



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**RESPOSTA MEDULAR DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM *Leishmania infantum* APRESENTANDO
DIFERENTES DESFECHOS CLÍNICOS**

BRUNA MARTINS MACEDO LEITE

Salvador - Bahia

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**RESPOSTA MEDULAR DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS COM *Leishmania infantum* APRESENTANDO
DIFERENTES DESFECHOS CLÍNICOS**

BRUNA MARTINS MACEDO LEITE

Orientação: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras
Co-orientação: Dra. Deborah Bittencourt Mothé Fraga

Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós-graduação em Patologia
requisito parcial para obtenção do grau
de Doutor.

Salvador - Bahia

2021

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

L533r Leite, Bruna Martins Macedo.
Resposta medular de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos. / Bruna Martins Macedo Leite. - 2021.
93 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Patrícia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de Interação Parasito- Hospedeiro e Epidemiologia.

Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2021.

1. Leishmaniose. 2. Cão. 3. Células da Medula Óssea. 4. Células Mieloides. 4. Anemia. I. Título.

CDU 616.993.161

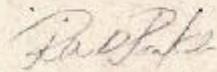
**"RESPOSTA MEDULAR DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA INFANTUM
APRESENTANDO DIFERENTES DESFECHOS CLINICOS".**

Bruna Martins Macedo Leite

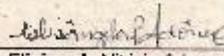
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 22 de abril de 2021.

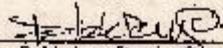
COMISSÃO EXAMINADORA



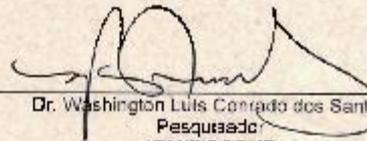
Dr. Ricardo Wagner Diaz Portela
Professor
UFBA



Dra. Elisângela Vitória Adorno
Professora
UFBA



Dr. Pablo Ivan Pereira Ramos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Washington Luis Corrêdo dos Santos
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq (Bolsa de doutorado - 154049/2016-6) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha irmã que são meu porto seguro.

A Neto por todo apoio e pela paciência.

A toda família e aos amigos que sempre estiveram presentes, apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho:

À minha orientadora, Dra. Patrícia Veras, pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos transmitidos e pelo tempo dedicado para realização do projeto.

À minha co-orientadora, Dra. Deborah Fraga, pelo tempo que também dedicou para realização desse trabalho e pelos valiosos ensinamentos.

À Dra. Cláudia Brodskyn por todos os ensinamentos e pelas enriquecedoras discussões de resultados.

À Manuela Solcà, responsável pela realização do estudo de coorte, por toda ajuda no laboratório.

Aos amigos do “grupo cão” pelo apoio no trabalho de campo, especialmente Lívia, Maiara, Matheus, Tiago e Yuri.

À Paula Dantas pelo apoio no processamento das amostras.

À Artur Queiroz pela colaboração e ajuda nas análises de bioinformática.

À Leila Amorim pela colaboração e ajuda nas análises estatísticas.

À Dra. Juliana Perrone e à Dra. Pilar Veras pelos ensinamentos.

Ao Dr. Alexandre Reis e ao Dr. Rodrigo Dian pelo apoio na padronização da citometria.

A equipe de veterinários do Centro de Controle de Zoonoses por permitirem a realização do projeto no município e por sempre nos apoiarem.

A equipe do Abrigo São Francisco de Assis por apoiarem o nosso trabalho e nos permitir coletar amostras dos cães da instituição.

Aos amigos do LaIPHE pelo apoio durante a realização do trabalho.

À equipe da plataforma de citometria, Liliane e Alan, pela ajuda nas aquisições das amostras.

Ao servidor Amaro pelas idas a campo e por toda paciência.

À Isabele pelo apoio na resolução das questões burocráticas.

À Coordenação do curso PGPAT Fiocruz / UFBA.

À equipe da Biblioteca do IGM.

À Fiocruz e ao IGM, pela infraestrutura física e pessoal, que possibilitaram a execução do projeto.

LEITE, Bruna Martins Macedo. Resposta medular de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos. 2021. 93 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021

RESUMO

INTRODUÇÃO: A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica de caráter crônico e os animais infectados podem apresentar um quadro clínico severamente debilitante ou uma forma subclínica da doença. Postula-se que a população canina infectada com *L. infantum* é composta por três grupos de hospedeiros: cães susceptíveis, cães resistentes e cães latentes. A evolução da doença depende de diversos fatores, entre eles, os mecanismos imunológicos desencadeados após a infecção. O papel que a resposta imune desempenha no contexto da progressão e controle da LVC ainda não é completamente compreendido. Existem evidências de que células mielóides estão envolvidas na promoção e manutenção da resposta inflamatória e esse tema é particularmente interessante no contexto da LVC, em que parasitas infectam diretamente os macrófagos estromais da medula óssea e essa infecção tem sido correlacionada com o aumento da mielopoiese. **OBJETIVO:** Caracterizar, quanto ao perfil imune celular, a resposta de células da medula óssea de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos. **MATERIAL E MÉTODOS:** Inicialmente foi realizada a análise longitudinal do perfil hematológico de cães resistentes e de cães susceptíveis, acompanhados em um estudo de coorte, utilizando modelos de efeitos aleatórios para dados longitudinais. Posteriormente, foram selecionados do estudo de coorte 8 cães resistentes e 8 cães susceptíveis para reavaliação e caracterização do perfil imune celular da medula óssea, utilizando mielograma e citometria de fluxo, e identificar a expressão de genes nas células da medula óssea, utilizando RNASeq. Também foram incluídos na análise 8 cães não infectados com *L. infantum*. **RESULTADOS:** Na análise longitudinal do perfil hematológico, assim como no hemograma dos cães reavaliados, as hemácias, a hemoglobina e o hematócrito foram variáveis que apresentaram taxas significativamente diminuídas em cães susceptíveis. Na avaliação do mielograma, os animais susceptíveis apresentaram principalmente hipoplasia de células eritróides e nenhuma alteração foi encontrada nos mielogramas de cães resistentes. Na imunofenotipagem por citometria de fluxo, o percentual de linfócitos T CD8 foi significativamente maior nos cães resistentes e nos cães susceptíveis, em comparação com os cães não infectados. Na análise do transcriptoma foram identificados 425 genes diferencialmente expressos (DEGs) nas amostras de cães resistentes (resistente *versus* controle) e 327 DEGs nas amostras de cães susceptíveis (susceptível *versus* controle). As análises de enriquecimento revelaram que vias relacionadas ao reparo de DNA foram negativamente reguladas nas células da medula óssea de cães susceptíveis, enquanto que vias relacionadas à migração celular foram positivamente reguladas em cães susceptíveis e em cães resistentes. Um algoritmo baseado em aprendizado de máquina foi aplicado e um conjunto de quatro genes (*EGR2*, *FOS*, *TINAGL1* e *ADCY9*) identificado, que exibem o maior poder para discriminar cães resistentes dos susceptíveis. **CONCLUSÃO:** Os cães susceptíveis apresentam alterações hematológicas na medula óssea associadas à anemia quando comparados com os cães resistentes e as análises de enriquecimento da expressão gênica mostraram que a modulação das vias de reparo de quebra dupla de DNA e de migração celular por células da medula desses cães podem estar associadas à susceptibilidade na LVC.

Palavras-chave: Leishmaniose, Cão, Resposta medular, RNA-Seq.

LEITE, Bruna Martins Macedo. Marrow response of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* with different clinical outcomes. 2021. 93 f. Thesis (Doctorate in Human and Experimental Pathology) - Federal University of Bahia. Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2021

ABSTRACT

INTRODUCTION: Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a chronic systemic disease that affects animals with two manifestations being recognized: severe debilitating and a subclinical form of the disease. It is postulated that the canine population infected with *L. infantum* is composed of three groups of hosts: susceptible, resistant and latent dogs. The progression of the disease depends on several factors, among them, the immunological mechanisms triggered after the infection. The role that the immune response plays in the context of the progression and control of CVL is not yet fully understood. There is evidence that myeloid cells are involved in the promotion and maintenance of the inflammatory response and this topic is particularly interesting in the context of CVL, in which parasites directly infect stromal bone marrow macrophages and this infection has been correlated with increased myelopoiesis.

OBJECTIVE: To characterize, in terms of the cellular immune profile, the response of bone marrow cells in dogs naturally infected with *L. infantum* with different clinical outcomes. **MATERIAL AND METHODS:** Initially, the longitudinal analysis of the hematological profile of resistant and susceptible dogs was monitored in a cohort study performed using random effects models for longitudinal data. Subsequently, 8 resistant and 8 susceptible dogs were selected from the cohort study for reassessment and characterization of the bone marrow cellular immune profile, using myelogram and flow cytometry, and to identify the expression of genes in bone marrow cells, using RNASeq. Also we included in the analysis 8 control dogs not infected with *L. infantum*.

RESULTS: In the longitudinal analysis of the hematological profile, as well as in the blood count of the reassessed dogs, red blood cells, hemoglobin and hematocrit were variables that showed a significant decrease in susceptible dogs. In the evaluation of the myelogram, susceptible animals showed mainly erythroid cell hypoplasia and no alteration was found in the myelograms of resistant dogs. In flow cytometry immunophenotyping, the percentage of CD8 T lymphocytes was significantly higher in resistant dogs and susceptible dogs, compared to uninfected dogs. In the analysis of the transcriptome, 425 differentially expressed genes (DEGs) were identified in the samples of resistant dogs (resistant versus control) and 327 DEGs in the samples of susceptible dogs (susceptible versus control). The enrichment analyzes revealed that pathways related to DNA repair were negatively regulated in the bone marrow cells of susceptible dogs, whereas pathways related to cell migration were positively regulated in susceptible dogs and in resistant dogs. An algorithm based on machine learning was applied and a set of 4 genes (*EGR2*, *FOS*, *TINAGL1* and *ADCY9*) identified, which exhibit the highest classification power to describe resistant and susceptible dogs.

CONCLUSION: Susceptible dogs show hematological changes in bone marrows associated with anemia when compared to resistant dogs, and gene expression enrichment analyses showed that modulation of DNA double-strand repair breaks and cell migration pathways by marrow cells in these dogs may be associated with susceptibility in CVL.

Keywords: Leishmaniasis, Dog, Spinal response, RNA-Seq.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES OU FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>L. infantum</i>	15
Figura 2 - Dinâmica do estudo de coorte descrito anteriormente em Solcà et al, 2021.....	28
Figura 3 - Cronograma de acompanhamento dos cães incluídos no estudo de coorte descrito anteriormente em Solcà et al, 2021 e reavaliação dos cães selecionados para o presente estudo.....	29
Figura 4 - Estratégias de <i>gate</i> que foram utilizadas no software FlowJo para analisar as aquisições por citometria de fluxo	35
Figura 5 - Frequência dos sinais clínicos observados na primeira avaliação dos cães susceptíveis e dos cães resistentes que foram selecionados a partir do estudo de coorte e avaliados novamente para caracterização da resposta de células da medula óssea.....	42
Figura 6 - Frequência dos sinais clínicos observados na segunda avaliação dos cães susceptíveis e dos cães resistentes que foram selecionados a partir do estudo de coorte e avaliados novamente para caracterização da resposta de células da medula óssea.....	43
Figura 7 - Perfis hematológicos de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> , apresentando diferentes desfechos clínicos, em comparação com os perfis de cães não infectados com <i>L. infantum</i>	44
Figura 8 - Perfis dos precursores das células da linhagem eritróide nos mielogramas de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> resistentes ou susceptíveis à infecção, em comparação com os mielogramas de cães não infectados com <i>L. infantum</i>	45
Figura 9 - Perfis dos precursores das células da linhagem mielóide nos mielogramas de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> resistentes e susceptíveis à infecção, em comparação com os mielogramas de cães não infectados com <i>L. infantum</i>	46
Figura 10 - Perfis do total de precursores das células da linhagem eritróide e da linhagem mielóide nos mielogramas de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> resistentes e susceptíveis à infecção, em comparação com os mielogramas de cães não infectados com <i>L. infantum</i>	47
Figura 11 - Perfis de células agranulocíticas nos mielogramas de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> resistentes e susceptíveis à infecção, em comparação com os mielogramas de cães não infectados com <i>L. infantum</i>	48
Figura 12 - Perfis de células hematopoiéticas analisadas por citometria de fluxo da medula óssea de cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> , resistentes e susceptíveis à infecção, em comparação com amostras de medula óssea de cães não infectados com <i>L. infantum</i>	49

Figura 13 – Correlação entre o percentual de metamielócitos quantificados por mielograma na medula óssea e o número de eosinófilos quantificados por hemograma no sangue periférico de cães classificados como resistentes.....	50
Figura 14 – Correlação entre o percentual eosinófilos quantificados por mielograma na medula óssea e o número de eosinófilos quantificados por hemograma no sangue periférico de cães classificados como susceptíveis.....	50
Figura 15 – Eletroforese em gel para avaliação da integridade do RNA das amostras de cães não infectados com <i>L. infantum</i> , cães classificados como resistentes e cães classificados como susceptíveis.....	51
Figura 16 – Diagrama de Venn comparando DEGs nas células da medula óssea de cães susceptíveis e de cães resistentes avaliada por RNASeq e analisada por edgeR.....	52
Figura 17 - Análise de enriquecimento da via dos DEGs, <i>up</i> e <i>down</i> regulados nas células da medula óssea de cães resistentes e de cães susceptíveis, utilizando o banco de dados KEGG.....	53
Figura 18 - Análise de enriquecimento da via dos DEGs, <i>up</i> e <i>down</i> regulados em células da medula óssea de cães resistentes e de cães susceptíveis, utilizando o banco de dados REACTOME.....	54
Figura 19 – Análise de enriquecimento da via dos DEGs <i>up</i> regulados em células da medula óssea de cães resistentes, utilizando o banco de dados ENRICH.....	55
Figura 20 - Análise de enriquecimento da via dos DEGs <i>down</i> regulados em células da medula óssea de cães resistentes, utilizando o banco de dados ENRICH.....	55
Figura 21 – Análise de enriquecimento da via dos DEGs <i>up</i> regulados em células da medula óssea de cães susceptíveis, utilizando o banco de dados ENRICH.....	56
Figura 22 - Análise de enriquecimento da via dos DEGs <i>down</i> regulados em células da medula óssea de cães susceptíveis, utilizando o banco de dados ENRICH.....	56
Figura 23 – Conjunto de genes identificados por algoritmo baseado em aprendizado de máquina com poder de classificação para descrever os grupos de cães resistentes, susceptíveis e não infectados com <i>L. infantum</i>	57
Figura 24 – Curva ROC para avaliar o poder de classificação dos 4 genes identificados por algoritmo baseado em aprendizado de máquina.....	58
Figura 25 – <i>Heatmap</i> dos 4 genes identificados por algoritmo baseado em aprendizado de máquina.....	59

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Alterações encontradas em hemograma e em mielograma de cães infectados com <i>Leishmania</i>	19
Tabela 2 - Marcações nas células da medula óssea dos cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i> apresentando diferentes desfechos clínicos.....	35
Tabela 3 – Caracterização realizada no <i>baseline</i> dos 29 cães acompanhados no estudo de coorte e que tiveram os exames laboratoriais incluídos na análise longitudinal do perfil hematológico de cães susceptíveis e resistentes.....	39
Tabela 4 – Caracterização dos cães susceptíveis e dos cães resistentes selecionados a partir do estudo de coorte e reavaliados para caracterização da resposta de células da medula óssea.....	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	13
1.2	AGENTE ETIOLÓGICO E O SEU CICLO DE VIDA	13
1.3	CÃO COMO RESERVATÓRIO DA LV	16
1.4	RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LVC.....	20
1.5	ESTUDOS EM LARGA ESCALA X LVC.....	22
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	25
3	OBJETIVOS	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	SELEÇÃO DOS CÃES A PARTIR DE UMA COORTE CANINA.....	27
4.2	ANÁLISE LONGITUDINAL DO PERFIL HEMATOLÓGICO DOS CÃES ACOMPANHADOS DURANTE A COORTE CANINA.....	31
4.3	REAValiaÇÃO DOS CÃES SELECIONADOS A PARTIR DO ESTUDO DE COORTE.....	31
4.4	ASPECTOS ÉTICOS.....	32
4.5	AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS CÃES.....	32
4.6	COLETA DE AMOSTRAS	32
4.6.1	<i>Sangue Total</i>	32
4.6.2	<i>Aspirado Esplênico</i>	32
4.6.3	<i>Aspirado de Medula Óssea</i>	33
4.7	DIAGNÓSTICO LVC	33
4.7.1	<i>Diagnóstico Sorológico</i>	33
4.7.2	<i>Diagnóstico Molecular</i>	33
4.7.3	<i>Diagnóstico Parasitológico</i>	34
4.8	HEMOGRAMA	34
4.9	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA	34
4.9.1	<i>Mielograma</i>	34
4.9.2	<i>Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo</i>	35
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4.11	SEQUENCIAMENTO POR RNASeq.....	36
4.12	MAPEAMENTO DOS SEQUENCIAMENTOS GERADOS POR RNASeq.....	37

4.13	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	37
5	RESULTADOS	38
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS CÃES DA COORTE	38
5.2	ANÁLISE LONGITUDINAL DO PERFIL HEMATOLÓGICO DOS CÃES DA COORTE.....	39
5.3	CARACTERIZAÇÃO DOS CÃES REAVALIADOS	40
5.4	PERFIS HEMATOLÓGICOS DOS CÃES REAVALIADOS	43
5.5	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNE CELULAR DA MEDULA ÓSSEA DOS CÃES REAVALIADOS	44
5.5.1	<i>Mielogramas</i>	44
5.5.2	<i>Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo</i>	48
5.6	CORRELAÇÃO ENTRE O MIELOGRAMA E HEMOGRAMA DOS CÃES REAVALIADOS	50
5.7	SEQUENCIAMENTO POR RNASeq	50
6.	DISCUSSÃO	60
7.	CONCLUSÃO	67
8.	REFERÊNCIAS	68
9.	ANEXO	82
9.1	FICHA CLÍNICA	82
9.2	ANÁLISES DESCRITIVAS	83
9.3	MODELOS DE EFEITOS ALEATÓRIOS.....	110
9.4	QUADRO COM TODAS AS VIAS ENRIQUECIDAS COM O BANCO DE DADOS ENRICH	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas que estão presentes nos 5 continentes e são endêmicas em 102 países (ALVAR et al., 2012; WHO, 2019a). Os agentes causadores da leishmaniose são parasitas protozoários do gênero *Leishmania* (LAISON; SHAW, 1978). A infecção por diferentes espécies de *Leishmania* pode resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas, que variam da forma clínica 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, 2019b, 2019c).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a cada ano ocorram 50 a 90 mil casos novos de Leishmaniose Visceral (LV) em todo o mundo (WHO, 2019b). No ano de 2018, mais de 95% dos novos casos notificados ocorreram em apenas 10 países: Brasil, China, Etiópia, Índia, Iraque, Quênia, Nepal, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2020).

No Brasil, a epidemiologia da LV mudou desde a década de 1980, aumentando o número de casos em associação com o aumento da urbanização (DESJEUX, 2004; NUNES et al., 2008). No ano de 1990, foram registrados 1.944 casos da doença no país, aumentando para 4.456 casos em 2017, sendo 49% dos casos registrados na região Nordeste, principalmente nos Estados do Maranhão, do Ceará e da Bahia (SINAN/SVS/MS, 2019). Esse aumento no número de casos da LV está relacionado, principalmente, aos movimentos migratórios de trabalhadores rurais, que motivados pela seca, ocuparam as periferias das grandes cidades, levando ao adensamento demográfico e às mudanças ambientais causadas pelo intenso desmatamento. Dessa forma, estas condições são propícias à adaptação do ciclo da *Leishmania* nos centros urbanos e, conseqüentemente, o surgimento de focos epidêmicos da doença (COSTA et al., 1990; DESJEUX, 2001; MENDES et al, 2002; ORTIZ, ANVERSA, 2015; SILVA et al., 2001). Atualmente, a LV está presente nas 5 regiões geográficas do país e no ano de 2017 foi notificada em 23 dos 27 estados brasileiros (SINAN/SVS/MS, 2019).

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E O SEU CICLO DE VIDA

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios, pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae

(MICHALICK, GENARO, 2005; SCHLEIN, 1993). A LV pode ser causada por espécies diferentes de *Leishmania*, dependendo da região geográfica onde ocorre. No Sudeste da Ásia e na África oriental, onde a LV é uma antroponose, o agente etiológico é a *Leishmania donovani*, enquanto que na Europa, na África Ocidental e nas Américas, a LV é uma zoonose e *L. infantum* é a principal espécie responsável por causar essa forma clínica (ALVAR et al., 2004; MICHALICK, GENARO, 2005).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são heteroxênicos e, por isso, necessitam de dois hospedeiros para realizar o seu ciclo biológico, um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado, este último representado pelo inseto vetor flebotomíneo (SCHLEIN, 1993). Na Ásia, na África e na Europa, os transmissores da LV pertencem ao gênero *Phlebotomus*, e nas Américas o *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor eficiente na transmissão da *L. infantum* (ABREU-SILVA et al., 2008; DIAS et al., 2003; MICHALICK, GENARO, 2005; SHERLOCK, 1996; SILVA et al., 2007; SOARES et al., 2010).

A transmissão da *Leishmania* ocorre através da picada de fêmeas flebotomíneas, que são hematófagas e necessitam do sangue para maturação dos seus ovos (DIAS et al., 2003). Assim, durante o repasto sanguíneo, as fêmeas infectadas regurgitam na derme do hospedeiro vertebrado a forma flagelada infectiva da *Leishmania*, denominada promastigota metaciclística (SCHLEIN, 1993). No local da picada, as formas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente neutrófilos e macrófagos (CHANG, DWYER, 1978; CUNHA, 1938; PETERS et al., 2008; SANTOS-GOMES et al., 2000). Dentro do vacúolo parasitóforo das células, as formas promastigotas se diferenciam nas formas amastigotas, as quais não tem o flagelo exteriorizado, e vão proliferar intensamente por divisão binária, levando ao rompimento das células infectadas e à liberação de amastigotas que serão fagocitadas, podendo infectar novas células (ANTOINE et al., 1990; CHANG, DWYER, 1978; KAYE, SCOTT, 2011). As células infectadas por amastigotas podem ser capturadas por uma nova fêmea flebotomínea durante o repasto sanguíneo, e no tubo digestivo do inseto vetor, as amastigotas serão liberadas e irão se diferenciar em promastigotas metaciclísticas, que serão, então, regurgitadas na derme de um novo hospedeiro vertebrado, reiniciando o ciclo biológico da *Leishmania* (SCHLEIN, 1993) (figura 1).

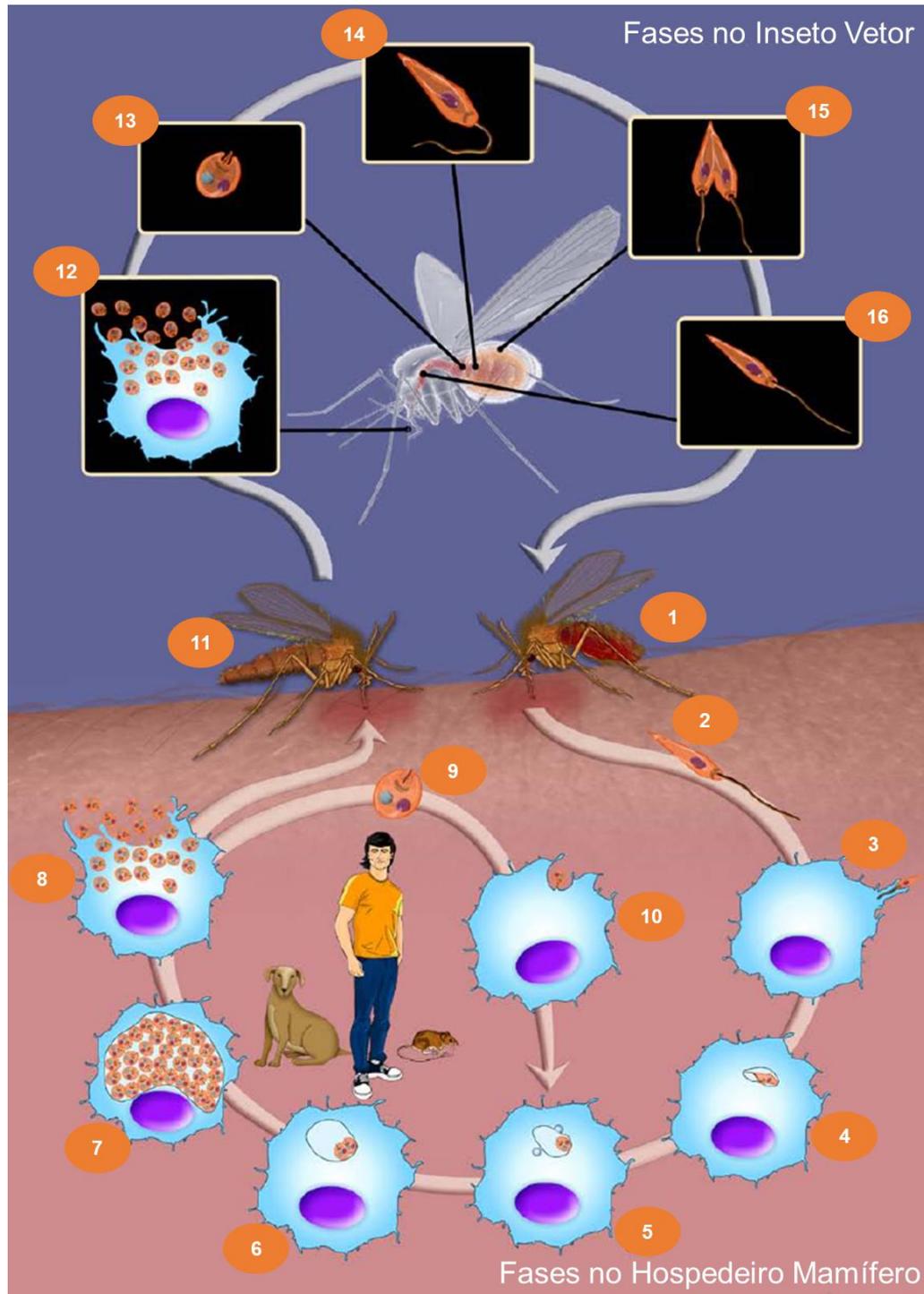


Figura 1 - Ciclo biológico de *L. infantum*. A figura representa o ciclo biológico do parasito *L. infantum* nas fases que infecta hospedeiros invertebrados e hospedeiros vertebrados. **1, 2**: formas promastigotas metacíclicas (infectantes) são regurgitadas durante o repasto sanguíneo; **3, 4**: promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear (principalmente macrófagos e neutrófilos), onde formam o vacúolo parasitóforo; **5**: promastigotas diferenciam-se em amastigotas; **6, 7**: amastigotas multiplicam-se por divisão binária; **8**: membrana da célula parasitada rompe-se e as amastigotas são liberadas; **9, 10**: amastigotas ou macrófagos infectados podem ser, respectivamente, fagocitados ou fagocitados por novas células; **11**: Amastigotas ou macrófagos infectados por amastigotas podem ser sugados por um novo vetor durante o repasto sanguíneo; **12**: inseto ingere macrófagos albergando o parasito; **13**: formas amastigotas dos parasitos são liberadas dos macrófagos no trato digestório do inseto; **14, 15, 16**: no trato digestório do inseto os parasitos transformam-se em formas promastigotas móveis e passam a se replicar, reiniciando o ciclo. Figura adaptada de TEIXEIRA *et al.*, 2013.

