RNAseq revelou uma diminuição na expressão de TINAGL1 em cães suscetíveis (*fold change*: -6,08) e resistentes (*fold change*: -2,97) à infecção por *L. infantum*. TINAGL1 é conhecido por estar envolvido na adesão celular, organização da matriz extracelular e regulação das respostas imunes. Tem sido associada a doenças renais e progressão do câncer e pode desempenhar um papel no crescimento do tumor, invasão e metástase<sup>29</sup>.

Podemos supor que em cães infectados por *Leishmania* a redução de TINAGL1 pode estar ligada a uma redução na migração de células da medula óssea para o sangue periférico.

### **Conclusão**

Em conclusão, foi possível validar o gene ADCY9 por meio do método RT-qPCR, evidenciando sua importância como biomarcador na resistência à doença. Entretanto, embora os genes EGR2, FOS e TINAGL1 não tenham sido validados, eles estão envolvidos em vias cruciais na regulação imunológica do hospedeiro. Este estudo contribui para uma compreensão mais aprofundada da patogênese da leishmaniose visceral, fornecendo informações relevantes para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas e prognósticas mais eficazes.

## REFERÊNCIA

1. Desjeux, P. *Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **27**, 305–318 (2004).
2. WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2023 (2023).
3. Silva, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina Pathology and pathogenesis of canine visceral *Leishmaniasis*. *Rev. Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas* **1**, 20–31 (2007).
4. Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J. & Nieto, J. Canine *Leishmaniasis*. *Adv. Parasitol.* **57**, 1–88 (2004).
5. Bevilacqua, P. D., Paixão, H. H., Modena, C. M. & Castro, M. C. P. S. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* **53**, 1–8 (2001).
6. Sherlock, I. A. Ecological interactions of visceral *Leishmaniasis* in the State of Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **91**, 671–683 (1996).
7. Molina, R. *et al.* Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 491–493 (1994).
8. Saridomichelakis, M. N. *et al.* Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. *Vet. Dermatol.* **18**, 227–233 (2007).
9. Borja, L. S. *et al.* Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet. Parasitol.* **229**, 110–117 (2016).
10. TRAVI, B. L., TABARES, C. J., CADENA, H., FERRO, C. & OSORIO, Y. Canine visceral *Leishmaniasis* in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med* **64**, 119–124 (2001).
11. Baneth, G. *et al.* Emergence of visceral *Leishmaniasis* in central Israel. *Trends Parasitol.* **59**, 226–235 (1998).
12. Fisa, R. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain: )The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.* **83**, 87–97 (1999).
13. Gontijo, C. M. F. & Melo, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.* **7**, 338–349 (2004).
14. Koutinas, A. F. *et al.* Clinical considerations on canine visceral *Leishmaniasis* in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **35**, 376–383 (1999).
15. Loría-Cervera, E. N. & Andrade-Narváez, F. J. Review: Animal models for the study of *Leishmaniasis* immunology. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **56**, 1–11 (2014).
16. Samant, M., Sahu, U., Pandey, S. C. & Khare, P. Role of Cytokines in