No Brasil, onde a LV é uma zoonose, estudos foram conduzidos com o intuito de conhecer melhor o hábito alimentar do *L. longipalpis* e identificar quais são os principais hospedeiros vertebrados da *L. infantum* (CAMARGO-NEVES et al., 2007; DIAS et al., 2003; MISSAWA et al., 2008). Observou-se que o vetor tem hábito eclético em relação à fonte alimentar, sugando sangue de aves, roedores, equinos, cães e humanos, demonstrando o grau de antropofilia do vetor (CAMARGO-NEVES et al., 2007; DIAS et al., 2003; MISSAWA et al., 2008). Camargo-Neves e colaboradores (2007) capturaram, em Araçatuba, fêmeas de *L. longipalpis* ingurgitadas e constataram que 91,4% estavam alimentadas com sangue canino e 88% das fêmeas alimentadas com sangue humano também tinham se alimentado com sangue canino, apontando para a importância do cão na cadeia da transmissão da LV.

1.3 CÃO COMO RESERVATÓRIO DA LV

Em 1956, em um estudo sobre reservatórios da *L. infantum* no estado do Ceará, Deane apontou o cão e a raposa como reservatórios naturais nas áreas de maior prevalência da LV (SILVA et al., 2007). Atualmente, evidências indicam que os cães são os principais reservatórios urbanos da *L. infantum*, sendo elas: I) presença da LVC em cerca de 50 países que são endêmicos para LV em humanos (ALVAR, et al., 2004), II) relatos de epidemias caninas precedendo temporal e espacialmente o surgimento de casos humanos (BEVILACQUA et al., 2001; SHERLOCK, 1996); III) observação de alta prevalência de LVC nas áreas endêmicas, sendo esta superior à prevalência de LV humana (BEVILACQUA et al., 2001; CAMARGO-NEVES et al., 2001; SHERLOCK, 1996; SILVA et al., 2001), IV) elevado parasitismo cutâneo observado em cães infectados com *Leishmania*, que podem levar à infecção do vetor (CUNHA, 1938; MOLINA et al., 1994; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007), V) presença de cães infectados sem sinais clínicos da doença, que não são facilmente diagnosticados, mas albergam o parasito na derme, desempenhando um papel na introdução, dispersão e manutenção da doença urbana (BORJA et al., 2016; MOLINA et al., 1994; TRAVI et al., 2001).

Nos cães, a LV é uma doença sistêmica de caráter crônico e os animais infectados com *L. infantum* apresentam um espectro dinâmico de formas clínicas, que pode variar desde uma infecção subclínica até uma doença grave, podendo esta ser fatal (BANETH et al., 1998; FISA et al., 1999; MARZOCHI et al., 1985b). Os cães que desenvolvem o quadro clínico da LVC podem manifestar uma alta variabilidade de

sinais clínicos que vão desde sinais discretos até sinais intensos e disseminados, sendo as lesões cutâneas as alterações mais frequentes, incluindo dermatite furfurácea, alopecia, hiperqueratose e úlceras (AGUIAR et al., 2007; AZEVEDO et al., 2008; CIARAMELLA et al., 1997; SILVA et al., 2017; TORRECILHA et al., 2016). No entanto, outros sinais clínicos podem ser encontrados, tais como perda de peso, conjuntivite, uveíte, onicogribose, linfadenopatia e esplenomegalia (BANETH et al., 1998; CIARAMELLA et al., 1997; SILVA et al., 2017; TORRECILHA et al., 2016).

Assim, postula-se que a população canina em áreas endêmicas é composta por três grupos: i) os cães que apresentam a doença clínica, e são denominados como susceptíveis, pois desenvolvem a LVC após a infecção, ii) os cães resistentes, que não apresentam os sinais clínicos da LVC e não irão desenvolver a doença clínica com o passar do tempo e iii) os cães que estão em fase de latência, que podem ser confundidos com cães resistentes por não apresentarem sinais clínicos, mas que na verdade são susceptíveis, contudo, foram infectados recentemente e ainda não houve tempo suficiente para desenvolverem o quadro clínico da LVC (BURATTINI et al., 1995; DYE, 1996; GRIMALDI et al., 2012). Recentemente, nossa equipe conduziu um estudo prospectivo em uma área endêmica para LV e LVC, que acompanhou, por dois anos, cães naturalmente infectados com *L. infantum*. No final do acompanhamento, classificamos esses animais em susceptíveis ou resistentes, com base em avaliações clínicas. Posteriormente, avaliamos outros parâmetros como: carga parasitária esplênica, nível sérico e a interação de mediadores biológicos e a intensidade de exposição à picada do vetor flebotomíneo. Essa análise nos permitiu identificar uma bioassinatura capaz de discriminar cães resistentes e cães susceptíveis (SOLCÀ et al., 2021).

Os cães infectados com *L. infantum* podem também apresentar alterações em parâmetros hematológicos (Tabela 1) (DE TOMMASI et al., 2014; MAIA e CAMPINO, 2018; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; NICOLATO et al., 2013; TORRECILHA et al., 2016). A alteração hematológica mais comum em cães com quadro clínico da LVC é anemia não regenerativa normocítica e normocrômica (MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; NICOLATO et al., 2013; TORRECILHA et al., 2016). A monocitopenia, a neutrofilia, a eosinopenia e a linfopenia também são achados comuns no hemograma de cães com LV (REIS et al., 2006a, 2006b; MELÉNDEZ-LAZO et al., 2018; NICOLATO et al., 2013; TORRECILHA et al., 2016). Outras alterações menos comuns

também já foram relatadas, tais como trombocitopenia e monocitose (CIARAMELLA et al., 2005; CIARLINI et al., 2008; TERRAZZANO et al., 2006).

Estudos mostram que algumas alterações hematológicas estão relacionadas às alterações que ocorrem na medula óssea dos cães com LVC (Tabela 1) (ABREU et al., 2011; NICOLATO et al., 2013). Nicolato e colaboradores (2013), em um estudo transversal com o objetivo de caracterizar alterações em hemograma e mielograma de cães infectados com *L. infantum*, mostraram que a principal alteração na medula óssea de cães com o quadro clínico da LV foi a presença de hipoplasia de células da série eritróide. Este achado se correlacionou com níveis mais baixos de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito no hemograma desses animais. Os autores também relataram que a neutrofilia em cães doentes se correlacionou com o aumento de precursores de neutrófilo na medula óssea, enquanto que a maior contagem de linfócitos na medula óssea de cães soropositivos estava associada com linfocitose no sangue periférico de cães sem os sinais clínicos da LV e à linfopenia na LVC sintomática. No entanto, os cães sem os sinais da LV apresentaram contagens normais de células do sangue periférico e da medula óssea.

Em cães adultos saudáveis, a medula óssea é o principal órgão hematopoiético, onde são armazenados precursores eritróides, mielóides e megacariocíticos (GRIDEM et al., 2020; TRAVOS, 2006). Existem poucos estudos avaliando as alterações imuno celulares que ocorrem na medula óssea de cães infectados com *L. infantum* com diferentes desfechos clínicos. Este tema é particularmente interessante no contexto da LVC, em que parasitas infectam diretamente os macrófagos estromais da medula óssea e essa infecção foi correlacionada com o aumento da mielopoiese (COTTERELL et al., 2000). Além disso, existem evidências de que em infecções crônicas, como na tuberculose experimental murina, células mielóides estão envolvidas na promoção e manutenção da resposta inflamatória (BALDRIDGE et al., 2010; MANZ, BOETTCHER, 2014; MATATALL et al., 2014). Um estudo experimental mostrou que, em camundongos, a *Leishmania* induz a expansão das células-tronco hematopoiéticas (CTH), que residem na medula óssea e que essa expansão é funcionalmente importante para patogênese da LV, já que os monócitos gerados são mais permissivos à infecção por *Leishmania* e, conseqüentemente, incapazes de eliminar parasitas em compartimentos periféricos (ABIDIN et al., 2017).

1.4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LVC

A evolução da LVC depende de diversos fatores, entre eles, os mecanismos imunológicos desencadeados no animal após a infecção (REINER E LOCKSLEY, 1995). O papel que a resposta imune desempenha no contexto da progressão e controle da doença ainda necessita ser melhor compreendido, mais precisamente, o envolvimento da inflamação na patologia da doença e na susceptibilidade à infecção (LAFUSE et al., 2013).

Em um estudo de corte transversal, foi mostrado que a gravidade clínica da LVC foi associada a modulação da produção de mediadores inflamatórios, com a diminuição gradual de LTB4 e PGE2 e um aumento de CXCL1 e CCL2. Além disso, análises de curva ROC foram realizadas para estimar de forma quantitativa a eficácia de diferentes combinações de biomarcadores em segregar cães com diferentes classificações clínicas, e mostraram que a avaliação combinada de LTB4, PGE2 e CXCL1 foi capaz de distinguir cães subclínicos de cães com LVC sintomática (SOLCÀ et al., 2016). Nossa equipe em Solcà e colaboradores (2021) mostrou que, em cães naturalmente infectados com *L. infantum* acompanhados por dois anos, o nível sérico do PGE2 foi significativamente maior nos animais classificados como susceptíveis. Além disso, mostraram que a susceptibilidade também está associada à maior carga parasitária esplênica e à persistência do parasita durante o acompanhamento, além de apresentar maior correlação entre os mediadores biológicos investigados e maior exposição à picada do inseto vetor (SOLCÀ et al., 2021). No entanto, a associação da susceptibilidade com alterações em hemograma e em células da medula óssea ainda precisa ser melhor explorada. Poucos relatos encontrados na literatura avaliaram essas alterações apenas em estudos de corte transversal, onde cães latentes podem ser erroneamente classificados como resistentes, por não apresentarem sinais clínicos no momento da avaliação clínica (ABREU et al., 2011; NICOLATO et al., 2013). Na presente tese, decidimos reavaliar por mais duas vezes, em intervalos entre 2 e 4 anos, alguns dos cães do nosso estudo de coorte, que foram previamente classificados em susceptíveis e resistentes quanto a características clínico-laboratoriais e imunológicas (SOLCÀ et al., 2021), focando na análise de parâmetros hematológicos e imunocelulares no sangue periférico e medula óssea desse subconjunto de animais.

Em relação a resposta imune adaptativa no contexto da LVC, ela parece ser complexa e o desfecho depende do *background* genético do hospedeiro. Animais que

desenvolvem a forma subclínica da LVC apresentam maior ativação de células Th1, enquanto que, a produção acentuada de anticorpos não protetores tem sido relacionada ao desenvolvimento de quadro clínico sintomático da doença em cães (PINELLI et al., 1994; REIS et al., 2006c).

Dessa forma, LVC subclínica é caracterizada por elevada produção de linfócitos T CD4, linfócitos T CD8, além de aumento na expressão de citocinas do tipo Th1, como IFN- γ , IL-2, IL-12, IFN- β e TNF- α (BRODSKYN e KAMHAWI, 2018; CARRILLO, MORENO, 2009; GIUNCHETTI et al., 2019; LEAL et al., 2014; PINELLI et al., 1994, 1995; REIS et al., 2006a). Esse tipo de resposta imune protetora compreende a ativação de macrófagos infectados pelas citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α , que resulta no principal mecanismo efetor, com eliminação da *Leishmania* por ação da produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (ASKAR et al., 2019; PINELLI et al., 2000; VOULDOUKIS et al., 1996; ZAFRA et al., 2008). O estresse oxidativo provocado pelas espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio induz danos ao DNA da *Leishmania* e o encurtamento dos seus telômeros, provocando assim a morte do parasita (DAS et al., 2001; SILVA, 2014).

Cães que apresentam quadro clínico de LVC sintomática mostram ter reação de hipersensibilidade tardia (DTH) negativa, ou seja, não apresentam resposta celular a antígenos de *Leishmania* inoculados na pele, além disso, mostram diminuição do número de monócitos, células B e células T e baixa produção de IFN- γ e IL-2 no sangue periférico (LEAL et al., 2014; PINELLI et al., 1994, 1995; REIS et al., 2006a). O perfil da produção de citocinas nos cães sintomáticos é predominantemente Th2 e estudos apontam as citocinas IL-4, TGF- β e IL-10 como biomarcadores relacionados ao desenvolvimento dos sinais clínicos (BRODSKYN e KAMHAWI, 2018). Adicionalmente, intensa proliferação de células B é observada em órgãos linfoides dos cães que desenvolvem LVC, o que explica a linfadenomegalia e a esplenomegalia presentes nesses animais (BANETH et al., 2008; GIUNCHETTI et al., 2019). A diferenciação das células B em células plasmáticas leva à acentuada produção de imunoglobulinas que não são protetoras e podem ser prejudiciais ao hospedeiro pela geração de auto-anticorpos, anticorpos anti-histona e/ou complexos imunes circulantes. Estes imunocomplexos podem se depositar em tecidos e órgãos, gerando quadros de glomerulonefrite, vasculite, uveíte, miosite e poliartrite (CORTESE et al., 2009; GINEL et al., 2008; LOPEZ et al., 1996).

A citocina pró-inflamatória TNF ativa as vias leishmanicidas que podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio por macrófagos, resultando no controle da infecção (ASKAR et al., 2019). No entanto, essa citocina está também associada à resposta inflamatória exagerada, secundária à perpetuação da resposta Th1. Em modelo murino, TNF está, adicionalmente, relacionada à ruptura da arquitetura esplênica, seguida da indução da produção de IL-10 durante estádios crônicos de infecção por *Leishmania* (ENGWERDA et al., 2002; KAYE, SCOTT; 2011; PAUN et al., 2011). A produção excessiva de oxidantes pode, adicionalmente, causar danos em componentes da célula hospedeira e de células adjacentes, principalmente no DNA (DIZDAROGLU, 1994; ROJAS et al., 1999; KOCYIGIT et al., 2005). Kocyigit e colaboradores (2005) mostraram que espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, produzidas por mononucleares do sangue de humanos com leishmaniose cutânea (LC), possuem atividade leishmanicida. Além disso, neste estudo foi identificada correlação positiva entre o aumento da concentração desses oxidantes e quebras de fita do DNA nas células mononucleares.

As células vivas possuem uma série de mecanismos que são capazes de reparar danos causados ao DNA, como o mecanismo de união de extremidade não-homóloga e o mecanismo de recombinação homóloga, que são mecanismos de reparo de quebra de fita dupla do DNA (GIGLIA-MARI et al., 2011; MEHTA e HABER, 2014). No contexto da infecção por *Leishmania*, Singh e colaboradores (2015) identificaram, em estudo proteômico, aumento da expressão de proteínas envolvidas no reparo do DNA de células de linhagem macrófágica THP-1 após 24 horas de infecção por *L. donovani*. Quebra do DNA e ativação de vias de reparo de DNA, que ocorrem nas células hospedeiras em resposta à infecção por *Leishmania*, podem influenciar na resposta imune que o hospedeiro desenvolve em resposta à infecção e, conseqüentemente, no desfecho clínico (ALTET et al., 2002; NASCIMENTO, 2016; QUINNELL et al., 2003).

1.5 ESTUDOS EM LARGA ESCALA X LVC

Estudos em larga escala, como as abordagens transcriptômicas e proteômicas, podem contribuir na compreensão mais abrangente das respostas de células e/ou de organismos, permitindo a identificação de genes ou conjuntos de genes ao mesmo tempo, frente a uma variedade de estímulos, incluindo a infecção por *Leishmania* (COWELL e WINZELER, 2019; CWIKLINSKI e DALTON, 2018; VERAS et al., 2018).

As abordagens em larga escala fornecem uma visão global e mais integrada dos processos biológicos que ocorrem em células, sendo assim, são mais eficazes no estudo da patogênese de doenças, em comparação com as abordagens que focam em moléculas individuais (VERAS e DE MENEZES, 2016; VERAS et al., 2018).

No contexto da LV, muitos estudos transcriptômicos e proteômicos focaram nos aspectos relacionados à biologia do parasita, à interação parasito-célula hospedeira e às interações parasito-hospedeiro, como os mecanismos de resposta imune, os mecanismos de resistência a drogas, a identificação de proteínas imunogênicas para o desenvolvimento de vacinas, a identificação de alvos para tratamentos quimioterápicos e a identificação de biomarcadores que possam ser aplicados no diagnóstico (ADRIAENSEN et al., 2020; ASHWIN et al., 2019; CHAPARRO et al., 2020; DEA-AYUELA et al., 2006; EJAZI et al., 2018; FORRESTER et al., 2019; KUMAR et al., 2014; KUMARI et al., 2008; LOSADA-BARRAGÁN et al. 2019; MOREIRA et al., 2014; ROJO et al., 2015; SHADAB et al., 2019; SINGH e SUNDAR, 2012, 2017; VAKILI et al., 2020). A grande maioria dos estudos que avaliaram as interações entre o parasita e o hospedeiro utilizaram modelo murino (ASHWIN et al., 2019; FORRESTER et al., 2019; LOSADA-BARRAGÁN et al. 2019; SHADAB et al., 2019; VAKILI et al., 2020) ou humano (ADRIAENSEN et al., 2020; EJAZI et al., 2018; KUMAR et al., 2014; SANTOS et al., 2015; SINGH e SUNDAR, 2012, 2017) e poucos focaram no modelo canino (BRITT et al. 2010; FRANCO-MARTÍNEZ et al., 2019, 2020; NASCIMENTO, 2016; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2017).

Em relação a abordagens transcriptômicas comparativas, um único estudo mostrou que a maior parte dos genes diferentemente expressos por células esplênicas de cães subclínicos comparado com células de cães com LVC sintomática está envolvida em processos da resposta imune, regulação da sinalização celular e interação molecular entre vários componentes celulares (NASCIMENTO, 2016).

Britt e colaboradores (2010), utilizaram uma abordagem proteômica em soro de cães naturalmente infectados com *L. infantum* e detectaram maior expressão de proteínas de fase aguda, como a proteína sérica amiloide A e a haptoglobina, em comparação com o soro de animais não infectados com *L. infantum*. Franco-Matínez e colaboradores (2020), também avaliaram o proteoma sérico de cães experimentalmente infectados, antes e depois da infecção, e identificaram modulação diferente na expressão de 74 proteínas, incluindo a cadeia alfa do complemento C8, a adiponectina, a transferrina, a esfingomielina fosfodiesterase ácida 3A e

imunoglobulinas. Adicionalmente, os autores também mostraram a modulação de vias biológicas após a infecção, como a coagulação do sangue ou o receptor do hormônio liberador de gonadotrofina, que podem ajudar na compreensão da patogênese da doença. Em outro estudo, a expressão proteica em soro de cães antes e após o tratamento da LV mostrou que 23 proteínas foram significativamente desreguladas, após o tratamento, incluindo, proteínas envolvidas em mecanismos inflamatórios, de coagulação ou de defesa (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2017).

A abordagem proteômica também foi utilizada para avaliar alterações nas proteínas da saliva de cães experimentalmente infectados, antes e após a infecção (FRANCO-MARTÍNEZ et al., 2019). O proteoma da saliva mostrou que 47 proteínas estavam diferentemente expressas nos cães infectados, após o aparecimento dos sinais clínicos, entre elas, proteínas envolvidas em atividades antioxidante, de ligação à vitamina D, com atividade catalítica, atividade de molécula estrutural e atividade transportadora. Adicionalmente, a análise de bioinformática revelou que proteínas relacionadas ao processo metabólico de carboidratos podem desempenhar um papel central na patogênese da LVC.

O escasso número de relatos de estudos que empregam o uso de técnicas em larga escala no estudo da LVC aponta para necessidade de se ampliar esses estudos para compreender melhor as interações que ocorrem entre o parasita e o hospedeiro, em especial as alterações que ocorrem nos tecidos de predileção da *L. infantum*, como a medula óssea (COTTERELL et al., 2000). As células mielóides, incluindo monócitos, células dendríticas e macrófagos, são as principais hospedeiras da *Leishmania* e desempenham um papel importante no desenvolvimento da resposta imune e, conseqüentemente, no desfecho da infecção (BALDRIDGE et al., 2010; MANZ, BOETTCHER, 2014; MATATALL et al., 2014). Assim, o objetivo do presente trabalho é caracterizar a resposta de células da medula óssea de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos e o seu impacto no sangue periférico. Hipotetizamos que cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando perfil de susceptibilidade, em comparação com aqueles resistentes, apresentam alterações em hemograma, mielograma e expressam genes relacionados à susceptibilidade nas células da medula óssea. Desse modo, cães naturalmente infectados com *L. infantum*, apresentando diferentes desfechos clínicos, foram selecionados a partir de um estudo de coorte, onde foram acompanhados por dois anos (SOLCÀ et al., 2021). Os cães selecionados foram submetidos à coleta de

medula óssea no intuito de caracterizar o perfil imune celular e identificar a expressão gênica das células presente nessa amostra.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A LV é uma doença progressiva e potencialmente fatal, e consiste em um grande problema de saúde pública, sendo responsável por cerca de 20.000 mortes e 50 a 90 mil novos casos por ano (DESJEUX, 2004; WHO, 2015; WHO, 2019b).

Nas Américas, a LV é uma zoonose, causada, principalmente, pela *Leishmania infantum* (MICHALICK, GENARO, 2005). O parasita é transmitido ao hospedeiro vertebrado pela picada de um vetor flebotomíneo infectado e é mantido nos centros urbanos por um ciclo de infecção que envolve seres humanos, o vetor flebotomíneo e vertebrados não humanos, dentre eles, o cão, que é considerado o principal reservatório urbano da *L. infantum* (ALVAR et al., 2004; BEVILACQUA et al., 2001; DYE, 1996; MARZOCHI et al., 1985a).

Os cães infectados que desenvolvem a forma clínica da doença podem manifestar uma alta variabilidade de sinais clínicos, que vão desde sinais discretos até sinais intensos e disseminados, muitos dos quais assemelham-se àqueles presentes na doença humana, sendo assim, um bom modelo para estudar a progressão da LV (GONTIJO e MELO, 2004; KOUTINAS et al., 1999; LORÍA-CERVERA e ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; MARZOCHI et al., 1985b). Esta progressão depende de diversos fatores, entre eles, a virulência do parasito, fatores genéticos associados ao hospedeiro e o tipo de resposta imune desencadeada após a infecção (REINER e LOCKSLEY, 1995). No entanto, o papel dessa resposta no contexto da progressão e contenção da LVC e da LV ainda não é completamente compreendido.

Desse modo, em um estudo de coorte prévio, realizado pela nossa equipe, cães naturalmente infectados com *L. infantum* foram bem caracterizados em relação às manifestações clínicas, perfil imunológico sérico e exposição ao vetor flebotomíneo. Essa caracterização permitiu a identificação de uma biossinatura discriminatória entre cães resistentes e cães susceptíveis e uma classificação mais precisa desses animais, com a avaliação dos diferentes parâmetros mencionados (SOLCÀ et al., 2021).

No estudo de coorte, a avaliação hematológica dos animais não foi explorada. No entanto, a compreensão da resposta das células da medula óssea parece ser central no contexto da LVC, pois esse é um dos tecidos de predileção da *L. infantum* e as células mielóides estão entre as principais células hospedeiras do parasita (BALDRIDGE et al., 2010; LAFUSE et al., 2013; MANZ e BOETTCHER, 2014; MATATALL et al., 2014). Assim, em razão da necessidade de ampliar o conhecimento sobre a importância das células da medula óssea na patogênese da doença, o objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar a resposta de células da medula óssea de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, acompanhados no estudo realizado anteriormente pela nossa equipe, e o seu impacto no sangue periférico. Hipotetizamos que cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando perfil de susceptibilidade, em comparação com aqueles resistentes, apresentam alterações em hemograma, mielograma e expressam genes relacionados à susceptibilidade nas células da medula óssea.

Assim, uma parte dos cães que foram caracterizados como susceptíveis e resistentes no estudo de coorte e permaneceram até o final do acompanhamento, foram selecionados para serem incluídos no presente estudo. Esses cães foram, então, reavaliados e aqueles que ainda apresentavam o mesmo perfil clínico, laboratorial e parasitológico foram submetidos à coleta de medula óssea no intuito de terem o perfil imune celular caracterizado. Além disso, a expressão gênica das células presentes na medula óssea desses animais foi caracterizada por RNASeq. Esse é o primeiro trabalho a utilizar uma técnica em larga escala para avaliar as alterações moleculares que ocorrem nas células da medula óssea de cães infectados apresentando diferentes desfechos clínicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a resposta de células da medula óssea de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos e o seu impacto no sangue periférico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar longitudinalmente o perfil hematológico de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos
- Caracterizar o perfil imune celular da medula óssea de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos
- Correlacionar as alterações do hemograma com o mielograma de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos
- Identificar a expressão de genes nas células da medula óssea de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos
- Identificar vias moduladas nas células da medula óssea de cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DOS CÃES A PARTIR DE UMA COORTE CANINA

Para alcançar o primeiro objetivo específico foram analisados os achados laboratoriais (hemograma) de cães acompanhados em uma coorte descrita anteriormente em Solcà et al, 2021.

Resumidamente, no estudo de coorte foram acompanhados 189 cães do município de Camaçari, Bahia, uma área endêmica para LV humana e canina (figura 2). A seleção dos cães foi feita de maneira aleatória e a avaliação em relação à LVC foi feita por meio de testes sorológicos, parasitológicos e molecular (figura 3). Os cães foram considerados positivos para LVC quando foi possível detectar anticorpos contra *Leishmania* nos dois testes sorológicos e/ou foi possível visualizar o parasita no teste parasitológico e/ou foi detectado DNA da *Leishmania* no teste molecular.

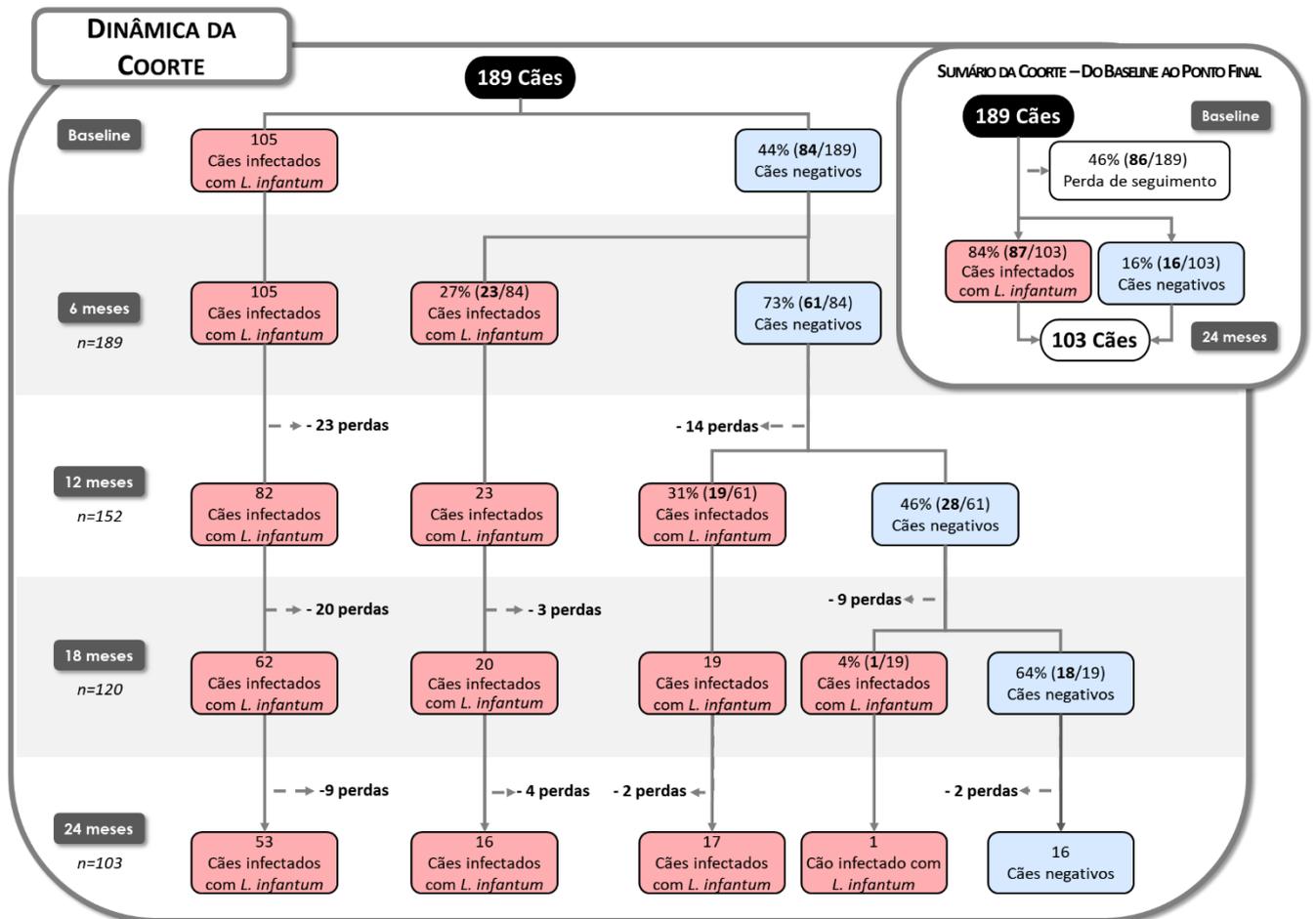


Figura 2 – Dinâmica do estudo de coorte descrito anteriormente em Solcà *et al*, 2021

No estudo de coorte, os animais foram acompanhados por dois anos (figura 3). A cada três meses foram submetidos a avaliação hematológica e a avaliação clínica, onde foram examinados de acordo com a presença e a intensidade de sinais clínicos comumente observados na LVC, tais como: estado nutricional; coloração de mucosas; dermatite periorcular; crosta e úlcera em orelha; despigmentação, hiperqueratose e lesão no focinho; alopecia; dermatite furfurácea; onicogribose; linfadenopatia e esplenomegalia (ficha clínica no anexo 9.1). Os sinais clínicos receberam uma pontuação de 0, 1 ou 2, de acordo com a intensidade da manifestação clínica. No final da avaliação, um escore clínico foi calculado com a soma das pontuações de cada sinal clínico e podia variar de 0 a 24 pontos. Adicionalmente, a cada seis meses os cães foram submetidos a testes sorológicos, parasitológico e molecular para diagnóstico da LVC.

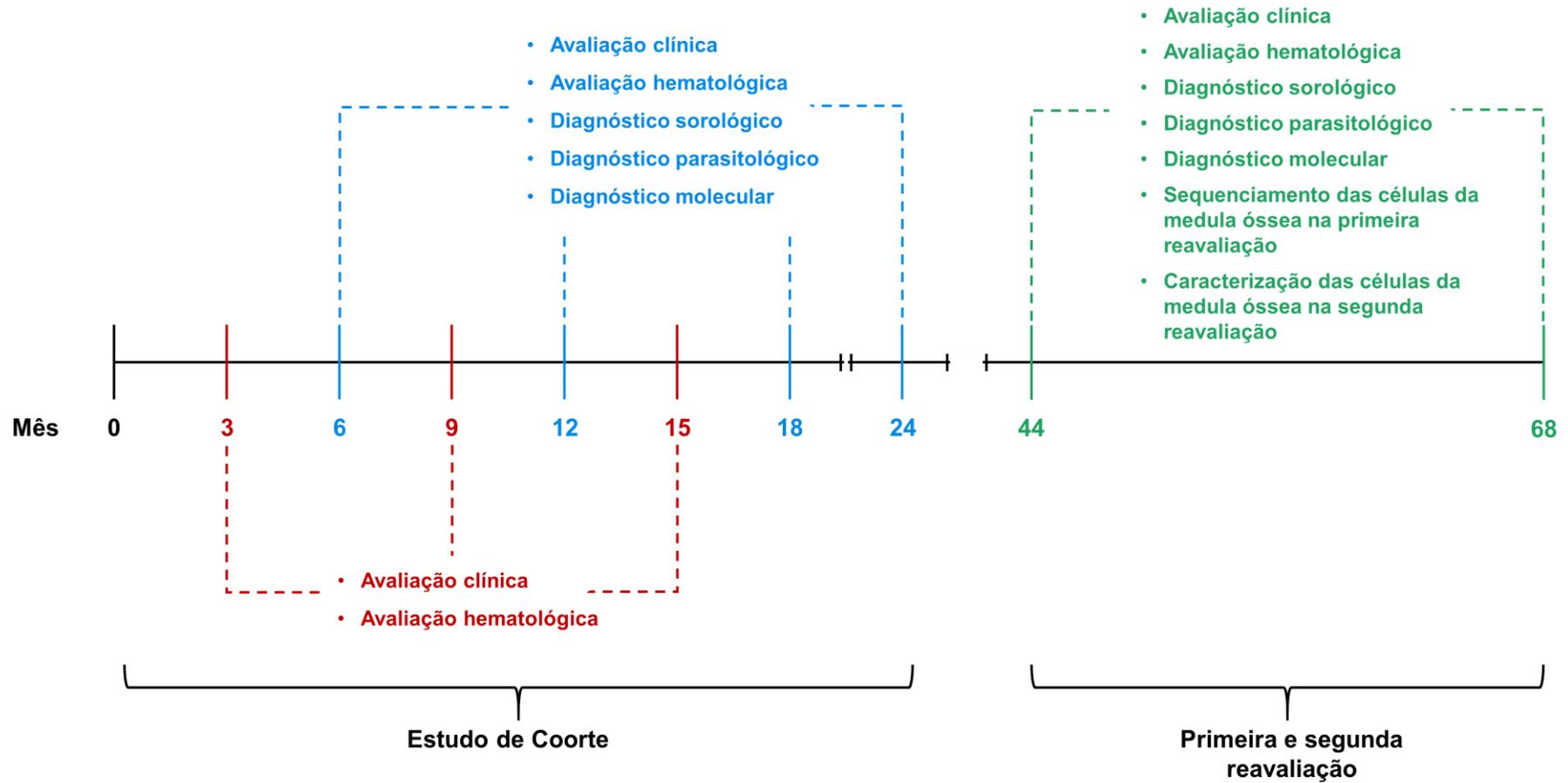


Figura 3 – Cronograma de acompanhamento dos cães incluídos no estudo de coorte descrito anteriormente em Solcà *et al*, 2021 e reavaliação dos cães selecionados para o presente estudo

No final do estudo de coorte, com base na evolução clínica ao longo do estudo, os cães que tinham pelo menos duas avaliações após o diagnóstico de infecção por *Leishmania* foram classificados em: i) susceptíveis, aqueles que, após o diagnóstico da LVC, apresentaram escore clínico >3 em dois ou mais pontos do acompanhamento e ii) resistentes, aqueles que, no momento do diagnóstico de LVC tinha escore clínico ≤ 3 e permaneceram assim ou baixaram o score ao longo do acompanhamento, ou aqueles que, no momento do diagnóstico de LVC, tinham escore >3 e, posteriormente, reduziram para ≤ 3 por duas ou mais avaliações consecutivas do acompanhamento. Posteriormente, a classificação foi validada pela avaliação de parâmetros como a carga parasitária esplênica, o nível sérico e a interação de mediadores biológicos e a intensidade de exposição à picada do vetor flebotomíneo. Assim, foi possível identificar uma bioassinatura discriminatória entre cães resistentes e cães susceptíveis, além da classificação clínica (SOLCÀ et al., 2021).

Para os exames hematológicos dos cães da coorte poderem serem utilizados para caracterização longitudinal do perfil hematológico (objetivo 1), os animais incluídos na análise tinham que apresentar os seguintes critérios: ter sido negativos para infecção por *Leishmania* na primeira avaliação (*baseline*) do estudo de coorte, terem se infectado ao longo do acompanhamento e terem sido avaliados em pelo menos um ponto após o diagnóstico da infecção por *Leishmania*. Assim, para análise longitudinal, cumpriam esses critérios 16 cães classificados como susceptíveis e 13 cães classificados como resistentes.

Para alcançar os demais objetivos, 20 meses após o final do estudo de coorte (figura 3), os proprietários dos cães classificados como susceptíveis ($n = 45$) ou como resistentes ($n = 42$), cujos animais permaneceram até o final do acompanhamento ($n = 103$), foram contatados. Os animais que ainda estavam sob a guarda desses proprietários, que não tinham sido tratados para LVC e que os tutores mostraram interesse em incluí-los no presente estudo, foram visitados e reavaliados. Assim, foi possível incluir 8 cães susceptíveis e 8 cães resistentes, que foram reavaliados. Adicionalmente, foram selecionados para compor o grupo controle cães não infectados com *L. infantum* residentes do Abrigo São Francisco de Assis, uma instituição beneficente localizada no bairro de Paripe, na cidade de Salvador, Bahia. Os cães do grupo controle apresentaram resultados negativos para LVC nos testes sorológicos e no teste molecular. Dessa forma, foram formados três grupos de cães:

i) o grupo de cães susceptíveis (n=8); ii) o grupo de cães resistentes (n=8) e iii) o grupo controle, de cães não infectados com *Leishmania* (n=8).

4.2 ANÁLISE LONGITUDINAL DO PERFIL HEMATOLÓGICO DOS CÃES ACOMPANHADOS DURANTE A COORTE CANINA

Para alcançar o primeiro objetivo específico, os dados longitudinais foram analisados no software R v.4.0.4 (Auckland, Nova Zelândia). Inicialmente foram realizadas análises descritivas univariadas e bivariadas para avaliar quais as variáveis que poderiam ser incluídas no modelo de efeitos aleatórios para dados longitudinais. Nas análises descritivas univariadas foram avaliadas as trajetórias longitudinais das variáveis hematológicas de cada animal, enquanto que nas análises descritivas bivariadas foram comparadas as trajetórias longitudinais das variáveis hematológicas em cada grupo (cães classificados como resistentes e cães classificados como susceptíveis). Nas duas análises, a trajetória longitudinal das variáveis foi avaliada pelo *Spaghetti plot*, pelas médias longitudinais e por gráficos com trajetórias suavizadas via Kernel. Posteriormente, variáveis hematológicas que aparentavam variações longitudinais, com inexistência de outliers e comportamento simétrico foram selecionadas e avaliadas em um modelo de efeitos aleatórios para dados longitudinais, para confirmar se as variações longitudinais eram estatisticamente significativas. As variáveis hematológicas que apresentaram valor absoluto da estatística $t > 2$ foram consideradas estatisticamente significativas.

4.3 REAVALIAÇÃO DOS CÃES SELECIONADOS A PARTIR DO ESTUDO DE COORTE

Após a seleção dos cães a partir do estudo de coorte (Item 4.1), os proprietários foram novamente contatados e esclarecidos quanto ao novo estudo (reavaliação dos cães) e os que concordaram em participar, assinaram um novo termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Entre os meses 44 e 68 após o início do estudo de coorte, os animais selecionados foram reavaliados por mais duas vezes (figura 3). Nas duas reavaliações, os cães foram submetidos à nova avaliação clínica (item 4.5) para confirmação da classificação clínica e à coleta de amostra de sangue total (item 4.6.1), aspirado esplênico (item 4.6.2) e aspirado de medula óssea (item 4.6.3). Os testes diagnósticos realizados durante a coorte também foram repetidos nas duas reavaliações, assim, o sangue total foi utilizado para realização do

diagnóstico sorológico (item 4.7.1) e o aspirado esplênico foi utilizado para realização do diagnóstico molecular (item 4.7.2) e parasitológico (item 4.7.3). Adicionalmente, na segunda reavaliação, o sangue total foi utilizado para realização do hemograma (item 4.8). O aspirado de medula óssea coletado na primeira reavaliação foi utilizado para realização do sequenciamento por RNASeq (item 4.11) e o coletado na segunda reavaliação foi utilizado para caracterização imune celular (item 4.9).

4.4 ASPECTOS ÉTICOS

A reavaliação dos cães foi aprovada (Protocolo nº 014/2017) pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ Bahia). Todos os proprietários que concordaram em participar do estudo assinaram novos TCLEs.

4.5 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS CÃES

A avaliação clínica dos cães foi repetida por mais duas vezes, conforme mostrado na figura 3, para a confirmação da classificação clínica desses animais. Para isso, uma equipe de médicos veterinários treinados realizou a avaliação clínica com auxílio de uma ficha clínica (anexo 9.1) contendo os sinais clínicos mais frequentes na LVC, tais como: estado nutricional; coloração de mucosas; dermatite periocular; crosta e úlcera em orelha; despigmentação, hiperqueratose e lesão no focinho; alopecia; dermatite furfurácea; onicogribose; linfadenopatia e esplenomegalia. Cada sinal clínico foi avaliado quanto a sua presença e quanto a sua intensidade. No final da reavaliação, um novo escore clínico foi calculado com a soma das pontuações de cada sinal clínico.

4.6 COLETA DE AMOSTRAS

4.6.1 *Sangue Total*

Amostras de sangue total foram coletadas por punção da veia cefálica, tibial ou jugular, em um volume máximo de 15 mL, que foi dividido e acondicionado em tubos com acelerador de coagulação e tubos com anticoagulante (EDTA) devidamente identificados e refrigerados, até o processamento no laboratório.

4.6.2 *Aspirado Esplênico*

A punção esplênica foi realizada para obtenção do aspirado seguindo a técnica descrita por Barrouin *et al.* (2006) para realização de cultura e PCR para determinar a

infecção por *L. infantum*. Para reduzir o desconforto do animal, no sítio da punção foi administrado 0,5 mL de anestesia local (cloridrato de lidocaína 1%), posteriormente, com a ajuda de um aparelho de ultrassom portátil para facilitar a localização do baço, foi realizado o aspirado esplênico com ajuda de uma seringa de 20 mL conectada a uma agulha de calibre 18. A amostra coletada foi mantida na seringa, devidamente identificada e refrigerada, até o processamento no laboratório.

4.6.3 *Aspirado de Medula Óssea*

A punção da medula óssea foi realizada no osso esterno para a obtenção do aspirado. Para reduzir o desconforto do animal foi administrado 0,5 mL de anestesia local no sítio da punção (cloridrato de lidocaína 1%). Os animais foram mantidos sentados e uma agulha de calibre 18 conectada a uma seringa de 20 mL contendo heparina 800 UI foi conduzida através da pele até a parede do osso e firmemente empurrada até a sua fixação. A entrada na cavidade óssea foi claramente percebida devido à redução da resistência oferecida pelo córtex ósseo. A amostra coletada foi mantida na seringa, devidamente identificada e refrigerada, até o processamento no laboratório.

4.7 DIAGNÓSTICO LVC

4.7.1 *Diagnóstico Sorológico*

O soro obtido através do sangue coletado foi avaliado quanto a presença de anticorpos contra *Leishmania* por meio do teste rápido (TR-DPP® LVC Bio-Manguinhos - Brasil) e do ensaio imunoenzimático (EIE® LVC Bio-Manguinhos - Brasil), ambos seguindo as recomendações do fabricante.

4.7.2 *Diagnóstico Molecular*

Para o diagnóstico molecular foram realizadas as extrações de DNA do aspirado esplênico utilizando o *kit* DNAeasy Blood&Tissue - Qiagen® (Düsseldorf, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Para a detecção do DNA de *L. infantum* foi realizada a técnica de qPCR duplex (RAMPAZZO et al, 2017), utilizando os *primers* descritos por Francino et al. (2006).

4.7.3 *Diagnóstico Parasitológico*

Para o diagnóstico parasitológico, o aspirado esplênico coletado foi cultivado em meio bifásico NNN (Neal, Novy, Nicolle) suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco® - Carlsbad, Estados Unidos). As culturas ficaram por 28 dias em estufa tipo B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) a 25 °C e foram avaliadas semanalmente em relação à presença do parasito. No final do período, não sendo identificada a presença de *Leishmania*, a cultura foi considerada negativa.

4.8 HEMOGRAMA

As amostras de sangue total armazenadas em tubos com anticoagulante foram encaminhadas a um laboratório de análises clínicas veterinárias, onde foram realizados os hemogramas completos (eritrograma, leucograma e plaquetas). Os hemogramas foram realizados de forma automatizada e os achados foram confirmados em lâminas.

No eritrograma foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, hematócrito (HT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), metarrubricitos e a amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW). No leucograma foram avaliados a contagem de: leucócitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes, metamielócitos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

4.9 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA

4.9.1 *Mielograma*

O mielograma foi realizado no intuito de avaliar se existem diferenças morfológicas e nas proporções dos tipos de células mielóides de cães susceptíveis e resistentes e avaliar a presença de células infectadas. Para isso, os esfregaços dos aspirados de medula óssea foram corados com Wright-Giemsa e encaminhados à um laboratório de análises clínicas veterinárias, onde foram examinados no microscópio óptico. Alterações eritropoiéticas e leucopoiéticas foram avaliadas por contagem diferencial de 500 células. Os resultados foram apresentados seguindo a nomenclatura descrita por Harvey, 2012.

4.9.2 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

Na imunofenotipagem, anticorpos monoclonais específicos anti-receptores de células caninas conjugados com fluorocromos foram utilizados para analisar qualitativa e quantitativamente os padrões de expressão de antígenos de tipos celulares (chamados de “clusters of differentiation”), sendo eles: anti-CD34 (Bio-Rad - Califórnia, Estados Unidos), anti-CD45 (Bio-Rad - Califórnia, Estados Unidos), anti-CD14 (Bio-Rad - Califórnia, Estados Unidos), anti-CD4 (Abcam - Cambridge, Reino Unido) e anti-CD8 (Abcam - Cambridge, Reino Unido) (Tabela 2).

As células coradas foram adquiridas por citometria de fluxo no citômetro de fluxo BD LSRFortessa (Nova Jersey, Estados Unidos) e analisadas usando o software FlowJo X v.10.0.7r2 (Oregon, Estados Unidos). A figura 4 mostra as estratégias de *gate* que foram utilizadas para a análise.

Tabela 2 - Marcações nas células da medula óssea dos cães naturalmente infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos

Células marcadas	Marcação
Células progenitoras hematopoiéticas	CD34 ⁺ CD45 ⁺
Monócitos	CD14 ⁺
Linfócitos T CD4	CD4 ⁺
Linfócitos T CD8	CD8 ⁺

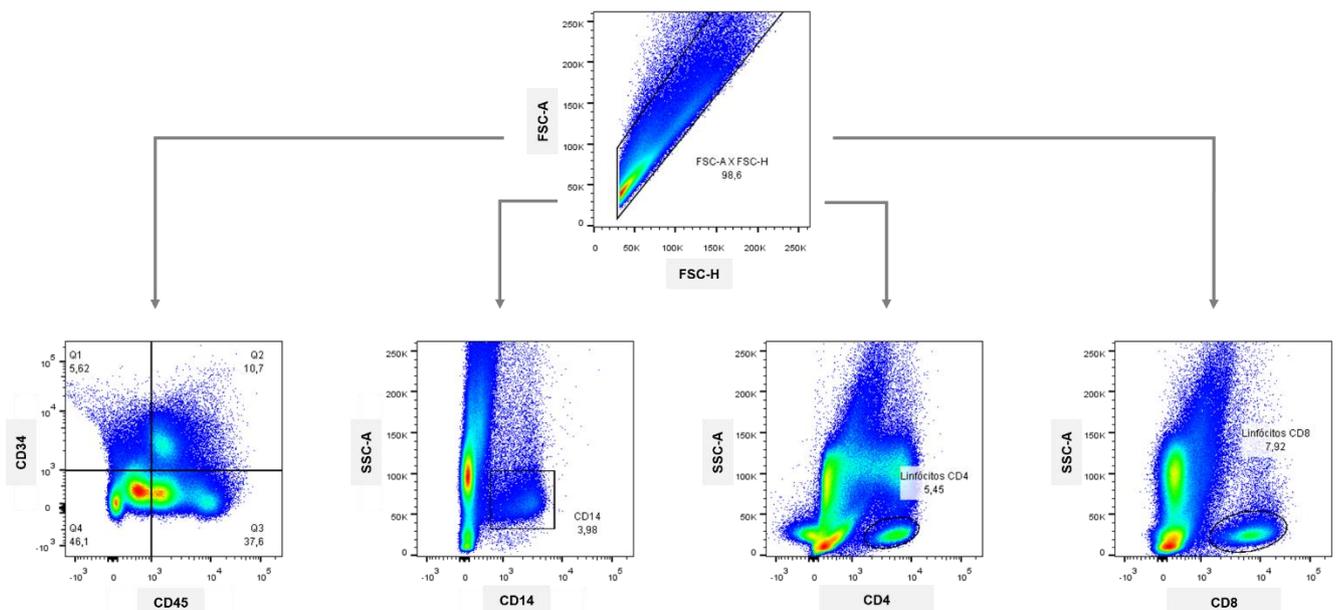


Figura 4 – Estratégias de *gate* que foram utilizadas no software FlowJo para analisar as aquisições por citometria de fluxo

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos parâmetros hematológicos, dos mielogramas e da citometria de fluxo foram analisados no GraphPad Prism v.7.04 (Califórnia, Estados Unidos) e no R v.4.0.4. Os resultados foram comparados entre os grupos de cães susceptíveis e resistentes e cães não infectados com *L. infantum* e, assim, foi usado para avaliar se há diferenças na distribuição entre as células mielóides destes cães em relação aos cães do grupo controle. A distribuição dos dados foi analisada no GraphPad pelos testes D'Agostino & Pearson, Shapiro-Wilk e Kolmogorov–Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram comparados entre os grupos por One-way ANOVA, seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey, enquanto que, os dados com distribuição não-paramétrica foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Conover-Iman, que foi o único teste realizado no R 4.0.4.

Os achados do mielograma foram correlacionados com os achados do hemograma, usando a correlação de Spearman para os dados com distribuição não-paramétrica e correlação de Pearson para os dados com distribuição paramétrica.

Em todas as análises foi considerada a significância de 5%.

4.11 SEQUENCIAMENTO POR RNASeq

O aspirado de medula óssea coletado foi armazenado em RNAlater (Thermo Fisher Scientific - Massachusetts, EUA) e congelado a -70 °C, até o momento da extração do RNA total.

A extração do RNA total e o sequenciamento foram realizados por uma empresa especializada, a Omega Bioservices (Geórgia, EUA). O RNA total foi extraído utilizando colunas de purificação do E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit II da Omega Bio-Tek (Geórgia, EUA). Antes da preparação da biblioteca para o sequenciamento, devido à alta contaminação com RNA ribossomal (rRNA) e RNA mensageiro (mRNA) de globina (presença de hemácias), foi realizada uma depleção destes RNAs contaminantes utilizando pérolas magnéticas ribo-zero (Life Technologies - Carlsbad, Califórnia, EUA). A integridade e quantificação do mRNA foi confirmada por eletroforese (Agilent tapestation) e por espectrofotometria utilizando o aparelho de NanoDrop, respectivamente. A biblioteca de cDNA foi construída utilizando o Kit Illumina TruSeq Stranded Total RNA (Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para o sequenciamento foi utilizada a plataforma HiseqX10 (Illumina - Califórnia, EUA).

Posteriormente, os arquivos FASTQ com os dados brutos foram disponibilizados para *download* no portal da Illumina Basespace.

4.12 MAPEAMENTO DOS SEQUENCIAMENTOS GERADOS POR RNASeq

As bases de baixa qualidade foram removidas e os adaptadores foram cortados usando o Trimmomatic V0.36 (Jülich, Alemanha). Após a verificação da qualidade, as sequências foram alinhadas ao transcriptoma de referência do cão (*Canis lupus familiaris*, versão CanFam3.1) utilizando o Salmon v1.2.1 (Boston, EUA). Não foi encontrado transcriptoma de *Leishmania*.

4.13 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Após o mapeamento dos sequenciamentos gerados a partir das amostras de aspirado de medula óssea dos cães classificados como susceptíveis, resistentes e dos cães não infectados com *L. infantum*, os dados brutos foram implementados em linguagem R. Todas as análises foram realizadas no R 4.0.0.

Assim, os dados foram convertidos em tabelas de contagem com o pacote tximport. A matriz de expressão gênica de contagem foi examinada pelo pacote edgeR para identificar genes diferentemente expressos após a comparação de: i) amostras de cães classificados como resistentes *versus* amostras de cães não infectados com *L. infantum*; ii) amostras de cães classificados como susceptíveis *versus* amostras de cães não infectados com *L. infantum*. As alterações nos níveis de expressão gênica foram consideradas significativas quando os valores estatísticos dos testes (valor de *p* ajustado ao FDR) foram menores que 0,05 e os valores de *fold-change* (FC) foram $1,4 \leq FC \leq -1,4$. Os genes diferentemente expressos candidatos foram visualizados em um diagrama de Venn com o pacote VennDiagram.

Análises de enriquecimento de anotação de ontologia gênica (*Gene Ontology* – GO) foram realizadas a partir da lista de genes diferentemente expressos utilizando os bancos de dados das vias REACTOME e KEGG usando o pacote compareCluster. Adicionalmente, foi utilizado também o banco de dados da via de processos biológicos do ENRICH (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>), que contém uma grande coleção de diversas bibliotecas de conjuntos de genes (Kuleshov et al., 2016). O REACTOME é um banco de processos biológicos humanos com curadoria e revisado por pares, que fornece detalhes moleculares de transdução de sinal, transporte, replicação de DNA, metabolismo e outros processos celulares como uma rede

ordenada de transformações moleculares em um único modelo de dados consistente (Bijay Jassal et al., 2020; Joshi-Tope et al., 2005). O KEGG é uma enciclopédia de genes e genomas, utilizada para análise sistemática das funções dos genes, ligando a informação genômica com a informação funcional (Kanehisa e Goto, 2000).