- Experimental and Human Visceral *Leishmaniasis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 1–18 (2021).
17. Reiner, S. L. & Locksley, R. M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 151–177 (1995).
  18. Lafuse, W. P. *et al.* *Leishmania donovani* Infection Induces Anemia in Hamsters by Differentially Altering Erythropoiesis in Bone Marrow and Spleen. *PLoS One* **8**, 1–12 (2013).
  19. Baldrige, M. T., King, K. Y., Boles, N. C., Weksberg, D. C. & Goodell, M. A. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- $\gamma$  in response to chronic infection. *Nature* **465**, 793–797 (2010).
  20. Dirx, L. *et al.* Long-term hematopoietic stem cells as a parasite niche during treatment failure in visceral *Leishmaniasis*. *Commun. Biol.* **5**, 1–15 (2022).
  21. Manz, M. G. & Boettcher, S. Emergency granulopoiesis. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 302–314 (2014).
  22. Abreu, R. *et al.* Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *PLoS One* **6**, (2011).
  23. Nicolato, R. D. C. *et al.* Clinical forms of canine visceral *Leishmaniasis* in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One* **8**, (2013).
  24. Cotterell, S. E. J., Engwerda, C. R. & Kaye, P. M. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- $\alpha$ . *Blood* **95**, 1642–1651 (2000).
  25. Abidin, B. M., Hammami, A., Stäger, S. & Heinonen, K. M. Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral *Leishmaniasis*. *PLoS Pathog.* **13**, 1–26 (2017).
  26. Solcà, M. da S. *et al.* Immune response dynamics and lutzomyia longipalpis exposure characterize a biosignature of visceral *Leishmaniasis* susceptibility in a canine cohort. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **15**, 1–22 (2021).
  27. Chandrakar, P., Parmar, N., Descoteaux, A. & Kar, S. Differential Induction of SOCS Isoforms by *Leishmania donovani* Impairs Macrophage–T Cell Cross-Talk and Host Defense. *J. Immunol.* **204**, 596–610 (2020).
  28. Iwasaki, Y. *et al.* Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1-mediated IL-10 production in IL-27-stimulated CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1063–1073 (2013).
  29. Li, D. *et al.* Adrenocortical zonation factor 1 is a novel matricellular protein promoting integrin-mediated adhesion of adrenocortical and vascular smooth muscle cells. *FEBS J.* **274**, 2506–2522 (2007).
  30. Karin, M., Liu, Z. & Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Cell Regul.* **1**, 240–

- 246 (1997).
31. Keyhani, A. *et al.* In vitro and in vivo therapeutic potentials of 6-gingerol in combination with amphotericin B for treatment of *Leishmania* major infection: Powerful synergistic and multifunctional effects. *Int. Immunopharmacol.* **101**, 108274 (2021).
  32. Nandan, D., Lo, R. & Reiner, N. E. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen- activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.* **67**, 4055–4063 (1999).
  33. Olivier, M. & Gregory, D. J. Subversion Mechanisms by Which *Leishmania* Parasites Can Escape the Host Immune Response : a Signaling Point of View. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 293–305 (2005).
  34. Contreras, I. *et al.* *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription Factor AP-1 Is Mediated by the Parasite Metalloprotease GP63. *PLoS Pathog.* **6**, (2010).
  35. Chawla, M. & Vishwakarma, R. A. Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of *Leishmania* is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression. *J. Lipid Res.* **44**, 594–600 (2003).
  36. Descoteaux, A. & Matlashewski, G. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5223–5227 (1989).
  37. Antoni, F. A. The chilling of adenylyl cyclase 9 and its translational potential. *Cell. Signal.* **70**, 109589 (2020).
  38. Platzer, C. *et al.* Cyclic adenosine monophosphate-responsive elements are involved in the transcriptional activation of the human IL-10 gene in monocytic cells. *Eur. J. Immunol.* **29**, 3,098-3.104 (1999).
  39. Saha, A., Biswas, A., Supriya Srivastav, M. M., Das, P. K. & Ukil\*, A. Prostaglandin E2 Negatively Regulates the Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines and IL-17 in Visceral *Leishmaniasis*. *J. Immunol.* (2014) doi:10.4049/jimmunol.1400399.
  40. Nandan, D. *et al.* Myeloid Cell IL-10 Production in Response to *Leishmania* Involves Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Downstream of Phosphatidylinositol-3 Kinase. *J. Immunol.* **188**, 367–378 (2012).
  41. Solcà, S. *et al.* Immune response dynamics and *Lutzomyia longipalpis* exposure characterize a biosignature of visceral *Leishmaniasis* susceptibility in a canine cohort. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 1–22 (2021) doi:10.1371/journal.pntd.0009137.
  42. Espitia, C. M. *et al.* Transcriptional profiling of the spleen in progressive visceral *Leishmaniasis* reveals mixed expression of type 1 and type 2 cytokine-responsive genes. *BMC Immunol.* 1–14 (2014) doi:10.1186/s12865-014-0038-z.