Após as análises de enriquecimento de anotação de ontologia gênica, a tabela de contagem foi contada por milhão de log normalizado, com o pacote DESeq e edgeR. Os dados foram avaliados para identificar amostras de *outliers* com análise de agrupamento usando o pacote *stats*. Este pacote foi utilizado para correlacionar os módulos genéticos correlatos identificados com as características informadas nos metadados. Um algoritmo Random Forest baseado em aprendizado de máquina foi aplicado para identificar o conjunto mínimo de genes que exibem o maior poder de classificação para descrever os grupos de cães classificados como resistentes, susceptíveis e não infectados com *L. infantum*, com o pacote *randomForest*. As variáveis (genes) superiores ao 3º quartil no Random Forest foram utilizadas para avaliar o poder de classificação. A precisão do modelo de gene (com base no resultado do aprendizado de máquina) foi avaliada usando a curva ROC (Receiver Operating Characteristic). Adicionalmente, os valores log-cpm foram plotados em um *heatmap* para verificar o agrupamento da amostra com base nesses valores.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS CÃES DA COORTE

No *baseline* do estudo de coorte, os animais foram caracterizados quanto ao sexo, a idade, a raça e o porte. Os dados descritivos dos cães que cumpriam os critérios para utilização dos exames laboratoriais para análise longitudinal do perfil hematológico estão mostrados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas entre as características dos cães susceptíveis e dos cães resistentes (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização realizada no *baseline* dos 29 cães acompanhados no estudo de coorte e que tiveram os exames laboratoriais incluídos na análise longitudinal do perfil hematológico de cães susceptíveis e resistentes

Características dos cães	Cães susceptíveis	Cães resistentes	p valor
	(N = 16) n (%)	(N = 13) n (%)	
Sexo			
Fêmea	9 (56,25)	9 (69,2)	0,70
Macho	7 (43,75)	4 (30,8)	
Idade estimada			
Filhote (0-1 ano)	4 (25)	2 (15,4)	0,56
Jovem (1-2 anos)	6 (37,5)	5 (38,5)	
Adulto jovem (3-4 anos)	4 (25)	4 (30,7)	
Adulto (5-7 anos)	2 (12,5)	2 (15,4)	
Raça			
Mestiça	14 (87,5)	11 (84,6)	1
Pura	2 (12,5)	2 (15,4)	
Porte			
Pequeno (4-10 kg)	0	2 (15,4)	0,32
Médio (11-20 kg)	10 (62,5)	6 (46,1)	
Grande (21-40 kg)	4 (25)	5 (38,5)	
Gigante (>40 kg)	2 (12,5)	0	

Sexo e raça: teste exato de Fisher; Idade estimada e porte: qui-quadrado de tendência

Em relação aos testes diagnósticos para LVC, como mencionado anteriormente, todos os animais que tiveram os exames hematológicos selecionados para análise longitudinal eram negativos para infecção por *Leishmania* no *baseline* do estudo de coorte e se infectaram ao longo do acompanhamento. Entre os cães susceptíveis, 10 (62,5%) se tornaram positivos para LVC 6 meses após o início da coorte, 2 (12,5%), após 9 meses, e 4 (25%), após 12 meses de acompanhamento. Entre os cães resistentes, 3 (23,1%) se tornaram positivos para LVC 6 meses após o início da coorte, 2 (15,4%) após 9 meses, 7 (53,8%) após 12 meses e 1 (7,7%) após 18 meses de acompanhamento.

5.2 ANÁLISE LONGITUDINAL DO PERFIL HEMATOLÓGICO DOS CÃES DA COORTE

Para avaliação longitudinal do perfil hematológico dos cães da coorte, inicialmente, foram realizadas análises descritivas univariadas e bivariadas para avaliar, respectivamente, a trajetória longitudinal das variáveis hematológicas

individuais de cada animal e de cada grupo (resistentes e susceptíveis) (anexo 9.2). Com base nas análises descritivas, foram selecionadas para serem incluídas no modelo de efeitos aleatórios as variáveis hematológicas que apresentavam variações longitudinais, com inexistência de *outliers* e comportamento simétrico, sendo elas: hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, segmentados, linfócitos e monócitos.

Nos modelos de efeitos aleatórios (anexo 9.3), as hemácias, a hemoglobina e o hematócrito foram as variáveis que tiveram diferenças estatisticamente significantes entre os cães resistentes e os cães susceptíveis. As hemácias tiveram um coeficiente de -0,69818, o que significa que em cada ponto do acompanhamento, houve uma diminuição de 0,70 milhões/mm³ na contagem de hemácias no grupo dos cães susceptíveis, em relação aos cães resistentes. A hemoglobina teve um coeficiente de -2,16261 e o hematócrito de -5,74892, o que significa que em cada ponto do estudo de coorte, a quantidade de hemoglobina e o hematócrito diminuiu 2,16 g/dL e 5,75 % no grupo dos cães susceptíveis, em relação aos cães resistentes.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS CÃES REAVALIADOS

Para alcançar os demais objetivos, foram reavaliados 8 cães susceptíveis e 8 cães resistentes, selecionados a partir do estudo de coorte, mas não necessariamente os mesmos cães que tiveram seus exames laboratoriais incluídos na análise longitudinal (item 5.2), já que, nem todos os animais permaneceram até o final do estudo de coorte e esse era um dos critérios para reavaliação dos cães (item 4.1).

Os cães reavaliados foram submetidos a duas coletas de aspirado de medula óssea, para caracterização imune celular e realização do RNASeq e, no momento de cada coleta, passaram por nova coleta de amostra de sangue total e de aspirado esplênico para realização dos testes diagnósticos e exames laboratoriais, além de adicional avaliação clínica para confirmação do desfecho clínico que foi determinado no final do estudo de coorte. O desfecho clínico foi confirmado em todos os animais reavaliados, no grupo dos susceptíveis e no grupo dos resistentes.

Na tabela 4 encontram-se os dados descritivos dos cães susceptíveis e resistentes reavaliados, com a idade dos animais estimada na segunda reavaliação. Um animal do grupo dos resistentes não foi avaliado no segundo ponto, pois veio a óbito durante o parto, segundo relato do tutor. Não foram observadas diferenças

significativas entre as características dos cães susceptíveis e dos cães resistentes (tabela 4).

Tabela 4 – Caracterização dos cães susceptíveis e dos cães resistentes selecionados a partir do estudo de coorte e reavaliados para caracterização da resposta de células da medula óssea

Características dos cães	Cães susceptíveis	Cães resistentes	p valor
	(N = 8)	(N = 7)	
	n (%)	n (%)	
Sexo			
Fêmea	5 (62,5)	5 (71,4)	1
Macho	3 (37,5)	2 (28,6)	
Idade estimada			
Adulto (5-7 anos)	3 (37,5)	2 (28,6)	1
Idoso (> 8 anos)	5 (62,5)	5 (71,4)	
Raça			
Mestiça	8 (100)	6 (85,7)	0,47
Pura (Labrador)	0	1 (14,3)	
Porte			
Pequeno (4-10 kg)	1 (12,5)	2 (28,6)	0,93
Médio (11-20 kg)	4 (50)	1 (14,3)	
Grande (21-40 kg)	3 (37,5)	4 (57,1)	

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

Em relação aos testes diagnósticos, na primeira reavaliação, 50% (4/8) dos cães susceptíveis foram positivos nos testes sorológicos e em 37,5% (3/8) foi possível visualizar a *Leishmania* na cultura do aspirado esplênico. No grupo de cães resistentes, 12,5% (1/8) dos animais foram positivos nos testes sorológicos e em 12,5% (1/8) foi possível visualizar a presença do parasito no teste parasitológico. O DNA de *L. infantum* não foi detectado em amostras de aspirado esplênico. Na segunda reavaliação, 50% (4/8) dos cães susceptíveis foram positivos nos testes sorológicos, em 12,5% (1/8) foi possível visualizar a *Leishmania* na cultura do aspirado esplênico e em 25% (2/8) foi possível detectar o DNA de *L. infantum* no aspirado esplênico. No grupo de cães resistentes, 28,6% (2/7) dos animais foram positivos nos testes sorológicos e em 14,3% (1/7) foi possível visualizar a presença do parasito no teste parasitológico e detectar o DNA de *L. infantum* no aspirado esplênico.

Na primeira reavaliação clínica, a linfadenopatia e dermatite furfurácea estavam presentes em 100% (8/8) dos cães susceptíveis, enquanto que, apenas 25% (2/8) dos

cães resistentes apresentaram linfadenopatia e nenhum apresentou dermatite furfurácea (figura 5). Entre os cães resistentes, a onicogribose estava presente em 50% (4/8) dos animais e foi o sinal clínico mais frequente (figura 5). Na segunda reavaliação clínica, a linfadenopatia permaneceu como o sinal clínico mais frequente entre os cães susceptíveis, estando presente em 75% (6/8) dos cães, assim como a onicogribose e a esplenomegalia, e a onicogribose permaneceu como o sinal clínico mais frequente entre os cães resistentes, estando presente em 57% (4/7) dos cães (figura 6).

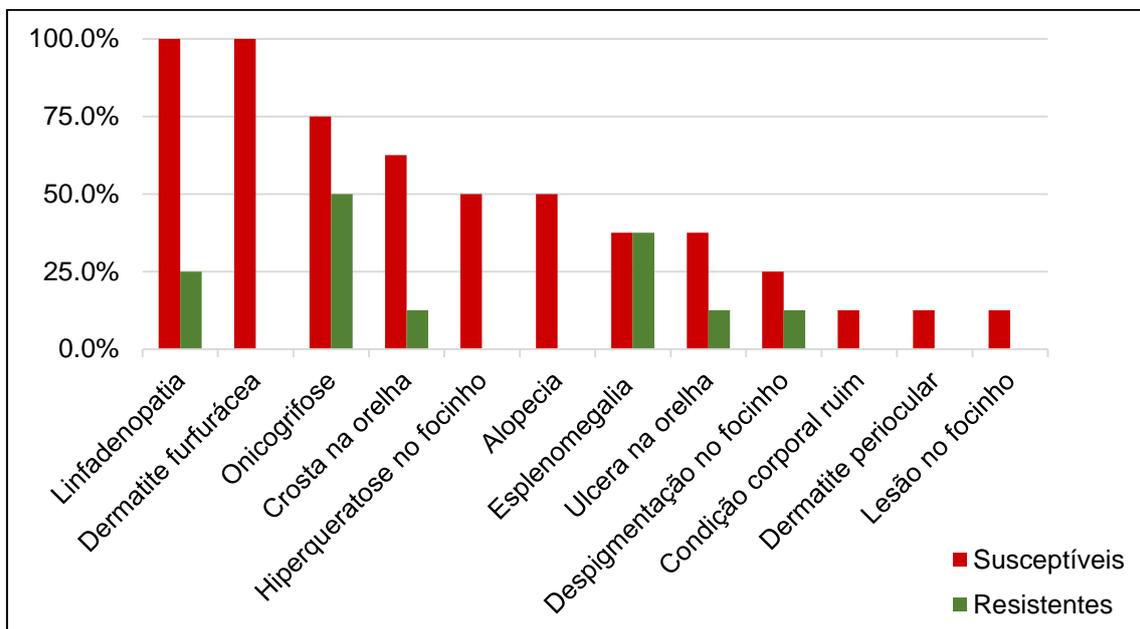


Figura 5 – Frequência dos sinais clínicos observados na primeira reavaliação dos cães susceptíveis e dos cães resistentes que foram selecionados a partir do estudo de coorte e reavaliados para caracterização da resposta de células da medula óssea.

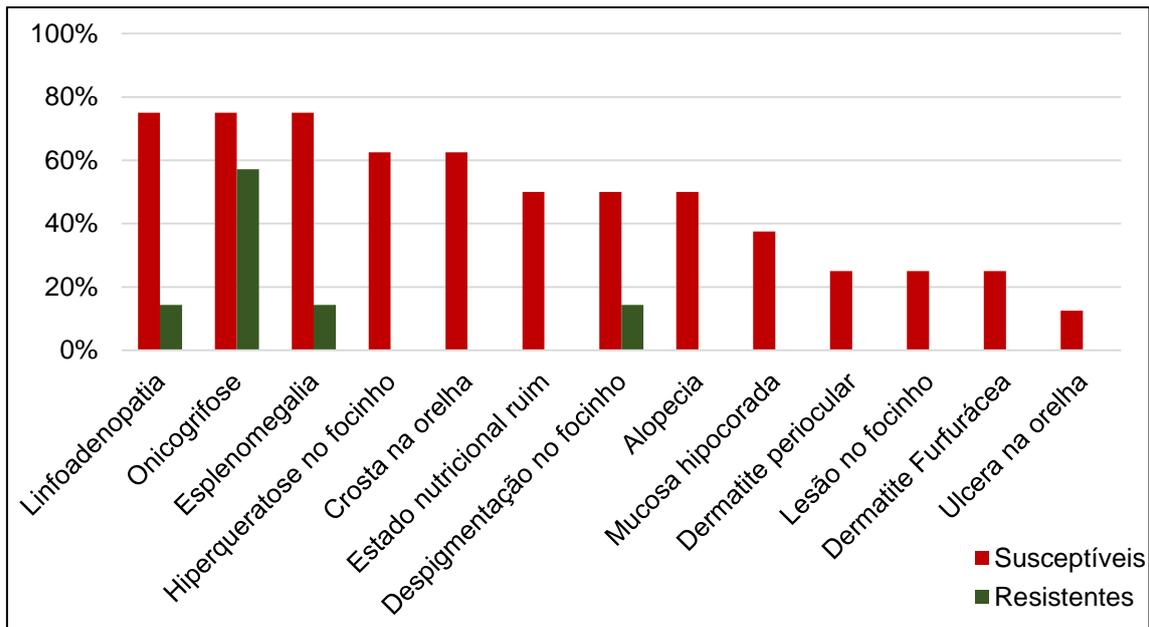


Figura 6 – Frequência dos sinais clínicos observados na segunda reavaliação dos cães susceptíveis e dos cães resistentes que foram selecionados a partir do estudo de coorte e reavaliados para caracterização da resposta de células da medula óssea.

5.4 PERFIS HEMATOLÓGICOS DOS CÃES REAVALIADOS

Na análise dos parâmetros hematológicos, a contagem de hemácias, a dosagem de hemoglobina e o hematócrito (Ht) foram significativamente diminuídos nos cães susceptíveis, em comparação com os achados nos cães resistentes e nos cães não infectados com *L. infantum* (figura 7). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na contagem de leucócitos, segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas (figura 7).

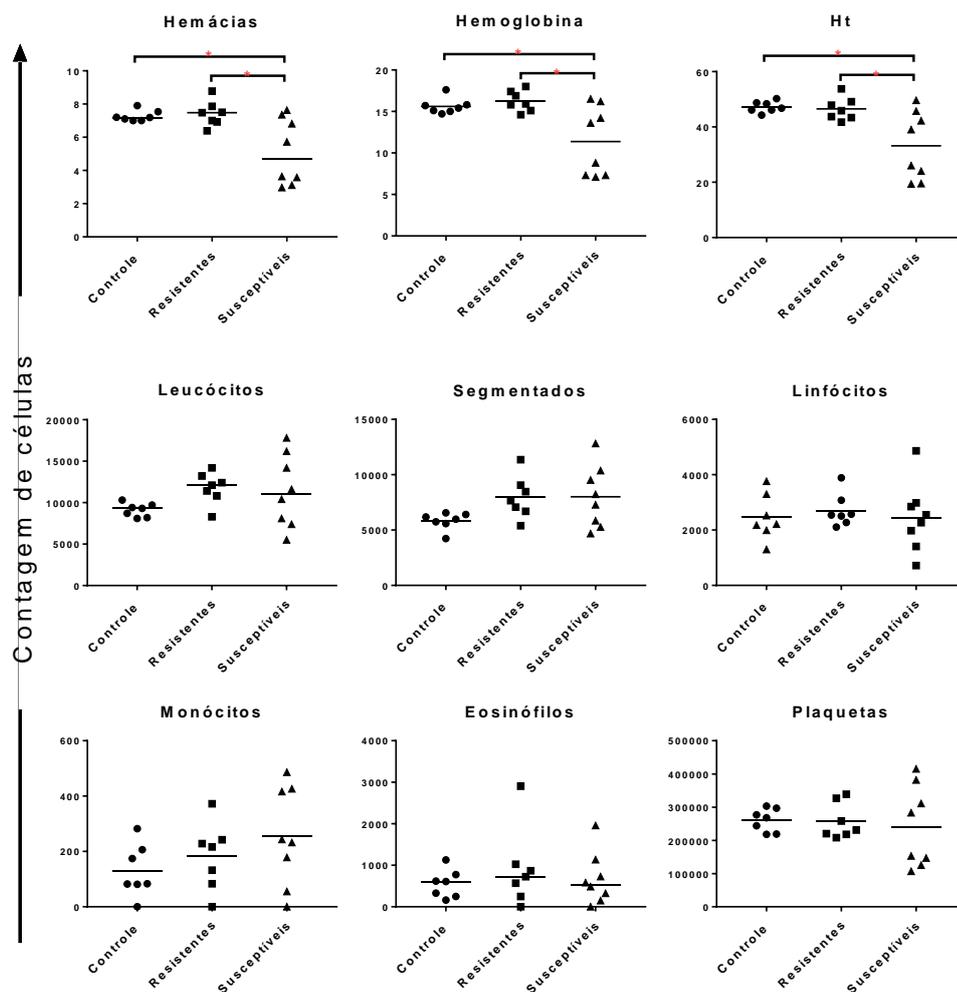


Figura 7 – Perfis hematológicos de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, apresentando diferentes desfechos clínicos, em comparação com os perfis de cães não infectados com *L. infantum*. Hemoglobina, Ht, segmentados, linfócitos, monócitos e plaquetas tiveram distribuição paramétrica e as médias foram comparadas entre os grupos por One-way ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. Hemácias, leucócitos e eosinófilos tiveram distribuição não-paramétrica e as medianas foram comparadas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Conover-Iman. * $p < 0,05$

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNE CELULAR DA MEDULA ÓSSEA DOS CÃES REAVALIADOS

5.5.1 Mielogramas

Após a reavaliação clínica, laboratorial e parasitológica, a avaliação do mielograma revelou que, em relação à análise das células da linhagem eritróide (figura 8), a contagem de rubriblatos foi significativamente maior para os cães susceptíveis, comparada àquela para cães não infectados com *L. infantum* e cães resistentes. A contagem de prorrubríctos foi significativamente maior nos mielogramas dos cães

resistentes, em comparação com os dos cães susceptíveis e com os dos cães não infectados com *L. infantum*. Não houve diferença na contagem de rubrícitos.

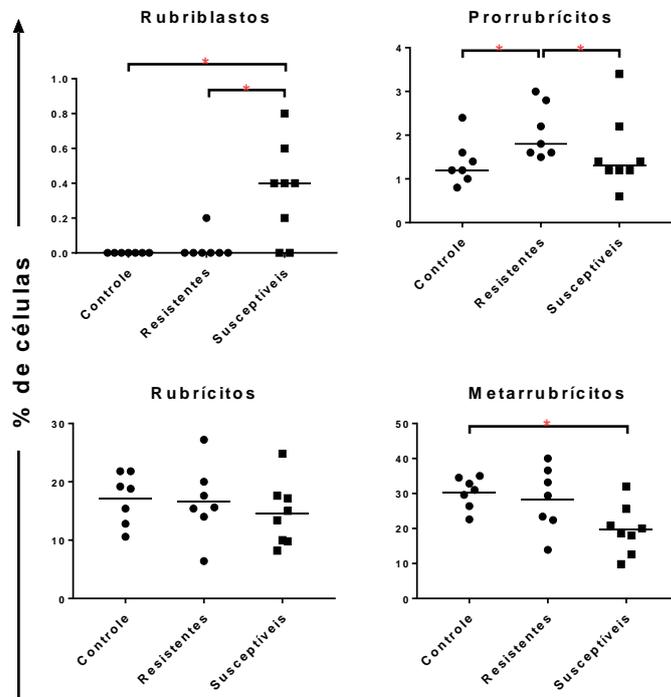


Figura 8 - Perfis dos precursores das células da linhagem eritróide nos mielogramas de cães naturalmente infectados com *L. infantum* resistentes ou susceptíveis à infecção, em comparação com os mielogramas de cães não infectados com *L. infantum*. O percentual dos precursores foi calculado com base na contagem diferencial de 500 células. Rubrícitos e metarrubrícitos tiveram distribuição paramétrica e as médias foram comparadas entre os grupos por One-way ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. Rubriblastos e prorrubrícitos tiveram distribuição não-paramétrica e as medianas foram comparadas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Conover-Iman. * $p < 0,05$

A análise das células da linhagem mielóide no mielograma dos animais do estudo (figura 9) revelou que, a contagem de mieloblastos e de bastonetes foram significativamente maiores nos mielogramas dos cães susceptíveis, em comparação com os dos cães não infectados com *L. infantum*, enquanto que, a contagem de promielócitos foi significativamente maior nos mielogramas dos cães resistentes, em comparação com os dos cães não infectados com *L. infantum*. A contagem de eosinófilos foi significativamente maior nos mielogramas dos cães resistentes e dos cães susceptíveis, em comparação com os dos cães não infectados com *L. infantum*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na contagem de mielócitos, metamielócitos e neutrófilos segmentados.

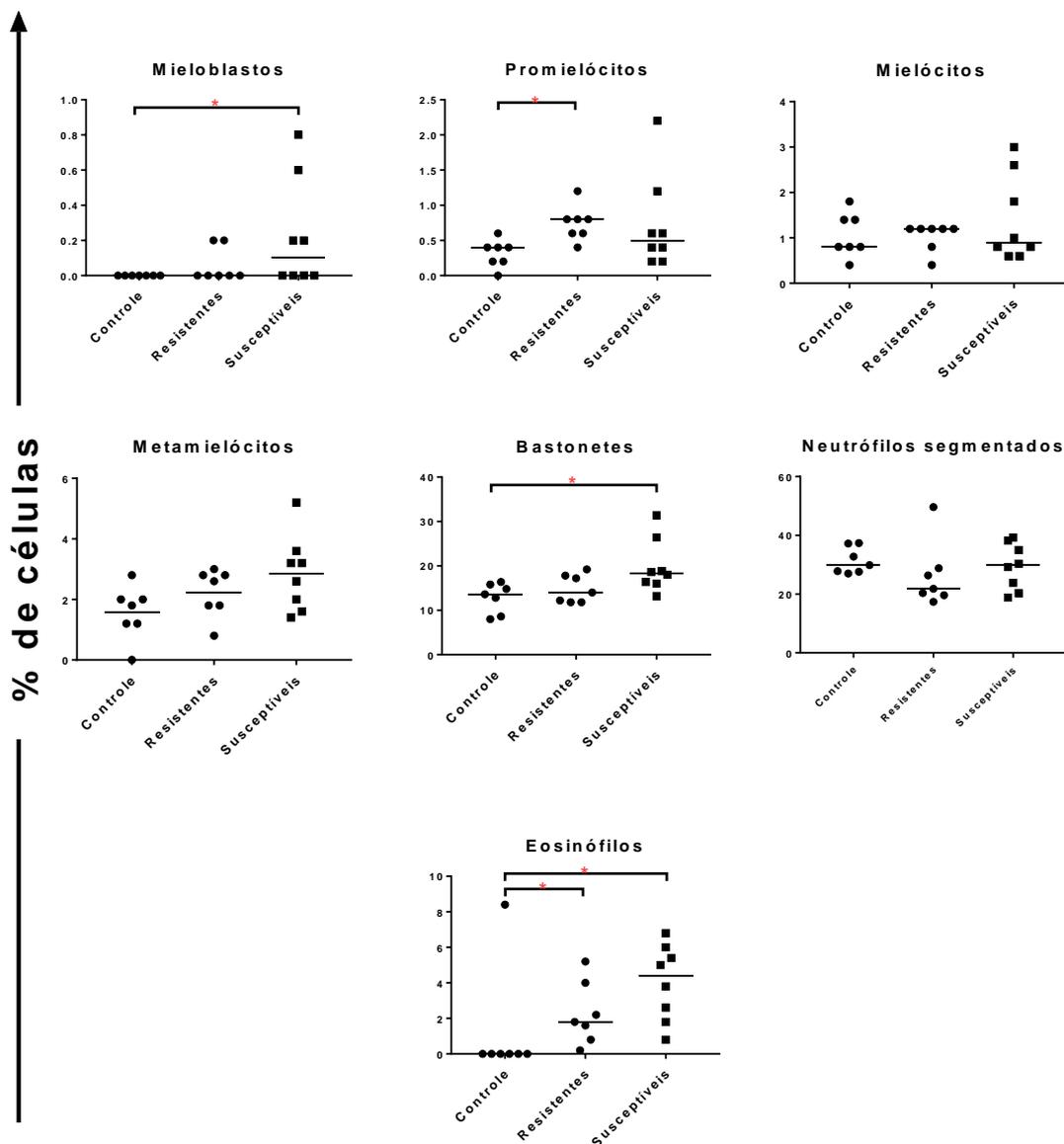


Figura 9 - Perfis dos precursores das células da linhagem mielóide nos mielogramas de cães naturalmente infectados com *L. infantum* resistentes e susceptíveis à infecção, em comparação com os mielogramas de cães não infectados com *L. infantum*. O percentual dos precursores foi calculado com base na contagem diferencial de 500 células. Metamielócitos tiveram distribuição paramétrica e as médias foram comparadas entre os grupos por One-way ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. Mieloblastos, promielócitos, mielócitos, bastonetes, neutrófilos segmentados e eosinófilos tiveram distribuição não-paramétrica e as medianas foram comparadas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Conover-Iman. * $p < 0,05$

Em relação ao total de células da linhagem eritróide e o total de células da linhagem mielóide contadas no mielograma (figura 10), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No entanto, a razão entre as células mielóides e as células eritróides (razão M:E) foi significativamente maior nos mielogramas dos cães susceptíveis, em comparação com os dos cães resistentes.

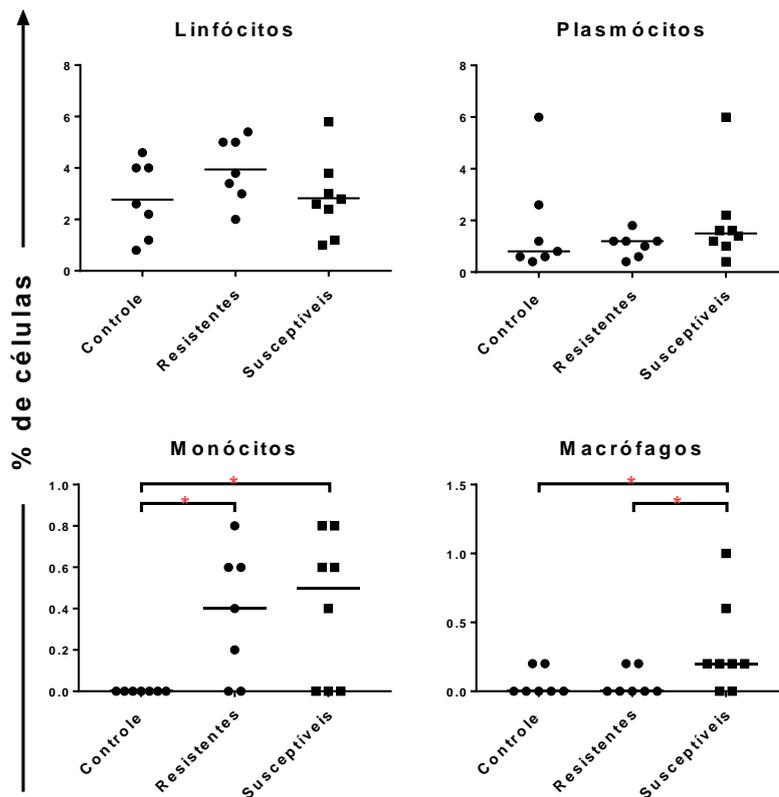


Figura 11 - Perfis de células agranulocíticas nos mielogramas de cães naturalmente infectados com *L. infantum* resistentes e susceptíveis à infecção, em comparação com os mielogramas de cães não infectados com *L. infantum*. O percentual dos precursores foi calculado com base na contagem diferencial de 500 células. Os 4 parâmetros, percentual de linfócitos, plasmócitos, monócitos e macrófagos tiveram distribuição não-paramétrica e as medianas foram comparadas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Conover-Iman. * $p < 0,05$

Os mielogramas também foram avaliados qualitativamente em relação aos valores de referência adotados para a espécie canina e observou-se alterações nos exames dos cães susceptíveis: i) três animais apresentaram hipoplasia da linhagem eritróide; ii) um animal apresentou discreta hiperplasia da linhagem eritróide; iii) dois animais apresentaram hiperplasia da linhagem mielóide; e iv) dois animais apresentaram discreta hipoplasia da linhagem megacariocítica. Adicionalmente, quatro animais susceptíveis apresentaram pequenos aglomerados de plasmócitos e um apresentou presença de células de Mott. Nenhuma alteração foi observada nos mielogramas dos animais resistentes e dos animais não infectados com *L. infantum*.

5.5.2 Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo

Na imunofenotipagem, o percentual de linfócitos T CD8 foi significativamente maior nas amostras de medula óssea dos cães resistentes e dos cães susceptíveis,

em comparação com as amostras de medula óssea dos cães não infectados com *L. infantum*, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre o percentual de células progenitoras hematopoiéticas, linfócitos T CD4, monócitos e na relação de células CD4 e CD8 (figura 12).

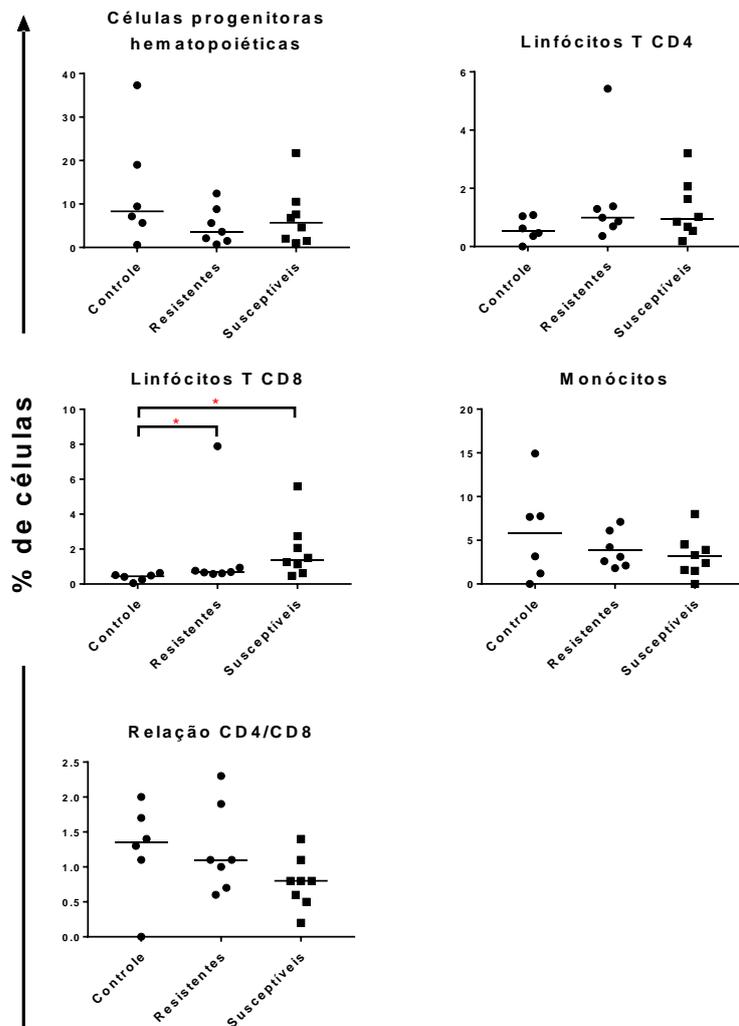


Figura 12 - Perfis de células hematopoiéticas analisadas por citometria de fluxo da medula óssea de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, resistentes e susceptíveis à infecção, em comparação com amostras de medula óssea de cães não infectados com *L. infantum*. O percentual das células foi calculado com base na aquisição de 500 mil eventos. Monócitos tiveram distribuição paramétrica e as médias foram comparadas entre os grupos por One-way ANOVA, seguida do teste de múltiplas comparações de Tukey. Células progenitoras hematopoiéticas, linfócitos T CD4, linfócitos T CD8 e a relação CD4/CD8 tiveram distribuição não-paramétrica e as medianas foram comparadas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de múltiplas comparações de Conover-Iman. * $p < 0,05$

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE O MIELOGRAMA E HEMOGRAMA DOS CÃES REAVALIADOS

Nas análises de correlação, no grupo dos animais resistentes houve correlação positiva entre o percentual de metamielócitos na medula óssea e a número de eosinófilos no sangue periférico (figura 13). No grupo dos animais susceptíveis, houve correlação positiva entre eosinófilos na medula óssea e a número de eosinófilos no sangue periférico (figura 14). Nenhuma outra correlação foi encontrada.

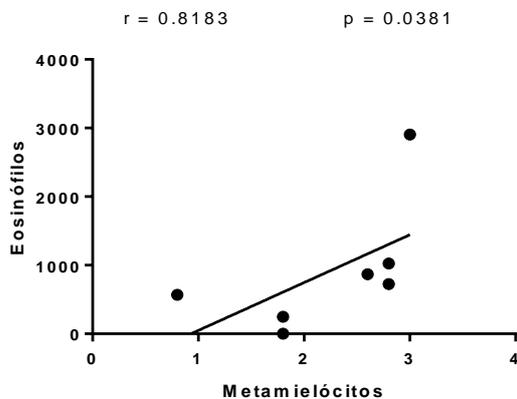


Figura 13 – Correlação entre o percentual de metamielócitos quantificados por mielograma na medula óssea e o número de eosinófilos quantificados por hemograma no sangue periférico de cães classificados como resistentes. Correlação de Spearman.

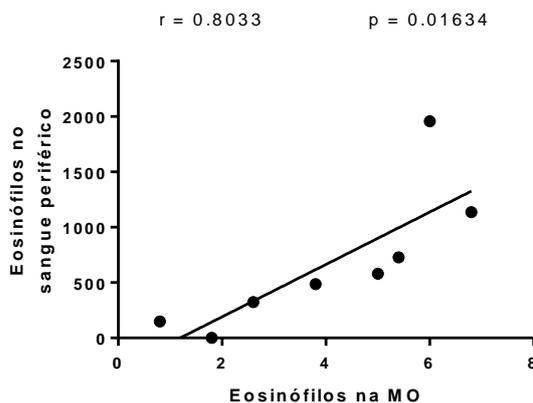


Figura 14 – Correlação entre o percentual eosinófilos quantificados por mielograma na medula óssea e o número de eosinófilos quantificados por hemograma no sangue periférico de cães classificados como susceptíveis. Correlação de Pearson

5.7 SEQUENCIAMENTO POR RNASeq

As amostras de medula óssea coletadas na primeira avaliação foram submetidas à extração de RNA e após a extração foi realizado o controle de qualidade para quantificar e avaliar a integridade do RNA extraído. A amostra de um animal

susceptível foi excluída do sequenciamento porque houve falha no controle de qualidade, com a quantificação do mRNA baixa por espectrofotometria e não foi possível calcular a pontuação de integridade do RNA por meio da eletroforese (RIN – *RNA integrity number*) (figura 15 – amostra A4).

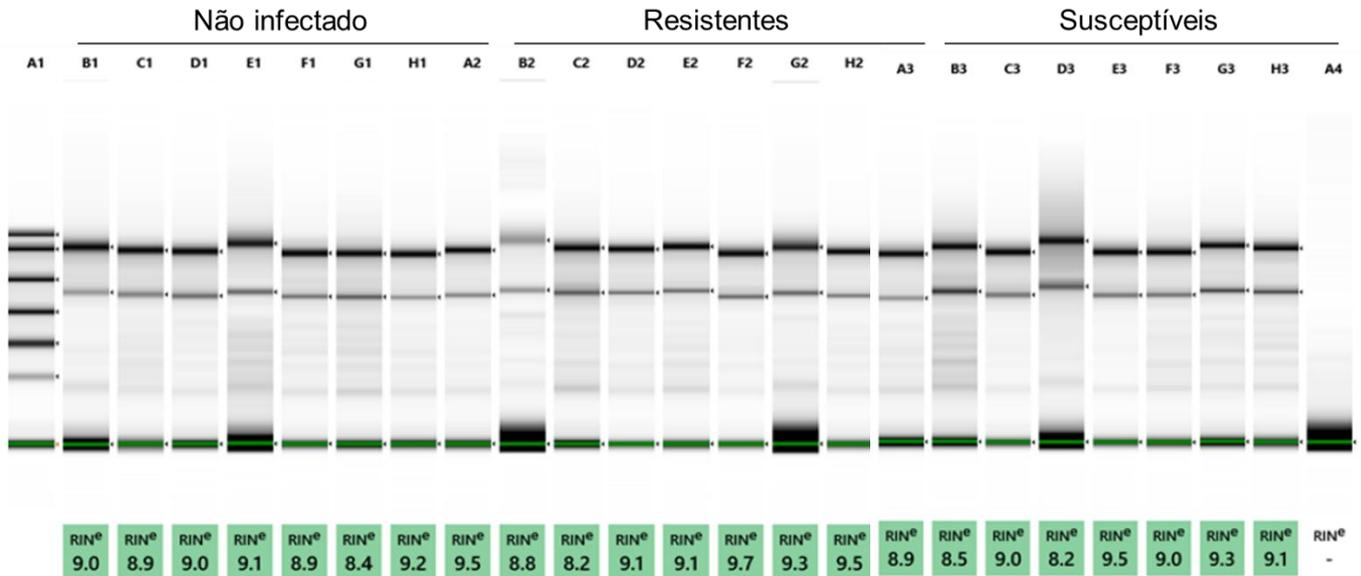


Figura 15 – Eletroforese em gel para avaliação da integridade do RNA das amostras de cães não infectados com *L. infantum*, cães classificados como resistentes e cães classificados como susceptíveis. A1 – marcador de tamanho molecular / B1 – A2 – cães não infectados com *L. infantum* / B2 – A3 – cães resistentes / B3 – A4 – cães susceptíveis

Assim, a biblioteca de cDNA foi construída e sequenciada utilizando as amostras de 8 cães susceptíveis, 7 cães resistentes e 8 cães não infectados com *L. infantum*. Foram sequenciados aproximadamente 58 milhões de *reads* por amostra. Os dados brutos gerados do sequenciamento foram mapeados e analisados. A taxa de mapeamento foi de aproximadamente 50%, já que foram filtrados os RNAs não anotados e os miRNA.

Na análise de bioinformática, foram identificados 425 genes diferencialmente expressos (DEGs - *differentially expressed genes*) nas células da medula óssea de cães resistentes (resistente *versus* controle) e 327 DEGs nas células da medula óssea de cães susceptíveis (susceptível *versus* controle). A quantidade de genes *up* e *down* regulados nas células dos dois grupos foi resumida em um diagrama de Venn (figura 16).

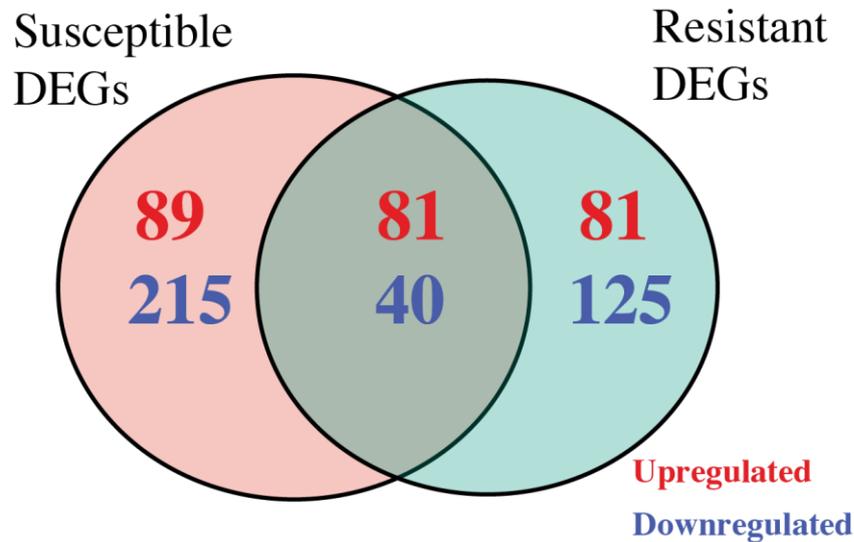


Figura 16 – Diagrama de Venn comparando DEGs nas células da medula óssea de cães susceptíveis e de cães resistentes avaliada por RNASeq e analisada por edgeR. Os números de DEGs regulados positivamente (*up*) regulados e negativamente (*down*) regulados estão indicados no diagrama.

Após a análise da expressão gênica diferencial, foi realizada a análise de enriquecimento da via dos DEGs específicos para cada desfecho clínico, utilizando os bancos de dados KEGG (figura 17), REACTOME (figura 18) e ENRICH (figuras 19, 20, 21 e 22).

Na comparação com o banco de dados KEGG (figura 17), a infecção por *Yersinia* foi a única via enriquecida nos DEGs *up* regulados nas células de cães resistentes. A adesão focal e a infecção por *Salmonella* foram as vias enriquecidas nos DEGs *up* regulados nas células de cães susceptíveis. Por outro lado, as vias de recombinação homóloga e metabolismo do fosfato de inositol foram enriquecidas nos DEGs *down* regulados nas células de cães susceptíveis. A via de regulação do citoesqueleto de actina foi enriquecida nos DEGs *up* regulados tanto em células de cães susceptíveis, como nas de cães resistentes.

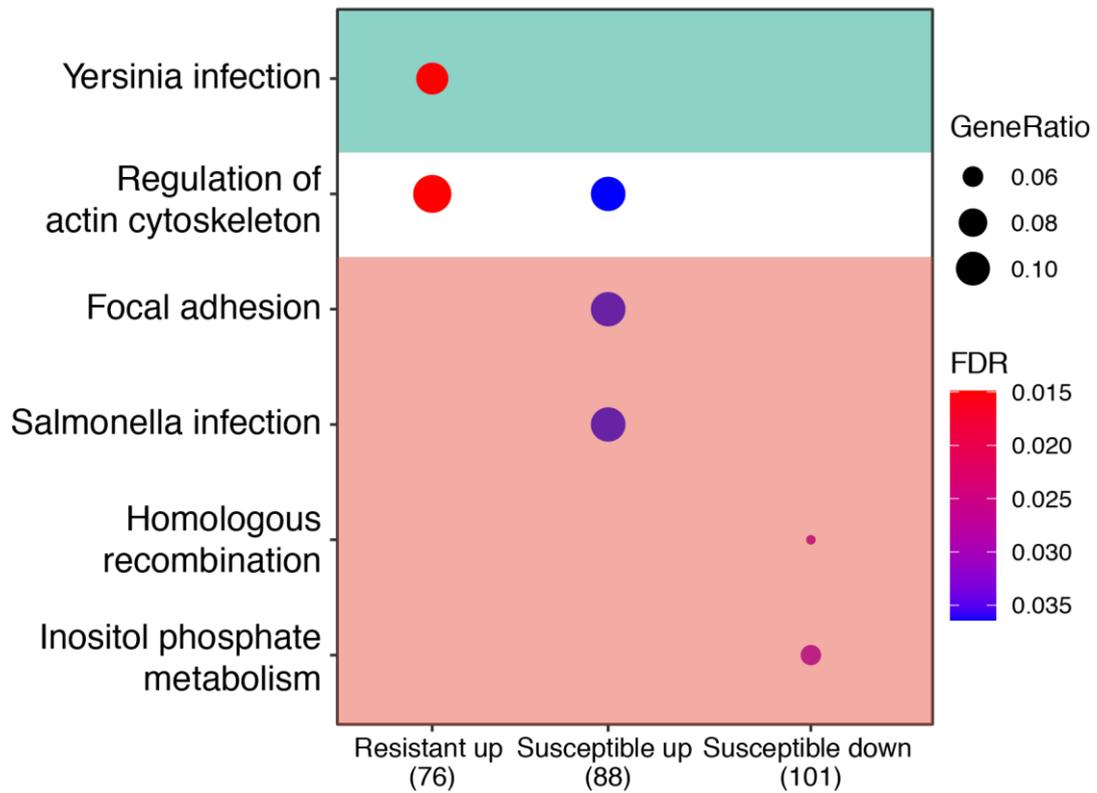


Figura 17 - Análise de enriquecimento da via dos DEGs, *up* e *down* regulados nas células da medula óssea de cães resistentes e de cães susceptíveis, utilizando o banco de dados KEGG. A área sombreada em verde representa as vias enriquecidas em células de cães resistentes, a área sombreada em branco representa as vias enriquecidas em células de cães resistentes e susceptíveis e a área sombreada em vermelho representa as vias enriquecidas em células de cães susceptíveis. O tamanho dos círculos representa a proporção de gene em cada via (genes relacionados à ontologia genética/número total de genes). A intensidade de cor dos círculos se relaciona ao FDR.

A análise de enriquecimento com o banco de dados REACTOME encontrou apenas vias enriquecidas nos DEGs *down* regulados (figura 18). A via do ciclo de Rho GTPase foi identificada nas células de cães resistentes, enquanto que, associada às células de cães susceptíveis foram identificadas 12 vias *down* reguladas e todas envolvidas no reparo do DNA (figura 18).



Figura 18 - Análise de enriquecimento da via dos DEGs, *up* e *down* regulados em células da medula óssea de cães resistentes e de cães susceptíveis, utilizando o banco de dados REACTOME. A área sombreada em verde representa as vias enriquecidas em células de cães resistentes e a área sombreada em vermelho representa as vias enriquecidas em células de cães susceptíveis. O tamanho dos círculos representa a proporção de gene em cada via (genes relacionados à ontologia genética/número total de genes). A intensidade de cor dos círculos se relaciona ao FDR.

A análise de enriquecimento com o banco de dados ENRICH mostrou que (figuras 19, 20, 21 e 22), enquanto vias relacionadas à regulação positiva da migração de células estavam *up* reguladas nas células dos cães resistentes (figura 19), as relacionadas à regulação negativa da migração de células estavam *down* reguladas (figura 20). As vias relacionadas à regulação positiva da migração de células também estavam *up* reguladas em células de cães susceptíveis (figura 21). As vias relacionadas ao reparo de DNA também estavam *down* reguladas em células de cães susceptíveis, assim como na análise de enriquecimento com o banco de dados REACTOME (figura 22). As figuras 19, 20, 21 e 22 mostram as 10 primeiras vias, com menor valor de p , que foram *up* e *down* reguladas em cães resistentes e susceptíveis, respectivamente. No entanto, um quadro completo com todas as vias enriquecidas foi anexado (anexo 9.4).

positive regulation of cell migration (GO:0030335)

cellular response to oxygen-containing compound (GO:1901701)

positive regulation of cell motility (GO:2000147)

positive regulation of cell-substrate adhesion (GO:0010811)

cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)

regulation of hormone biosynthetic process (GO:0046885)

positive regulation of fibroblast proliferation (GO:0048146)

positive regulation of leukocyte chemotaxis (GO:0002690)

cellular response to decreased oxygen levels (GO:0036294)

regulation of gene expression (GO:0010468)

Figura 19 – Análise de enriquecimento da via dos DEGs *up* regulados em células da medula óssea de cães resistentes, utilizando o banco de dados ENRICHR. O gráfico de barras representa as 10 vias enriquecidas mais significativas. As vias enriquecidas foram classificadas pelo valor de p .

regulation of small GTPase mediated signal transduction (GO:0051056)

non-motile cilium assembly (GO:1905515)

cilium assembly (GO:0060271)

negative regulation of protein polymerization (GO:0032272)

negative regulation of actin filament polymerization (GO:0030837)

negative regulation of cytoskeleton organization (GO:0051494)

sensory perception of pain (GO:0019233)

ciliary basal body-plasma membrane docking (GO:0097711)

negative regulation of endothelial cell migration (GO:0010596)

negative regulation of epithelial cell migration (GO:0010633)

Figura 20 - Análise de enriquecimento da via dos DEGs *down* regulados em células da medula óssea de cães resistentes, utilizando o banco de dados ENRICHR. O gráfico de barras representa as 10 vias enriquecidas mais significativas. As vias enriquecidas foram classificadas pelo valor de p .

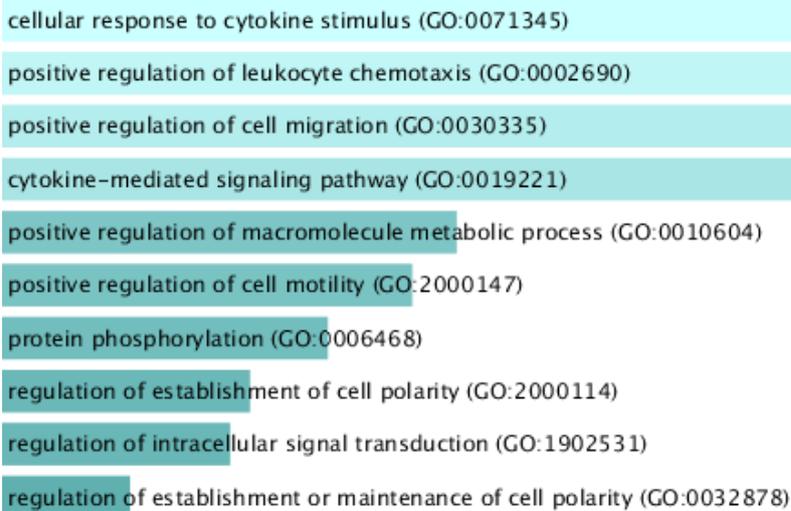


Figura 21 – Análise de enriquecimento da via dos DEGs *up* regulados em células da medula óssea de cães susceptíveis, utilizando o banco de dados ENRICHR. O gráfico de barras representa as 10 vias enriquecidas mais significativas. As vias enriquecidas foram classificadas pelo valor de *p*.

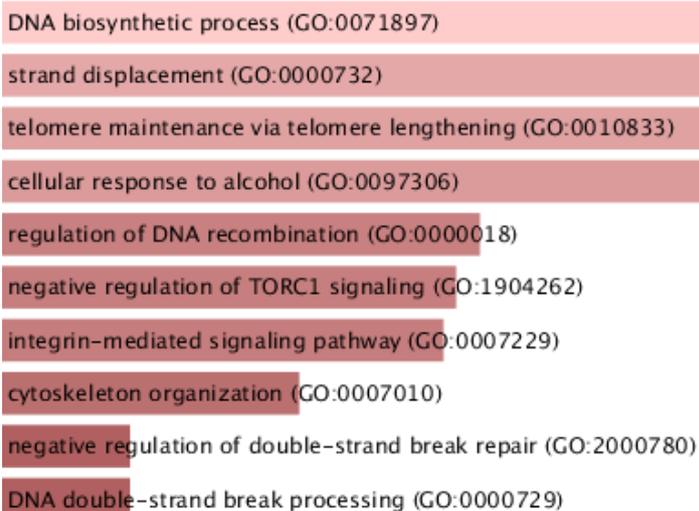


Figura 22 - Análise de enriquecimento da via dos DEGs *down* regulados em células da medula óssea de cães susceptíveis, utilizando o banco de dados ENRICHR. O gráfico de barras representa as 10 vias enriquecidas mais significativas. As vias enriquecidas foram classificadas pelo valor de *p*.

Além das análises de enriquecimento, um algoritmo baseado em aprendizado de máquina foi aplicado e um conjunto de 4 genes (*EGR2*, *FOS*, *TINAGL1* e *ADCY9*) identificado, que exibem o maior poder de classificação para descrever os grupos de cães classificados como resistentes, susceptíveis e não infectados com *L. infantum* (figura 23). O poder de classificação dos 4 genes identificados foi avaliado por uma curva ROC (figura 24). Adicionalmente, os valores de log-cpm foram plotados em um *heatmap* para verificar o agrupamento das amostras com base nesses valores (figura

25). Os 4 genes foram capazes de classificar corretamente as amostras de acordo com seus grupos.

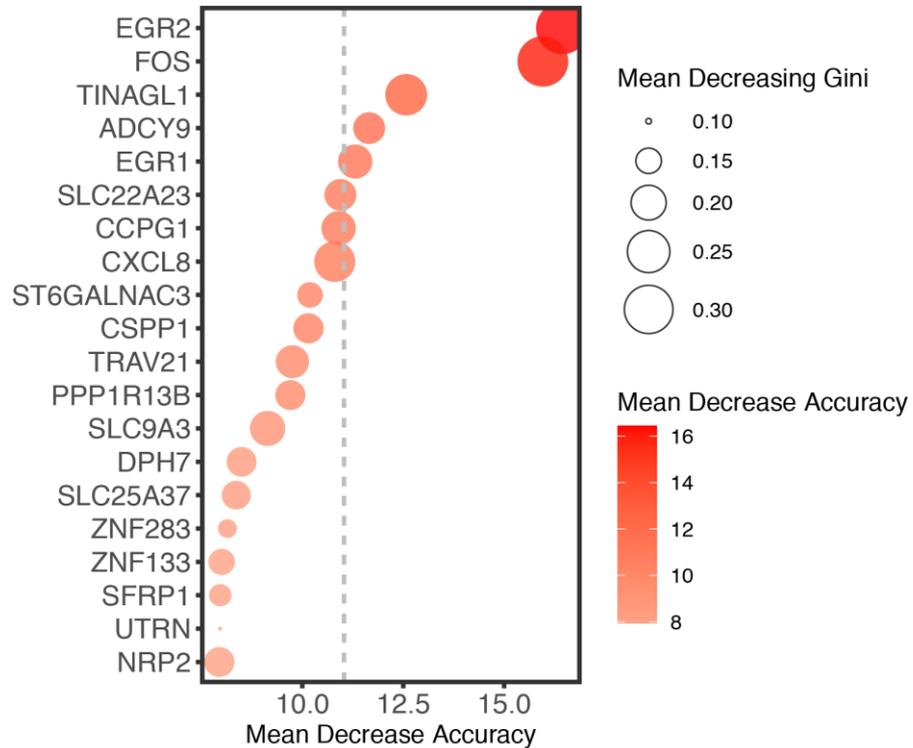


Figura 23 – Conjunto de genes identificados por algoritmo baseado em aprendizado de máquina com poder de classificação para descrever os grupos de cães resistentes, susceptíveis e não infectados com *L. infantum*. As variáveis superiores ao 3º quartil (linha pontilhada) foram utilizadas para avaliar o poder de classificação. Os valores médios do coeficiente gini foram estimados a partir da expressão do log-cpm.

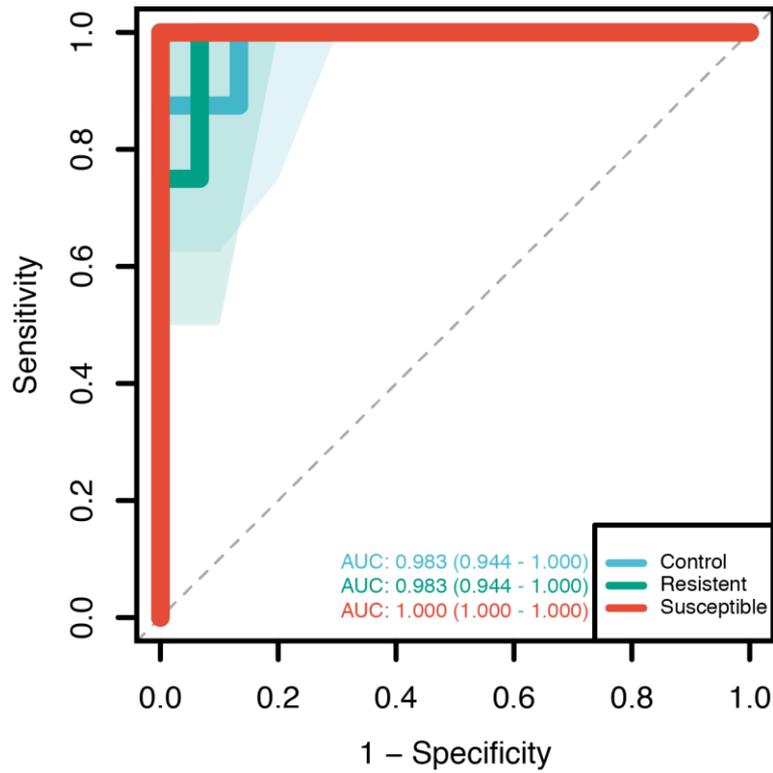


Figura 24 – Curva ROC para avaliar o poder de classificação dos 4 genes identificados por algoritmo baseado em aprendizado de máquina. A área sombreada mostra o intervalo de confiança da área sob a curva.