## CONCLUSÃO GERAL

Em conclusão, os genes diferencialmente expressos EGR2, FOS, ADCY9 e TINAGL1 identificados em nossa análise de RNAseq fornecem insights importantes sobre a resposta do hospedeiro à infecção por *Leishmania*. Foi possível validar o gene ADCY9 por meio do método RT-qPCR, evidenciando sua importância como biomarcador na resistência à doença. Entretanto, embora os genes EGR2, FOS e TINAGL1 não tenham sido validados, eles estão envolvidos em vias cruciais na regulação imunológica do hospedeiro. Este estudo contribui para uma compreensão mais aprofundada da patogênese da leishmaniose visceral, fornecendo informações relevantes para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas e prognósticas mais eficazes.

## REFERÊNCIA

- ALVAR, J. *et al.* Canine Leishmaniasis. In: **Advances in parasitology**. v. 57, p. 1–88, 2004.
- DIAS, F. D. O. P.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373–1380, out. 2003.
- CHANG, K. P.; DWYER, D. M. *Leishmania Donovanii*. Hamster macrophage interactions in vitro: cell entry, intracellular survival, and multiplication of amastigotes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 147, n. 2, p. 515–530, 1 maio 1978.
- CONTRERAS, I. K. *et al.* Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro Clinical signs presented by *Leishmania* positive dogs in the city of Vassouras-RJ Signos clínicos apresentados por perros positivos para le. **Pubvet**, v. 13, n. a302, p. 1–6, 2019.
- CORREDOR, A. *et al.* Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 480–486, 1989.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host – pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. AUGUST, 2011.
- KRAUSPENHAR, C. *et al.* Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil TT - Visceral leishmaniasis in a dog in Cruz Alta, Rio Grande do Sul, south Brazil. **Ciênc. rural**, v. 37, n. 3, p. 907–910, 2007.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. **The leishmaniasis in biology and medicine - Evolution, classification and geographical distribution**. [s.l.: s.n.]. v. 4
- LEMOS, M.; SOUSA, O.; SILVA, Z. Perfil Da Leishmaniose Visceral No Brasil - Uma Revisão Bibliográfica. **Journal of Business and Technical Communication**, v. 9, n. 1, p. 93–114, 2019.
- LI, Z. *et al.* RNA-seq analysis of differentially expressed lncRNAs from leishmaniasis patients compared to uninfected humans. **Acta Tropica**, v. 238, n. October 2022, p. 106738, 2023.
- MAS, A. *et al.* Transcriptomic Profile of Canine DH82 Macrophages Infected by *Leishmania infantum* Promastigotes with Different Virulence Behavior. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, 2022.

NUZUM, E. et al. Diagnosis of Symptomatic Visceral Leishmaniasis by Use of the Polymerase Chain Reaction on Patient Blood. **Oxford Journal**, v. 171, n. 3, p. 751–754, 2016.

RAMPAZZO, R. DE C. P. et al. A ready-to-use duplex qPCR to detect *Leishmania infantum* DNA in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 246, n. September, p. 100–107, 2017.

SANZ, C. R. et al. Modulation of Host Immune Response during *Leishmania infantum* Natural Infection: A Whole-Transcriptome Analysis of the Popliteal Lymph Nodes in Dogs. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. January, p. 1–17, 2022.

SHADAB, M. et al. RNA-Seq Revealed Expression of Many Novel Genes Associated With *Leishmania donovani* Persistence and Clearance in the Host Macrophage. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, n. February, p. 1–19, 2019.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina Pathology and pathogenesis of canine visceral leishmaniasis. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 20–31, 2007.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. **Am. J. Trop. Med**, v. 64, n. 3, p. 119–124, 2001.

VERAS, P. S. T.; DE MENEZES, J. P. B. Using proteomics to understand how *Leishmania* parasites survive inside the host and establish infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, 2016.

WHO. Leishmaniasis: the disease and its epidemiology. Leishmaniasis Home, 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2015. WHO, 2019.