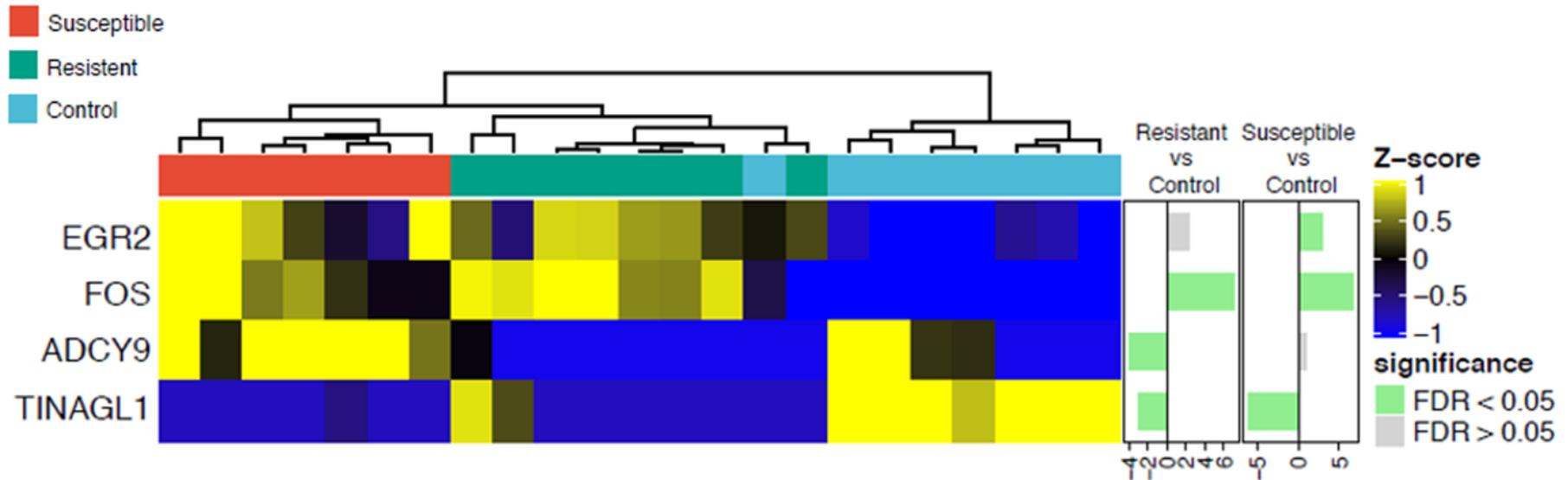


Figura 25 – *Heatmap* dos 4 genes identificados por algoritmo baseado em aprendizado de máquina. O gráfico de barras laterais mostra o FDR (False Discovery Rate) de cada gene para ambas as comparações entre os grupos (resistentes *versus* controle e susceptíveis *versus* controle). As amostras foram agrupadas usando a distância de Manhattan.

6. DISCUSSÃO

A avaliação da resposta das células da medula óssea em cães infectados com *L. infantum* apresentando diferentes desfechos clínicos pode contribuir para o entendimento da patogênese da LV canina e humana. No entanto, em nosso conhecimento, esse é o primeiro relato da literatura que avaliou alterações hematológicas e a resposta medular de cães acompanhados em um estudo de coorte, classificados em resistentes e susceptíveis, além de ter utilizado uma técnica em larga escala para avaliar de forma global a resposta de células da medula óssea desses mesmos cães naturalmente infectados.

Na avaliação longitudinal do perfil hematológico dos cães do estudo de coorte, assim como na avaliação hematológica dos cães que entraram no presente estudo, observamos diminuição na contagem de hemácias, na dosagem de hemoglobina e no hematócrito em cães susceptíveis, caracterizando um quadro de anemia. A anemia já foi relatada como uma das alterações hematológicas mais frequentes em cães infectados com *L. infantum*, principalmente nos animais com alta carga parasitária e que desenvolvem o quadro clínico da LVC (COSTA-VAL et al., 2007; COURA-VITAL et al., 2011; DIAS et al., 2008; GUERRA et al., 2009; LOPES et al., 2018; REIS et al., 2006a; SILVA et al., 2018; TORRECILHA et al., 2016). Em humanos, a anemia está presente em mais de 90% dos pacientes com LV (GOTO et al., 2017). Werneck e colaboradores (2003), em um estudo para identificar fatores prognósticos em pacientes humanos que morreram durante o tratamento para LV, relataram que a anemia grave estava associada ao óbito.

A patogênese da anemia na LVC ainda precisa ser melhor estudada, mas alguns trabalhos apontam como possíveis causas: a hemólise, a inflamação generalizada, a deficiência de ferro, o sequestro de eritrócitos para o baço, a perda de sangue devido a epistaxe e ulcerações cutâneas, a insuficiência renal e a hipoplasia ou aplasia medular (COSTA-VAL et al., 2007; DE LUNA et al., 2000; LOPES et al., 2018; REIS et al., 2006a; TORRECILHA et al., 2016). Reis e colaboradores (2006a), em um estudo de corte transversal, observaram que cães que desenvolveram os sinais clínicos da LVC apresentavam intenso parasitismo na medula óssea, que, em consequência, pode ter sido a causa das alterações nos parâmetros hematológicos desses animais, como diminuição significativa das taxas de hemoglobina e no hematócrito e na contagem de eritrócitos, comparados aos animais assintomáticos, oligossintomáticos e não infectados com *L. infantum*. Nicolato e colaboradores (2013)

relataram anemia acentuada em cães que apresentavam sinais clínicos graves da LVC e esse achado foi correlacionado com a hipoplasia da linhagem eritróide na medula óssea desses animais. No nosso trabalho, não encontramos correlação entre as alterações do eritrograma e a contagem de células da linhagem eritróide no mielograma, mas observamos que os três cães susceptíveis que apresentaram hipoplasia da linhagem eritróide também apresentaram um quadro de anemia. Além disso, no mielograma, apesar dos animais susceptíveis apresentarem aumento na contagem de rubriblastos, em comparação com os cães resistentes, eles também apresentaram diminuição na contagem de metarrubríctos, em comparação com os cães não infectados com *L. infantum*, sugerindo que talvez possa estar havendo uma perda na capacidade de diferenciação dessas células. Um dado que corrobora com essa hipótese é a *down* regulação da via de diferenciação das células-tronco nas células da medula óssea de cães susceptíveis, na análise de enriquecimento com o banco de dados ENRICH (anexo 9.4).

Não houve nenhuma outra diferença estatisticamente significativa na avaliação hematológica dos cães reavaliados e isso difere do que já foi relatado na literatura. Reis e colaboradores (2005) mostraram diminuição significativa na contagem de leucócitos, eosinófilos, linfócitos e monócitos em cães sintomáticos, quando comparados com cães não infectados com *L. infantum*. Outros autores também relataram eosinofilia, linfopenia, monocitopenia, neutrofilia e trombocitopenia em animais manifestando o quadro clínico da LVC e/ou com elevada carga parasitária (COSTA-VAL et al., 2007; COURA-VITAL et al., 2011; GUERRA et al., 2009; LOPES et al., 2018; TORRECILHA et al., 2016). Os trabalhos citados são cortes transversais onde os animais foram classificados em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Esses últimos, são aqueles que apresentam LVC grave e alterações hematológicas descritas nesses estudos. No nosso trabalho, os animais foram classificados em resistentes ou susceptíveis com base na clínica, na carga parasitária esplênica, no nível sérico e na interação de mediadores biológicos e na intensidade de exposição à picada do vetor flebotomíneo (SOLCÀ et al., 2021). Assim, alguns dos nossos cães, classificados como susceptíveis apresentam sinais clínicos leves, o que pode ter influenciado as discrepâncias observadas entre o nosso estudo com os estudos anteriores.

Em relação a contagem das células da linhagem mielóide, identificamos que cães susceptíveis apresentam maior percentual de mieloblastos e de bastonetes em

comparação com os animais não infectados com *L. infantum*, mas esse aumento não foi refletido no sangue periférico. Nos mielogramas dos cães resistentes observamos maior contagem de promielócitos quando comparado com o mielograma de cães não infectados com *L. infantum*. Diante dos nossos achados, hipotetizamos que os mieloblastos dos animais susceptíveis e os promielócitos dos animais resistentes podem estar se diferenciando preferencialmente em eosinófilos e permanecendo na medula óssea, já que também foi observada um maior percentual dessas células no mielograma desses animais. Na análise de correlação, observamos que no grupo dos animais resistentes houve correlação positiva entre o percentual de metamielócitos na medula óssea e a número de eosinófilos no sangue periférico e no grupo dos animais susceptíveis, houve correlação positiva entre eosinófilos na medula óssea e o número de eosinófilos no sangue periférico. Diferentemente do que foi observado no presente estudo, Nicolato e colaboradores (2013) relataram que a diminuição na contagem das células da linhagem eosinofílicas na medula óssea de cães com LV está associada à doença grave e tem correlação positiva com o número de eosinófilos circulantes.

Nos últimos anos, o papel dos eosinófilos na LV tem sido alvo de investigações (RODRÍGUEZ e WILSON, 2014). Na LVC, a diminuição de eosinófilos na pele de animais infectados com *L. infantum* foi correlacionada com o aumento da densidade parasitária (MENEZES-SOUZA et al., 2012). Costa e colaboradores (2018) também relataram maior percentual de eosinófilos nos linfonodos de cães infectados com *L. infantum*, em comparação com cães não infectados e esse achado apresentou correlação negativa com a carga parasitária. Os autores também observaram maior produção de NO e ROS em eosinófilos presentes no sangue periférico desses animais, sugerindo que essas células possuem atividade leishmanicida (COSTA et al., 2018). Nagase e colaboradores (2003), relataram que eosinófilos infectados por *Leishmania*, quando ativados por IFN- γ , são estimulados a produzir diversos mediadores inflamatórios que são responsáveis por promover a eliminação do parasita. Esses relatos sugerem que os eosinófilos podem estar participando da resposta imune contribuindo para o controle da LVC. No entanto, mais estudos são necessários para investigar melhor o papel dessas células, principalmente na medula óssea de cães infectados.

Ainda em relação à avaliação do mielograma, identificamos que a razão entre as células mielóides e as células eritróides foi significativamente maior nos cães susceptíveis, em comparação com os cães resistentes, provavelmente devido à

hipoplasia eritróide apresentada por alguns cães susceptíveis. Na contagem das células agranulócíticas, identificamos maior percentual de monócitos nos mielogramas dos cães resistentes e dos cães susceptíveis, em comparação com os mielogramas dos cães não infectados com *L. infantum*. Por outro lado, a contagem de macrófagos foi significativamente maior nos mielogramas dos cães susceptíveis, comparados com os dos cães susceptíveis e dos cães não infectados com *L. infantum*. Diante desses achados, hipotetizamos que, em animais resistentes, os monócitos migrariam para circulação periférica, enquanto que, nos animais susceptíveis, eles não migrariam e se diferenciam em macrófagos na medula óssea. Dados da análise de enriquecimento usando o banco de dados ENRICH (anexo 9.4) fortalecem a nossa hipótese, sendo eles: i) regulação positiva da via de regulação negativa da migração de linfócitos e de células mononucleares da medula óssea dos animais susceptíveis; ii) regulação negativa da via de quimiotaxia de monócitos nas células da medula óssea de animais resistentes; e iii) regulação negativa da via de regulação negativa da migração de células mononucleares da medula óssea de animais resistentes.

Uma outra hipótese para explicar o aumento do percentual de células precursoras de granulócitos, assim como do de células agranulocíticas, é que a presença da *Leishmania* na medula óssea poderia induzir a expansão de células progenitoras. Um estudo em modelo murino mostrou que a presença da *L. donovani* na medula óssea de camundongos é capaz de induzir a expansão de células-tronco e essa hematopoiese de emergência contribui para patogênese da LV, pois a diminuição da expansão das células-tronco resultou em menor carga parasitária (ABIDIN et al., 2017). Os autores também relataram que, *in vitro*, monócitos diferenciados na presença de sobrenadante da medula óssea de camundongos infectados são mais permissivos à infecção por *L. donovani* (ABIDIN et al., 2017). Além disso, Carvalho-Gontijo e colaboradores (2018) também mostraram que células-tronco hematopoéticas humanas são capazes de fagocitar promastigotas de *L. infantum* e sugerem que esses parasitas utilizam essas células para sua manutenção e multiplicação, sem manifestação de sinais clínicos e em condições imunológicas normais.

Ainda sobre a avaliação do mielograma, apesar de não terem sido identificadas diferenças estatisticamente significativas na contagem de plasmócitos, foram observados aglomerados de plasmócitos no mielograma de 4 cães susceptíveis. É possível, portanto, que na contagem, essas células tenham sido subestimadas. Além

disso, assim como no estudo de Nicolato e colaboradores (2013), no presente trabalho, observamos na medula óssea de um dos animais susceptíveis presença de células de Mott, que são células plasmáticas contendo grânulos de imunoglobulinas em seu citoplasma. Essas células já foram relatadas como resultante de estimulação antigênica associada ao intenso parasitismo na medula óssea de cães com LV (ANOSA e IDOWU, 1983). Silva-O'Hare e colaboradores (2016) mostraram que na LVC grave, o acúmulo de plasmócitos no baço está associado a desorganização da polpa branca. No nosso estudo, não foi possível realizar a quantificação de células B, que são precursoras dos plasmócitos, na medula óssea dos animais estudados, mas na análise de enriquecimento utilizando o banco de dados ENRICH (anexo 9.4), identificamos que nas células da medula óssea dos cães susceptíveis observa-se a regulação negativa da via de modulação negativa da ativação de células B. Além do mais, identificamos nessa análise regulação positiva da via que modula a quimiotaxia de células B. Corroborando esses achados, observamos que em células da medula óssea dos animais resistentes, observa-se regulação negativa da via de modulação positiva da proliferação de células B. Assim, especulamos que o percentual de células B na medula óssea dos cães susceptíveis seja maior do que na medula óssea dos animais resistentes. No entanto, futuros estudos quantitativos serão necessários para determinação da proporção de células B na medula óssea desses animais da coorte.

Realizamos a caracterização da medula óssea por citometria de fluxo e observamos que o percentual de células T CD8 foi significativamente maior nas amostras de medula óssea dos cães resistentes e susceptíveis, em comparação com o percentual nas amostras de medula óssea dos cães não infectados. A imunofenotipagem de linfócitos T em cães foi descrita anteriormente somente em sangue periférico na população canina, que mostraram que os níveis aumentados de linfócitos T CD8 foram evidenciados em cães assintomáticos e/ou com baixa carga parasitária (COURA-VITAL et al., 2011; GUERRA et al., 2009; REIS et al., 2006). Os nossos achados divergem do descrito na literatura, já que o animais susceptíveis também apresentaram percentual de células T CD8 em comparação com os cães não infectados. Acreditamos, que assim como descrito anteriormente para os parâmetros hematológicos, a nossa classificação em resistentes e susceptíveis pode ter influenciado para essa divergência porque uma parte dos nossos animais susceptíveis apresentam sinais clínicos leves da LVC. Além disso, no presente trabalho, a carga

parasitária não foi avaliada, mas o encontro de baixa positividade no diagnóstico molecular, sugere que são animais com baixa carga parasitária.

O RNA Seq nos forneceu uma visão global da resposta medular de cães resistentes e susceptíveis. Esse tipo de análise, em larga escala, são eficazes no estudo da patogênese de doenças e nos possibilitou identificar genes e vias anteriormente não identificadas na LVC e estabelecer hipóteses (DOUGHTY e KERKHOVEN, 2020).

As análises de enriquecimento dos nossos dados de RNAseq por meio de KEGG, REACTOME e ENRICHR mostraram, adicionalmente, que vias relacionadas ao reparo de fita dupla do DNA e vias relacionadas à migração celular se destacaram por aparecerem como reguladas na comparação com os três bancos e pela quantidade de vias que foram reguladas. Observamos que todas as vias identificadas relacionadas ao reparo do DNA se mostraram reguladas negativamente em células da medula óssea de cães susceptíveis. Estudos anteriores demonstraram que o estresse oxidativo é capaz de causar danos no DNA das células (KOCYIGIT et al, 2005; MOREIRA et al., 2017). Em estudo para avaliar o efeito da infecção por *Leishmania* nos níveis basais de quebras de fita de DNA e o estado oxidativo/antioxidante de pacientes com LC, Kocyigit e colaboradores (2005) mostraram que espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio possuem atividade leishmanicida, além de induzir dano oxidativo no DNA de células infectadas, já que o aumento do nível de malondialdeído no plasma, foi positivamente correlacionado com os danos ao DNA. Nosso estudo não avaliou a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio por células da medula óssea dos cães da coorte, mas na análise de enriquecimento utilizando o banco de dados do ENRICHR (anexo 9.4), identificamos, nas células de cães susceptíveis e resistente, regulação positiva das vias de resposta celular ao estresse oxidativo, de resposta a espécies reativa de oxigênio e de regulação do processo metabólico do superóxido, sugerindo que a produção dos reativos de oxigênio ocorre em resposta à infecção. No entanto, a identificação da regulação positiva da via relacionada ao processo biossintético de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico apenas em células de cães susceptíveis, nos leva a especular que a perpetuação dessa resposta ocorre apenas nesse grupo de animais. Diante desse conjunto de dados, a nossa hipótese é que o estresse oxidativo provoca a quebra do DNA nas células da medula óssea de cães susceptíveis e de cães resistentes, no entanto, os cães resistentes seriam capazes

de reparar o dano, enquanto os cães susceptíveis não seriam capazes. Estudos de validação da regulação dessas vias, nos permitirão corroborar nossa hipótese.

Em relação as vias relacionadas a migração celular, estão reguladas positivamente em células da medula óssea de cães susceptíveis e resistentes. Esse dado sugere que na infecção por *L. infantum* em cães ocorre ativação de mecanismos associados à migração celular. Em modelo murino, Rocha e colaboradores (2020) identificaram maior mobilidade de macrófagos derivados de medula óssea quando infectados com *L. infantum*, enquanto a infecção por *L. major* não alterou a migração dessas células. Recentemente, o nosso grupo avaliou o papel da infecção por *L. infantum* em macrófagos e células dendríticas de humanos e identificamos que as células dendríticas infectadas migram mais, quando comparadas com células não infectadas, enquanto que, os macrófagos migram menos (dados ainda não publicados). Novos estudos são necessários para esclarecer os mecanismos relacionados à ativação de vias de migração em células de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Por análise de bioinformática, quatro genes foram identificados por terem potencial em diferenciar cães resistentes de cães susceptíveis. O gene EGR2 codifica a proteína de resposta de crescimento precoce 2, o FOS é uma subunidade do fator de transcrição AP-1, o ADCY9 codifica o adenilato ciclase tipo 9 e o TINAGL1 codifica a proteína relacionada ao antígeno da nefrite tubulointersticial (<https://www.genecards.org/>). O EGR2 já foi associado à promoção da diferenciação e ativação de células mielóides (MIAO et al., 2017; VEREMEYKO et al., 2018). Além disso, os 4 genes já foram identificados individualmente como diferentemente expressos em macrófagos murinos ou humanos infectados com *Leishmania* (DESCOTEAUX e MATLASHEWSKI, 1989; DIAS, 2018; ESPITIA et al., 2014; KONG et al., 2017). O presente estudo expandiu os dados anteriores e, utilizando um algoritmo baseado em aprendizado de máquina, pela primeira vez, foram identificados genes com potencial de diferenciar cães susceptíveis de cães resistentes. Esses genes apresentam o potencial para serem utilizados como biomarcadores de susceptibilidade ou de resistência na LVC, uma vez que venhamos a realizar a validação desses dados em estudos futuros.

A identificação de biomarcadores de susceptibilidade poderá contribuir para maior otimização das medidas de controle atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde, já que, em áreas endêmicas observasse uma elevada e imediata reposição

da população canina retirada para eutanásia, colocando novos animais susceptíveis no ambiente endêmico (MOREIRA *et al.*, 2004; NUNES *et al.*, 2008). Estudos já mostraram que os cães infectados que apresentam um perfil de resistência, possuem baixa carga parasitária e menor potencial de transmissão da *Leishmania* para o insetor vetor (BORJA *et al.*, 2016; SOLCÀ *et al.*, 2021). Assim, acreditasse, que a manutenção desses animais na área endêmica, acompanhada do uso de coleiras repelentes, seja mais vantajosa para o controle da LV.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, concluímos que a resposta medular de cães susceptíveis se difere da resposta apresentada pelos cães resistentes. Os cães susceptíveis apresentam hipoplasia de células da linhagem eritróide e essa alteração na medula tem reflexo no sangue periférico, já que esses animais desenvolvem um quadro de anemia. Além disso, o sequenciamento global dos genes expressos pelas células da medula de cães naturalmente infectados nos permitiu identificar vias, como as vias de reparo da fita dupla do DNA, que foram reguladas apenas nas células da medula óssea de cães susceptíveis, estando possivelmente relacionadas ao quadro de susceptibilidade na LVC.

Por se tratar de um estudo exploratório, o presente trabalho possibilitou a construção de diversas hipóteses que devem ser exploradas e respondidas em estudos futuros e, assim, contribuir ainda mais para o entendimento da patogênese da LVC e contribuir com os esforços atuais para desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas. Além disso, a validação de um conjunto de genes que podem ser utilizados como biomarcadores de susceptibilidade pode auxiliar na identificação precoce de animais susceptíveis e na otimização das medidas de controle da LV.

8. REFERÊNCIAS

- ABIDIN, B. M. *et al.* Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, p. 1–26, 2017.
- 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**, v. 6, n. 5, p. e18873, jan. 2011.
- ABREU-SILVA, A. L. *et al.* Soroprevalência, Aspectos Clínicos E Bioquímicos Da Infecção Por *Leishmania* Em Cães Naturalmente Infectados E Fauna De Flebotomíneos Em Uma Área Endêmica Na Ilha De São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 197–203, 2008.
- ADRIAENSEN, W. *et al.* Host transcriptomic signature as alternative test-of-cure in visceral leishmaniasis patients co-infected with HIV. **EBioMedicine**, v. 55, 2020.
- AGUIAR, P. H. P. *et al.* Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 4, p. 283–294, out/dez. 2007.
- ALTET, L. *et al.* Mapping and Sequencing of the Canine. **Society**, v. 70, n. 6, p. 2763–2771, 2002.
- ALVAR, J. *et al.* Canine Leishmaniasis. In: **Advances in parasitology**. v. 57, p. 1–88, 2004.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- ANOSA, V. O.; IDOWU, A. L. The Clinico-Haematological Features and Pathology of Leishmaniasis in a Dog in Nigeria. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 30, n. 1–10, p. 600–608, 1983.
- ANTOINE, J. C. *et al.* Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infection and immunity**, v. 58, n. 3, p. 779–87, mar. 1990.
- ASHWIN, H. *et al.* Tissue and host species-specific transcriptional changes in models of experimental visceral leishmaniasis. **Wellcome Open Research**, v. 3, p. 135, 2018.
- AŞKAR, T. K. *et al.* Evaluation of oxidative status and inflammatory changes in naturally occurring canine visceral leishmaniasis. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 51, n. 1, p. 301–306, 2019.

- AZEVEDO, M. Á. A. de *et al.* Avaliação da leishmaniose visceral canina em Poxoréo, Estado De Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 3, p. 123–127, 2008.
- BALDRIDGE, M. T. *et al.* Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- γ in response to chronic infection. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 793–797, 2010.
- BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–30, jul. 2008.
- BANETH, G. *et al.* Emergence of visceral leishmaniasis in central Israel. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 5, p. 722–725, 1998.
- BARROUIN-MELO, S. M. *et al.* Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331–339, 2006.
- BEVILACQUA, P. D. *et al.* Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 1, 2001.
Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000100001
- BIJAY JASSAL, L. M *et al.* The reactome pathway knowledgebase, **Nucleic Acids Research**, Volume 48, Issue D1, 08 de janeiro de 2020, Pages D498 – D503, <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
- 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. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 110–117, 2016.
- BRITTI, D. *et al.* Proteomic analysis in canine leishmaniasis. **Veterinary Research Communications**, v. 34, n. SUPPL.1, 2010.
- BRODSKYN, C. I.; KAMHAWI, S. Biomarkers for Zoonotic Visceral Leishmaniasis in Latin America. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. July, p. 245, 2018.
- BURATTINI, M., *et al.* Modelling of the dynamics of leishmaniasis considering human, animal host and vector populations. **Math Mod Anal Scient Comp**. v. 26, p. 1-16, 1995.
- CAMARGO-NEVES, V. L. F. DE *et al.* Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana - Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1263–1267, out. 2001.

- CAMARGO-NEVES, V. L. F. DE; RODAS, L. A. C.; GOMES, A. DE C. Avaliação do hábito alimentar de *Lutzomyia longipalpis* no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 4, p. 2–7, 2007.
- CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 67–70, 2009.
- CARVALHO-GONTIJO, R. *et al.* Infection of hematopoietic stem cells by *Leishmania infantum* increases erythropoiesis and alters the phenotypic and functional profiles of progeny. **Cellular Immunology**, v. 326, n. October 2017, p. 77–85, 2018.
- 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.
- CHAPARRO, V. *et al.* Translational profiling of macrophages infected with *Leishmania donovani* identifies mTOR- And eIF4A-sensitive immune-related transcripts. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 6, p. 1–24, 2020.
- CIARAMELLA, P. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539–543, 22 nov. 1997.
- CIARAMELLA, P. *et al.* Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 465–7, maio 2005.
- CORTESE, M. S. L.; *et al.* Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 164, p. 778–782, 2009.
- COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de Leishmaniose Visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980 - 1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361–372, 1990.
- COSTA, S. F. *et al.* Eosinophilic inflammation in lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 8, p. 0–2, 2018.
- COSTA-VAL, A. P. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636–643, 2007.
- COTTERELL, S. E. J.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 4, p. 1840–1848, 2000.

- COURA-VITAL, W. *et al.* Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Journal**, v. 190, n. 2, p. e43–e47, 2011.
- COWELL, A. N.; WINZELER, E. A. Advances in omics-based methods to identify novel targets for malaria and other parasitic protozoan infections. **Genome Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1–17, 2019.
- CUNHA, A. M. DA. Infecções experimentaes na Leishmaniose Tegumentar Americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, p. 581–598, 1938.
- CWIKLINSKI, K.; DALTON, J. P. Advances in *Fasciola hepatica* research using ‘omics’ technologies. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 5, p. 321–331, 2018.
- DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 13, p. 2461–2469, 2001.
- DE LUNA, R. *et al.* Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 2–3, p. 213–216, 2000.
- DE MENEZES, J. P. B. *et al.* *Leishmania* infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 1–9, 2017.
- DE MENEZES, J. P. B. *et al.* Proteomic analysis reveals a predominant NFe2L2 (Nrf2) signature in canonical pathway and upstream regulator analysis of *Leishmania*-infected macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. JUN, 2019.
- DE TOMMASI, A. S. *et al.* Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.
- DEA-AYUELA, M. A.; RAMA-IÑIGUEZ, S.; BOLA;S-FERNA;NDEZ, F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. **Proteomics**, v. 6, n. 14, p. 4187–4194, 2006.
- DESCOTEAUX, A.; MATLASHEWSKI, G. c-fos and tumor necrosis factor gene expression in *Leishmania donovani*-infected macrophages. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 11, p. 5223–5227, 1989.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, set. 2004.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, v. 95, p. 239–243, 2001.

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.

DIAS, E. L. Canine Visceral Leishmaniasis (Cvl): Seroprevalence , Clinical , Hematological and Biochemical Findings of Dogs Naturally Infected in an Endemic Area of São José De Ribamar Municipality , Maranhão State , Brazil. **ciência Animal Brasileira**, n. Cvl, p. 740–745, 2008.

DIAS, B. R. S. **Estudo da contribuição da autofagia para a susceptibilidade por *L. Amazonensis* ou resistência por *L. Major* na infecção de macrófagos murinos da linhagem CBA**. 2018. 125 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia; Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

DIZDAROGLU, M. Chemical determination of oxidative DNA damage by gas chromatography-mass spectrometry. **Methods in Enzymology**, v. 234, n. 1991, p. 3–16, 1994.

DOUGHTY, T.; KERKHOVEN, E. Extracting novel hypotheses and findings from RNA-seq data, **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 2, March 2020, foaa007, <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa007>

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, V. 55, n. 2, p. 125–30, ago. 1996.

EJAZI, S. A. *et al.* Immunoproteomic Identification and Characterization of Leishmania Membrane Proteins as Non-Invasive Diagnostic Candidates for Clinical Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

ENGWERDA, C. R. *et al.* A role for tumor necrosis factor- α in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **American Journal of Pathology**, v. 161, n. 2, p. 429–437, 2002.

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 Immunology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2014.

FISA, R. *et al.* Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain:)The example of the Priorat focus. **Veterinary Parasitology**, v. 83, n. 2, p. 87–97, 1999.

FORRESTER, S. *et al.* Tissue-specific transcriptomic changes associated with AmBisome® treatment of BALB/c mice with experimental visceral leishmaniasis [version 1; peer review: 3 approved]. **Wellcome Open Research**, v. 4, p. 1–21, 2019.

- FRANCINO, O.; *et al.* Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 137, n. 3 - 4, p. 214 - 221, abr. 2006.
- FRANCO-MARTÍNEZ, L. *et al.* Changes in saliva of dogs with canine leishmaniosis: A proteomic approach. **Veterinary Parasitology**, v. 272, n. June, p. 44–52, 2019.
- FRANCO-MARTÍNEZ, L. *et al.* Serum proteome of dogs at subclinical and clinical onset of canine leishmaniosis. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 67, n. 1, p. 318–327, 2020.
- GIGLIA-MARI, G.; ZOTTER, A.; VERMEULEN, W. DNA damage response. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 2011.
- GINEL, P. J.; CAMACHO, S.; LUCENA, R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. **Research in Veterinary Science**, v. 85, n. 3, p. 510–514, 2008.
- GIUNCHETTI, R. C. *et al.* A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**, v. 26, n. 5, p. 623–638, 2008.
- GIUNCHETTI, R. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 271, n. April, p. 87–97, 2019.
- GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.
- GOTO, Y. *et al.* Prevalence, severity, and pathogenesis of anemia in visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 457–464, 2017.
- GRINDEM, CB, NEEL JÁ, JUOPPERI TA. Cytology of bone marrow. **Veterinary Clinic North American Small Animal Practice**, v. 32, n. 6, p. 1313-1374, 2002.
- GRIMALDI, G. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59, 2012.
- GUERRA, L. L. *et al.* Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 104, n. 3, p. 611–622, 2009.
- HARVEY, J.W. Bone marrow examination, In: **Veterinary hematology a diagnostic guide and color atlas**. 2012. cap. 8, p. 234 -259.

- HARVEY, J.W. Disorders of bone marrow, In: **Veterinary hematology a diagnostic guide and color atlas**. 2012. cap. 9, p. 260-327.
- JOSHI-TOPE, M. G. *et al.* Reactome: a knowledgebase of biologic pathways, **Nucleic Acids Research**, v. 33, suppl_1, p. D428 – D432, 1 jan. de 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gki072>
- KANEHISA, M;GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 1 jan. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 jul. 2011.
- KOCYIGIT, A. *et al.* Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 585, n. 1–2, p. 71–78, 2005.
- KONG, F. *et al.* Transcriptional profiling in experimental visceral leishmaniasis reveals a broad splenic inflammatory environment that conditions macrophages toward a disease-promoting phenotype. **PLOS Pathogens**, [s.l.: s.n.]. v. 13
- KOUTINAS, A. F. *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376–383, 1999.
- KULESHOV, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update, **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W90–W978, july 2016. Disponível el: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>
- KUMAR, R. *et al.* Enhanced expression of Toll Like Receptors (TLRs) 2 & 4, but not 9, in spleen tissue from visceral leishmaniasis patients. **NIH Public Access**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014.
- KUMARI, S. *et al.* Discovery of Novel Vaccine Candidates and Drug Targets Against Visceral Leishmaniasis Using Proteomics and Transcriptomics. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 11, p. 938–947, 2008.
- LAFUSE, W. P. *et al.* Leishmania donovani Infection Induces Anemia in Hamsters by Differentially Altering Erythropoiesis in Bone Marrow and Spleen. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2013.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 277, n. 5664, p. 595–600, 1978.

- LEAL, G. G. DE A. *et al.* Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 472–482, 2014.
- LOPES, V. V. *et al.* IgG avidity index and complete blood count as biomarkers of clinical disease in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 261, p. 96–103, 2018.
- LOPEZ, R. *et al.* Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 43, n. 8, p. 469–474, 1996.
- LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.
- LOSADA-BARRAGÁN, M. *et al.* Proteomic profiling of splenic interstitial fluid of malnourished mice infected with *Leishmania infantum* reveals defects on cell proliferation and pro-inflammatory response. **Journal of Proteomics**, v. 208, n. June, p. 103492, 2019.
- MAIA, C.; CAMPINO, L. Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2018.
- MANZ, M. G.; BOETTCHER, S. Emergency granulopoiesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 302–314, 2014.
- MARTINEZ-SUBIELA, S. *et al.* Identification of novel biomarkers for treatment monitoring in canine leishmaniosis by high-resolution quantitative proteomic analysis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 191, p. 60–67, 2017.
- MARZOCHI, M. C. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 3, p. 349–57, 1985b.
- MARZOCHI, M. CELIO DE A. *et al.* Leishmaniose visceral na cidade do Rio de Janeiro - Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 5–17, 1985a.
- MATATALL, K. A. *et al.* Type II Interferon Promotes Differentiation of Myeloid-Biased Hematopoietic Stem Cells. **Stem cells**, v. 32, n. 0, p. 3023–3030, 2014.
- MEHTA, A.; HABER, J. E. Sources of DNA double-strand breaks and models of recombinational DNA repair. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 9, p. 1–17, 2014.

- MELÉNDEZ-LAZO, A. *et al.* Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. **Research in Veterinary Science**, v. 117, p. 18–27, 2018.
- MENDES, W. DA S.; *et al.* Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis , Maranhão , Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 227–231, 2002.
- MENEZES, J. P. B. *et al.* Proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in macrophages infected with *Leishmania amazonensis* or *Leishmania major*. **Microbes and Infection**, v. 15, n. 8–9, p. 579–591, 2013.
- MENEZES-SOUZA, D. *et al.* Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.
- MIAO, T. *et al.* Egr2 and 3 control adaptive immune responses by temporally uncoupling expansion from T cell differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 6, p. 1787–1808, 9 maio 2017.
- MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p. 56-72
- MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365–368, ago. 2008.
- MOLINA, R. *et al.* Infectivity of dogs naturally *Phlebotomus perniciosus* infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, p. 491–493, 1994.
- MOREIRA, W. *et al.* Proteomic analysis of metacyclogenesis in *Leishmania infantum* wild-type and PTR1 null mutant. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 171–183, 2014.
- MOREIRA, V. R. *et al.* Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. 1–10, 2017.
- NAGASE, H. *et al.* Expression and Function of Toll-Like Receptors in Eosinophils: Activation by Toll-Like Receptor 7 Ligand. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 8, p. 3977 LP – 3982, 15 out. 2003.
- NASCIMENTO, P. R. P. DO. Perfil Transcricional E Alterações Histopatológicas Na Leishmaniose Visceral Canina. 2016.

- 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**, v. 8, n. 12, 2013.
- NUNES, C. M. *et al.* Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 1–2, p. 19–23, maio 2008.
- ORTIZ, R. C.; ANVERSA, L. Epidemiologia da leishmaniose visceral em Bauru, São Paulo, no período de 2004 a 2012: um estudo descritivo. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 24, n. 1, p. 97–104, 2015.
- PAUN, A. *et al.* Critical role of IRF-5 in the development of t helper 1 responses to Leishmania donovani infection. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2011.
- PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–4, 15 ago. 2008.
- PINELLI, E. *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum. **Infection Immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1 jan. 1994.
- PINELLI, E. *et al.* Infection of a canine macrophage cell line with Leishmania infantum: Determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 3, p. 181–189, 2000.
- PINELLI, E. *et al.* Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 6, p. 1594–1600, 1995.
- QUINNELL, R. J. *et al.* Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, n. 1, p. 23–28, 2003.
- 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.
- REINER, S.L. e LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annual Review Immunology**, v. 13, p. 151-177, 1995.
- REIS, A B. *et al.* Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–11, nov. 2006a.

- REIS, A. B. *et al.* Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 102–116, 15 ago. 2006c.
- REIS, A. B. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006b.
- ROCHA, M. I. *et al.* *Leishmania infantum* Enhances Migration of Macrophages via a Phosphoinositide 3-Kinase \hat{I} -Dependent Pathway. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 1643–1649, 2020.
- RODRÍGUEZ, N. E.; WILSON, M. E. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. **Immunologic Research**, v. 59, n. 1–3, p. 129–141, 2014.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: Methodology and applications. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, n. 1–2, p. 225–254, 1999.
- ROJO, D. *et al.* A multiplatform metabolomic approach to the basis of antimonial action and resistance in *Leishmania infantum*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015.
- SANTOS-GOMES, G. M.; CAMPINO, L.; ABRANCHES, P. Canine experimental infection: intradermal inoculation of *Leishmania infantum* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 193–198, 2000.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N. *et al.* Regional parasite density in the skin of dogs with symptomatic canine leishmaniosis. **Veterinary Dermatology**, v. 18, n. 4, p. 227–233, ago. 2007.
- SCHLEIN, Y. *Leishmania* and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 9, n. 7, p. 255–8, jul. 1993.
- 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. 17, 2019.
- SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671–83, 1996.
- SILVA, E. S. *et al.* Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285–91, abr. 2001.
- SILVA, J. G. D. E. *et al.* Infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* por *Leishmania* sp. em Teresina, Piauí, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 7, p. 1715–1720, jul. 2007.

SILVA, K. R. *et al.* Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 53–62, 2017.

SILVA, M. S. **Estresse oxidativo em Leishmania amazonensis: do encurtamento dos telômeros ao deslocamento de LaRPA-1 do complexo**. 2014. 102 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 2014.

SILVA, J. N. *et al.* Immunohaematological and rheological parameters in canine visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 27, n. 2, p. 211–217, 2018.

SILVA-O'HARE, J. *et al.* Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: Changes in homing and survival of plasma cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2016.

SINAN/SVS/MS. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2017**. Brasília, MS, 2019.

SINGH, A. K. *et al.* Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 5, p. 1853–1868, 2015.

SINGH, N.; SUNDAR, S. Integrating genomics and proteomics permits identification of immunodominant antigens associated with drug resistance in human visceral leishmaniasis in India. **Experimental Parasitology**, v. 176, n. March, p. 30–45, 2017.

SINGH, O. P. Analysis of Total Urine Proteins: Towards a Non-Invasive Approach for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis**, v. 03, n. 04, p. 1–7, 2012.

SOARES, M. R. A. *et al.* Análise molecular da infecção natural de *Lutzomyia longipalpis* em área endêmica de leishmaniose visceral no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, n. 12, p. 2409–2413, 2010.

SOLCÀ, M. S. *et al.* Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. September, p. 1–7, 2016.

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 Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, p. e0009137, 2021.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. 1 ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013. 64p.

TERRAZZANO, G. *et al.* Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3–4, p. 331–337, 2006.

TORRECILHA, R. B. P. *et al.* Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 132, p. 83–87, 2016.

TRAVI, B. L. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 64, n. 3–4, p. 119–24, 2001.

TRAVLOS, G. S. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, p. 548-567, 2006.

VAKILI, B. *et al.* A new multi-epitope peptide vaccine induces immune responses and protection against *Leishmania infantum* in BALB/c mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 209, n. 1, p. 69–79, 2020.

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.

VERAS, P. S. T.; RAMOS, P. I. P.; DE MENEZES, J. P. B. In search of biomarkers for pathogenesis and control of leishmaniasis by global analyses of leishmania-infected macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2018.

VEREMEYKO, T. *et al.* Early Growth Response Gene-2 Is Essential for M1 and M2 Macrophage Activation and Plasticity by Modulation of the Transcription Factor CEBP β . **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2515, 2018.

VOULDOUKIS, I. *et al.* Canine visceral leishmaniasis: Successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 253–256, 1996.

WERNECK, G. L. *et al.* Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, v. 31, n. 3, p. 174–177, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **South-East Asia poised to defeat visceral leishmaniasis (kala-azar)**. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/news/SEARO_poised_to_defeat_VL/en/> WHO, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. WHO, 2019a.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Informe Epidemiológico das Américas**. WHO, 2019c.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. 2020. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> />

ZAFRA, R. *et al.* High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3–4, p. 353–359, 2008.

9. ANEXO

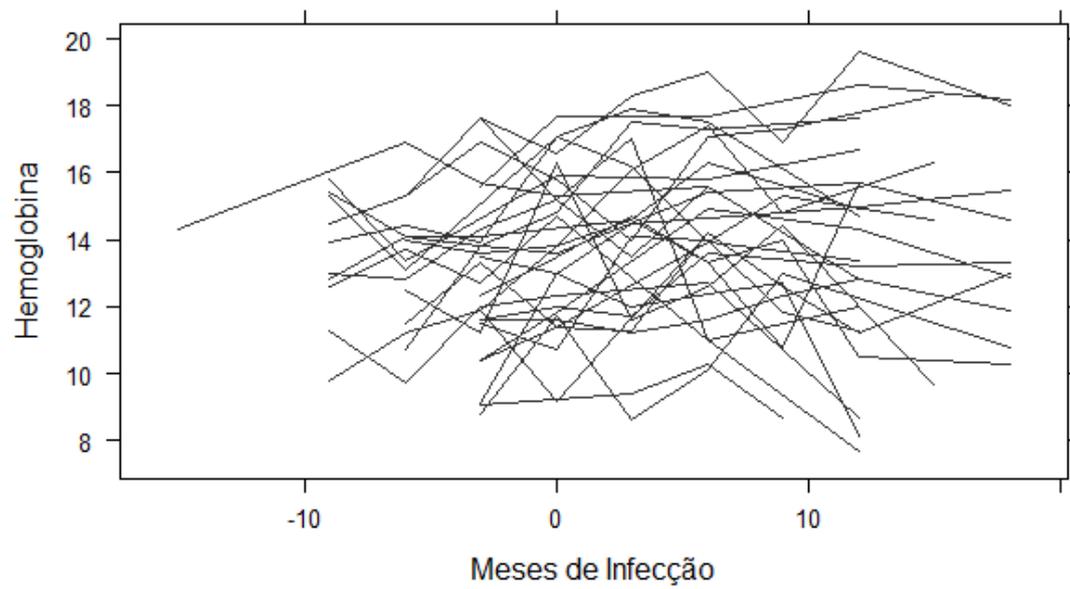
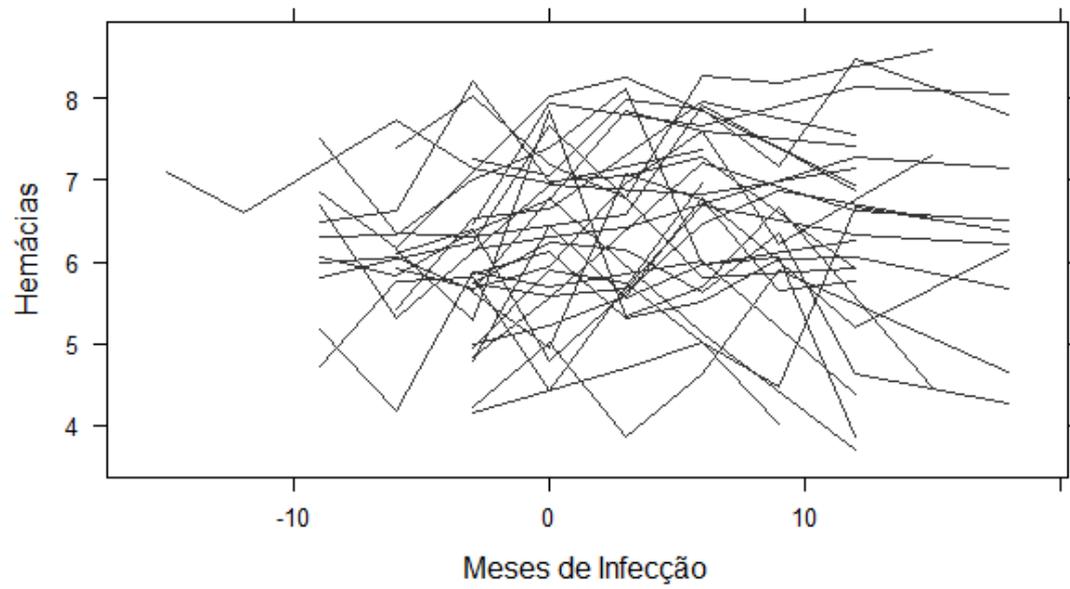
9.1 FICHA CLÍNICA

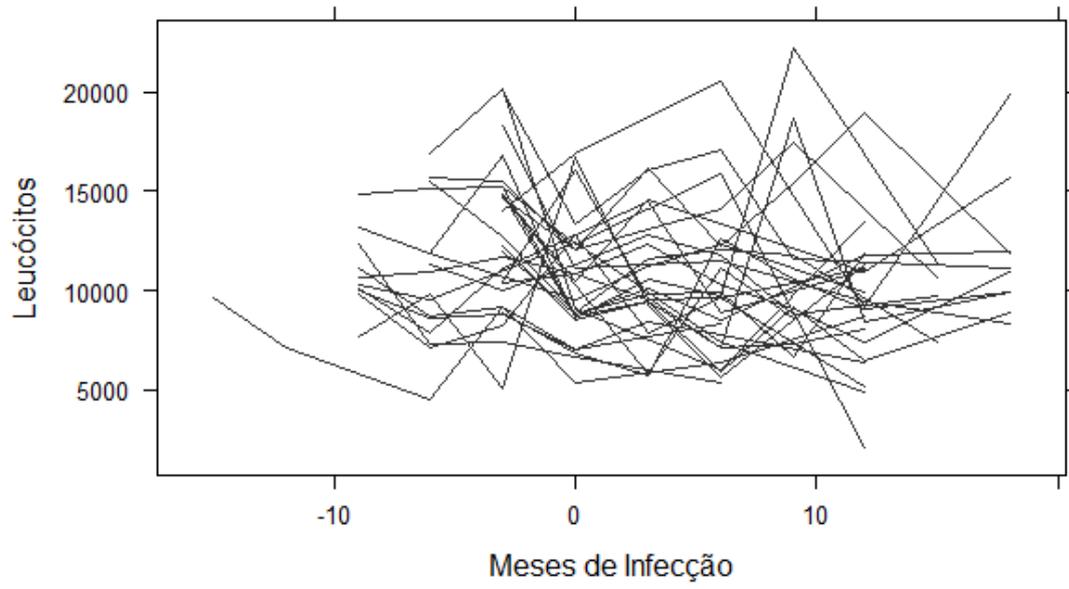
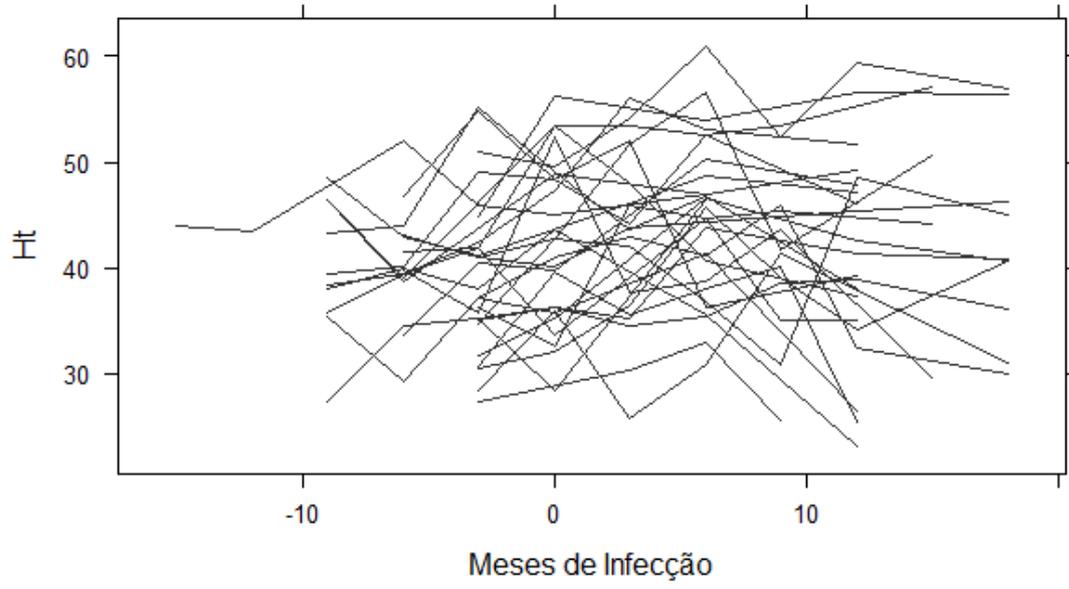
Clinical signs	Score based on intensity		
	0	1	2
Nutritional status	Normal or obese	Emaciate	Cachectic
Mucosa color	Normal	Pale	—
Periocular dermatitis	Absent	Around one eye	Present around two eyes
Crust on ears	Absent	Present in one ear	Present in two ears
Ear Ulcers	Absent	Present in one ear	Present in two ears
Muzzle Depigmentation	Absent	In less than 1/3 of the muzzle	In more than 1/3 of the muzzle
Muzzle Hyperkeratosis	Absent	In less than 1/3 of the muzzle	In more than 1/3 of the muzzle
Muzzle Lesions	Absent	Initial mucous lesion	Larger ulcerated lesion
Spleen size	Not palpable	Enlarged	—
Onychogryphosis	Absent	Slight enlargement	Excessive enlargement
Alopecia	Absent	Focal	In more than 1/3 of the body
Seborrheic dermatitis	Absent	Focal	In more than 1/3 of the body
Lymphadenomegaly	Absent	One or two enlarged lymph nodes of the same pair	Enlarged lymph nodes of different pairs

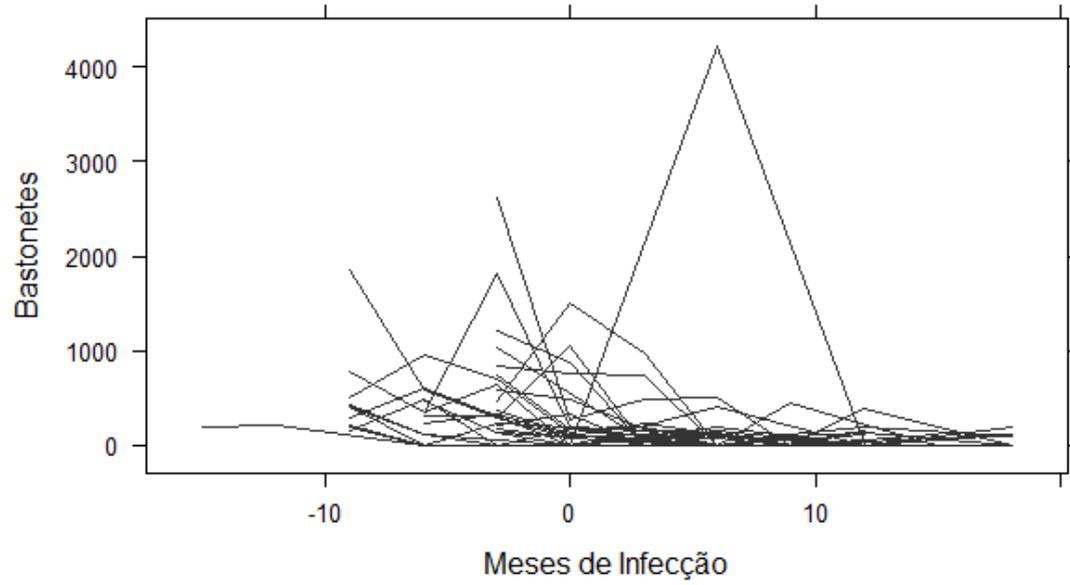
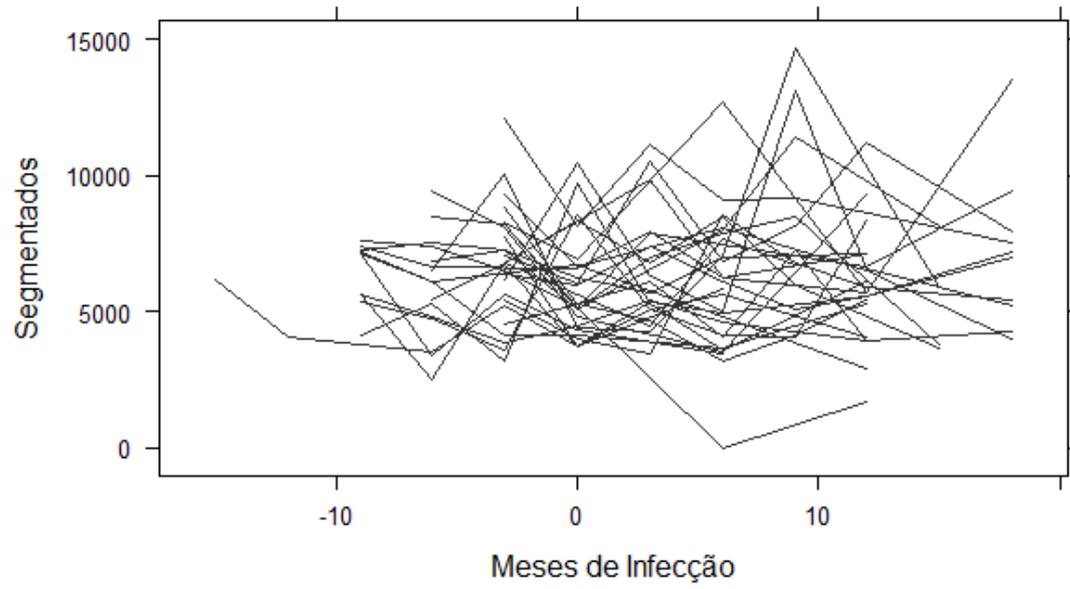
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009137.t001>

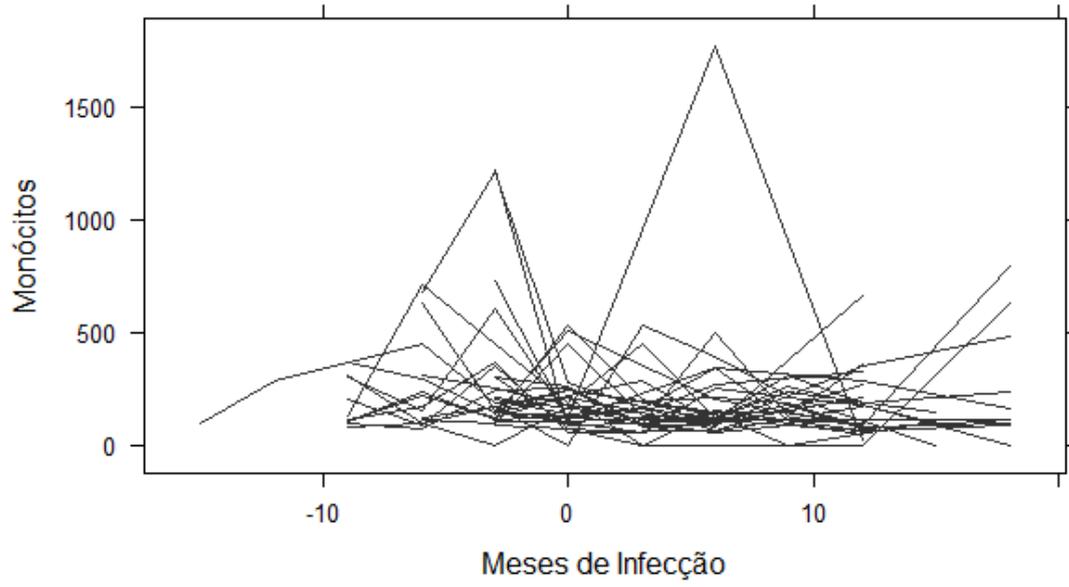
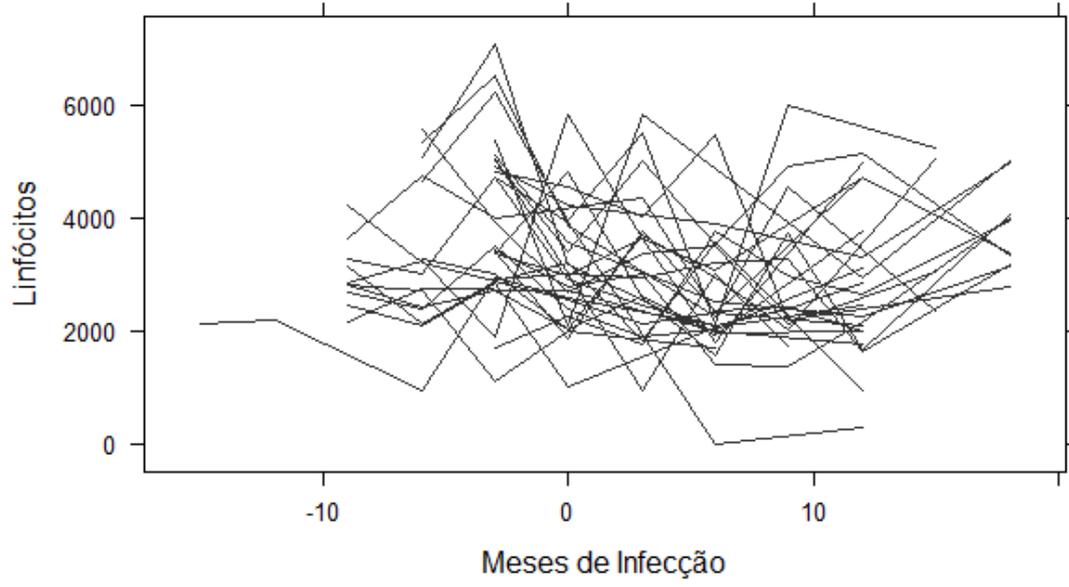
9.2 ANÁLISES DESCRITIVAS

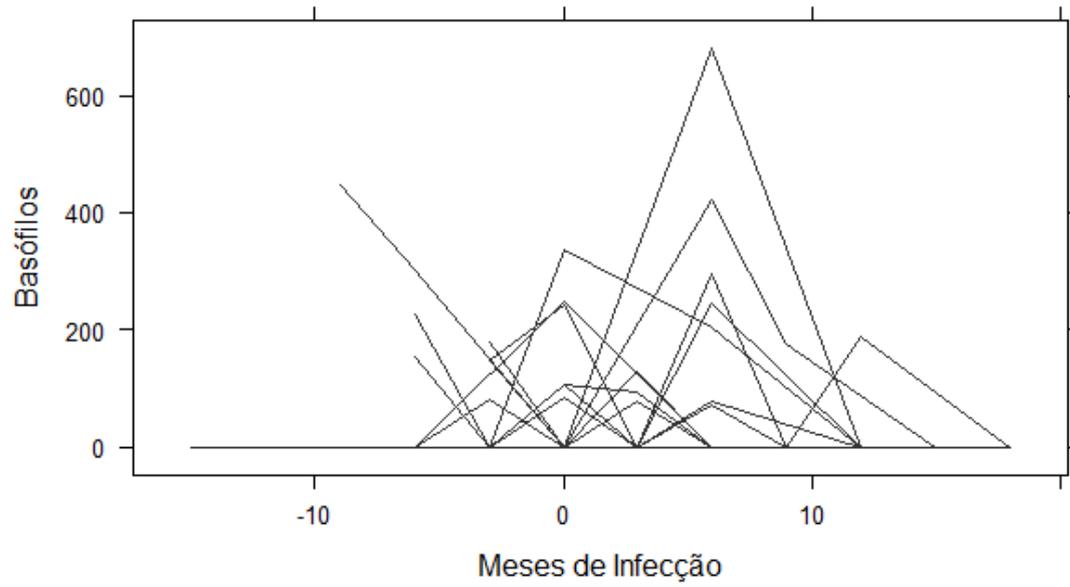
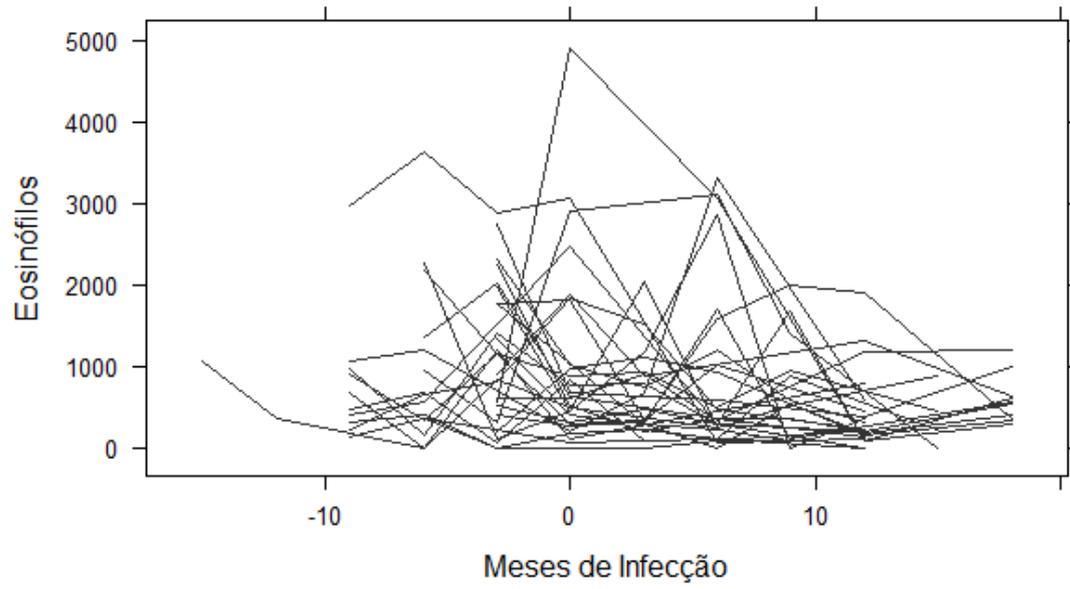
- **Descrição das trajetórias longitudinais individuais (Spaghetti plot)**

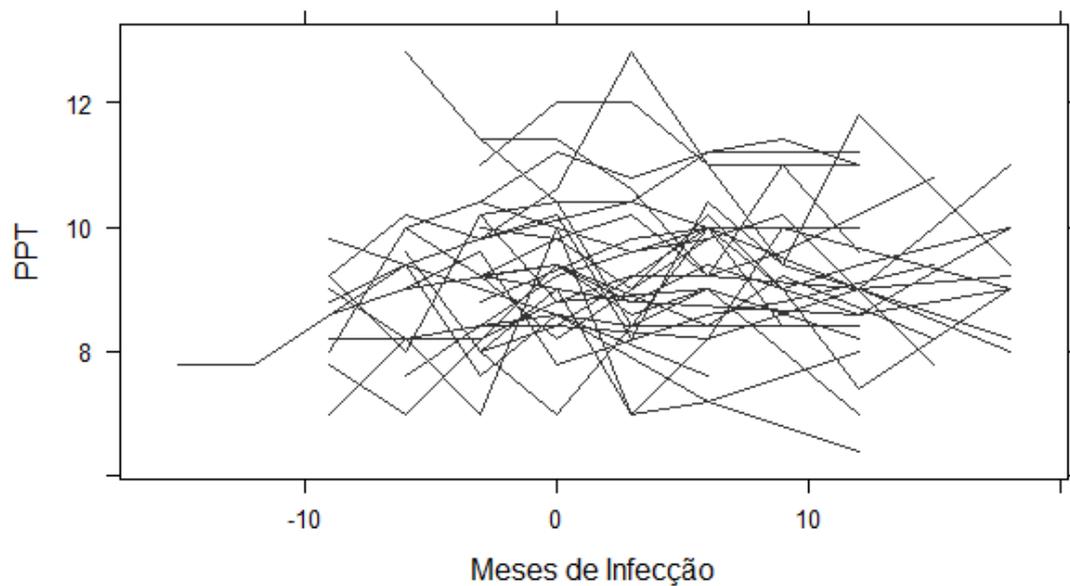
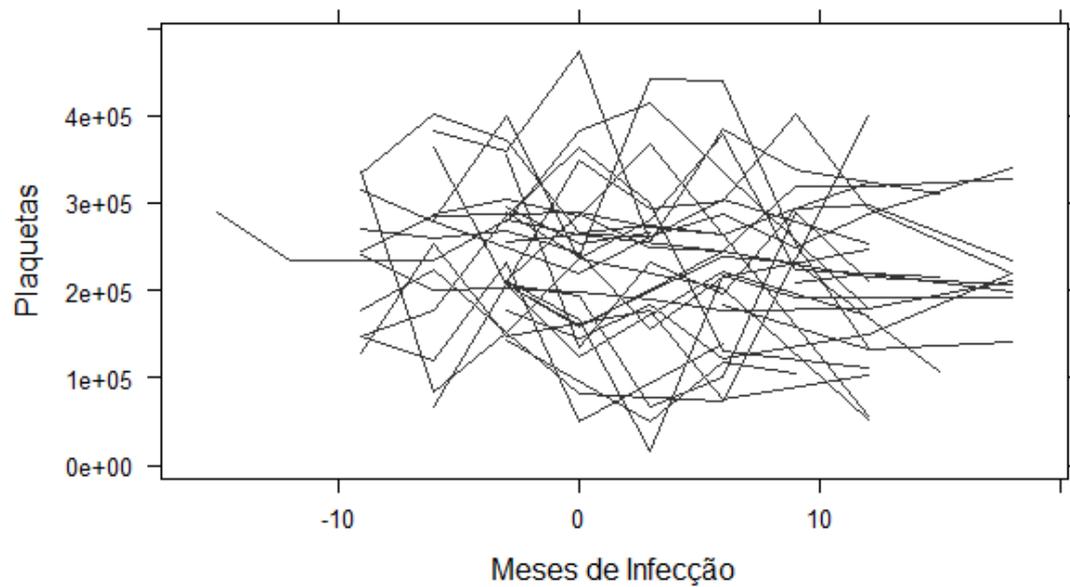












- **Descrição das médias longitudinais individuais**

- **Hemácias**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6 9
- 7.090000 6.600000 6.164000 6.086250 5.977778 6.385185 6.390500 6.626429 6.126154
- 12 15 18
- 6.248571 6.730000 6.284000

- **Hemoglobina**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6 9
- 14.30000 15.20000 13.44000 13.29500 12.89630 13.86852 13.93900 14.34643 13.43077
- 12 15 18
- 13.54905 14.72500 13.85000

- **Hematócrito**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6 9
- 43.90000 43.50000 39.91000 40.29375 39.40000 42.51481 42.96500 44.61071 41.00000
- 12 15 18
- 41.24286 45.37500 42.40000

- **Leucócitos**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6
- 9600.000 7100.000 11010.000 10787.500 12666.667 10477.778 10740.000 10164.286
- 9 12 15 18
- 12107.692 9319.048 9800.000 11850.000

- **Segmentados**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6 9
- 6144.000 4047.000 6451.900 5921.625 6817.852 5879.667 6487.700 5945.814 8079.385
- 12 15 18
- 5930.143 5380.000 7157.500

- **Bastonetes**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6
- 192.00000 213.00000 520.40000 284.68750 496.66667 234.62963 168.85000 223.21429
- 9 12 15 18
- 49.38462 46.95238 26.75000 51.70000

- **Linfócitos**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6 9
- 2112.000 2201.000 3003.200 3346.125 3943.037 3053.444 3249.700 2514.714 3053.308
- 12 15 18
- 2732.952 3919.000 3780.500

- **Monócitos**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6 9
- 96.0000 284.0000 180.2000 277.0000 292.0370 192.3704 153.2500 223.8571 167.9231
- 12 15 18
- 178.7619 88.0000 271.6000

- **Eosinófilos**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6
- 1056.0000 355.0000 809.6000 940.6875 1090.8519 1074.8519 665.4000 853.6071
- 9 12 15 18
- 744.2308 421.1905 386.2500 588.7000

- **Basófilos**

- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6
- 0.000000 0.000000 44.700000 42.687500 26.222222 41.703704 15.100000 71.428571
- 9 12 15 18
- 13.461538 9.047619 0.000000 0.000000

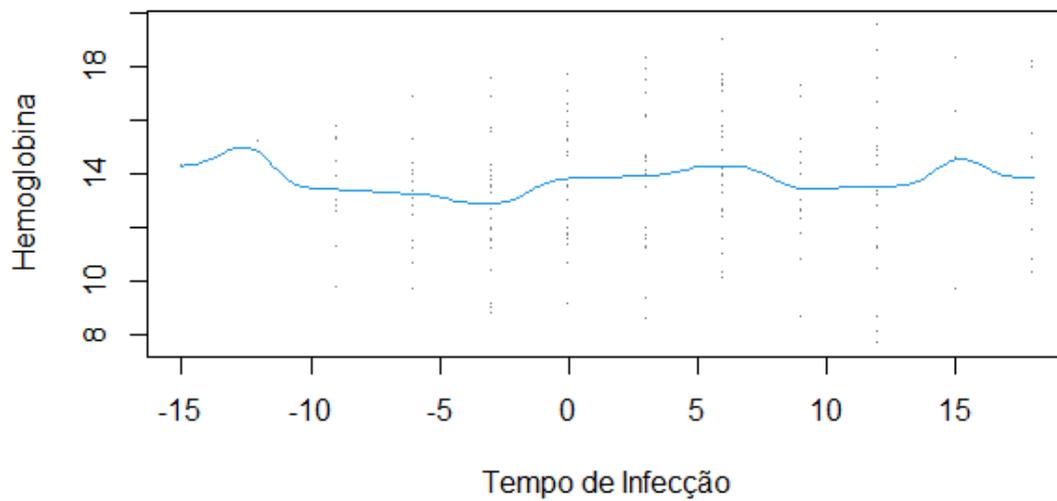
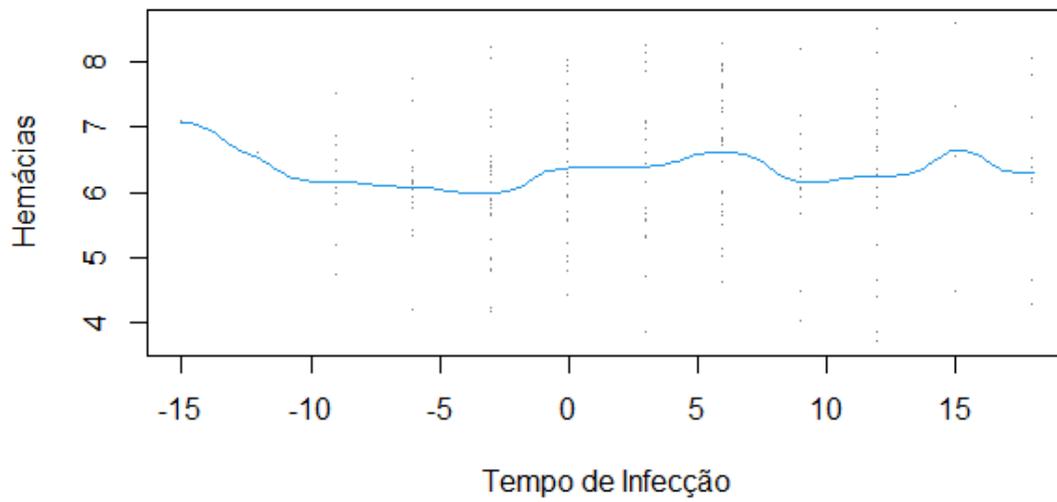
- **PLaquetas**

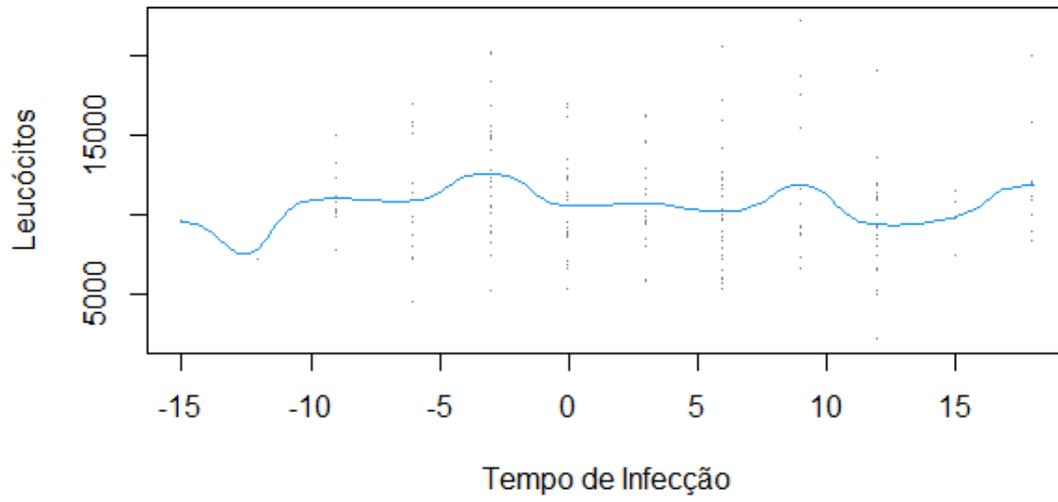
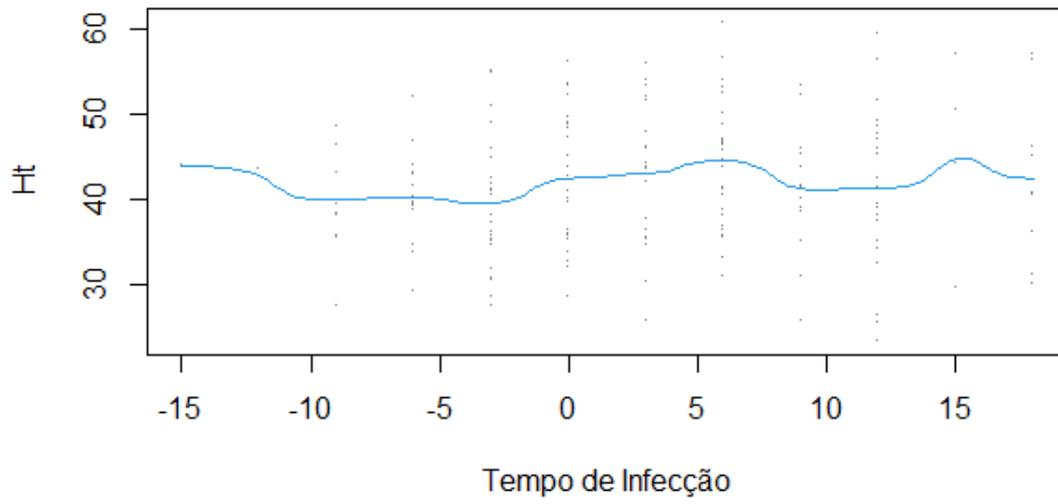
- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6 9
- 289000.0 234000.0 234070.0 243537.5 240059.3 NA 237335.0 NA NA
- 12 15 18
- 206469.0 245750.0 228900.0

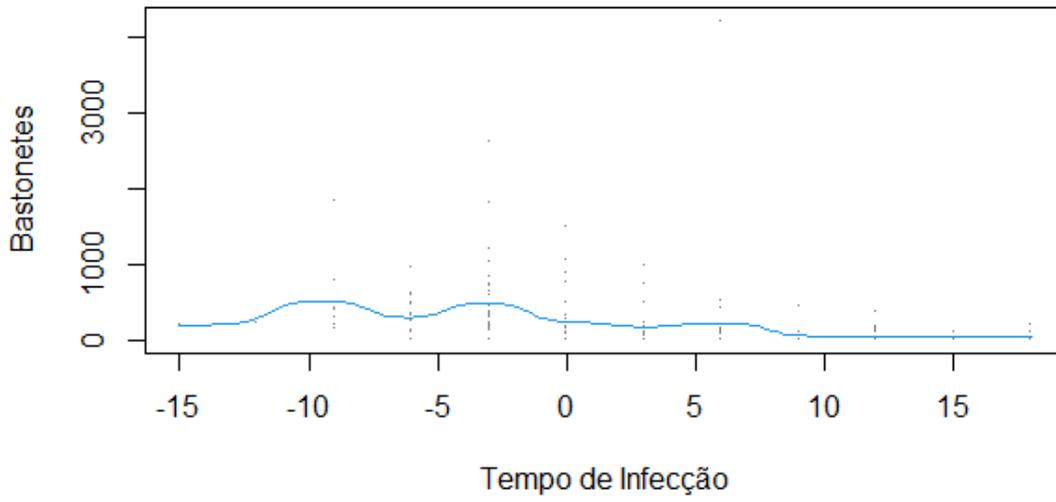
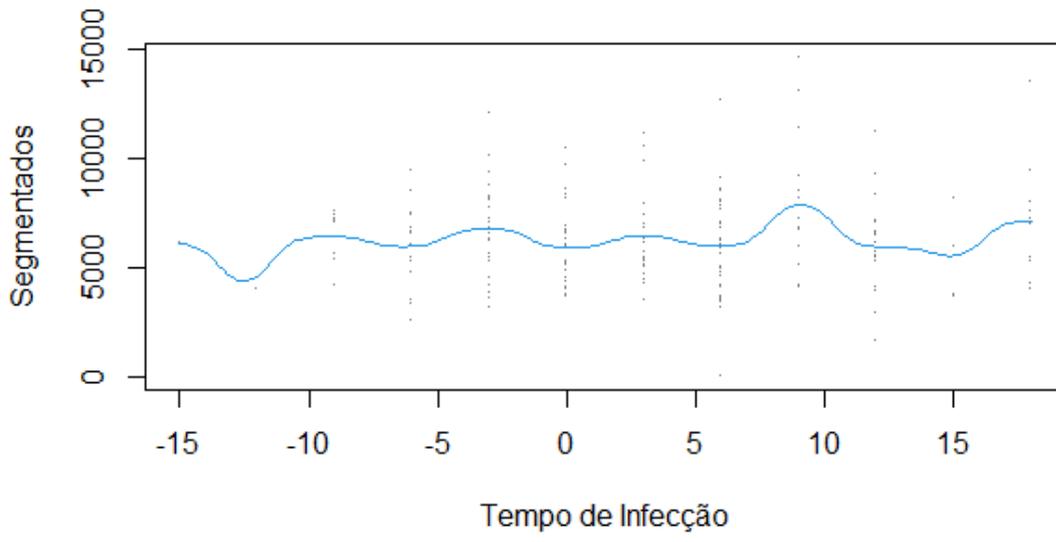
- **PPT**

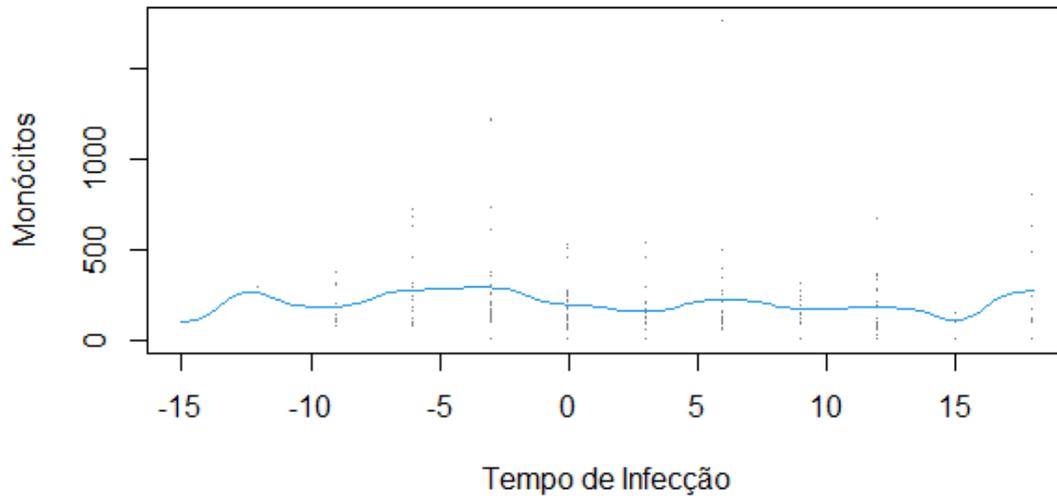
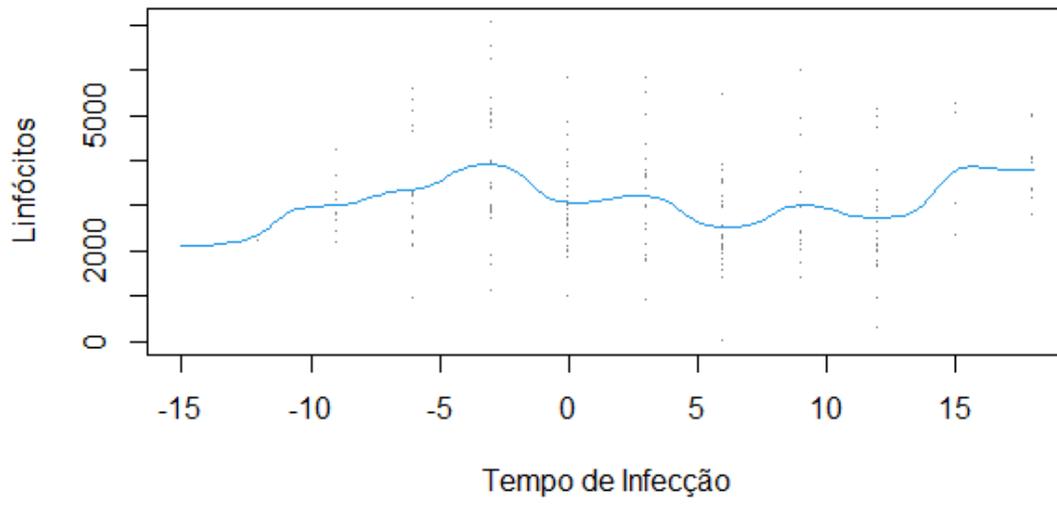
- -15 -12 -9 -6 -3 0 3 6 9
- 7.800000 7.800000 8.560000 9.125000 9.281481 9.422222 9.420000 9.371429 9.569231
- 12 15 18
- 9.038095 9.050000 9.280000

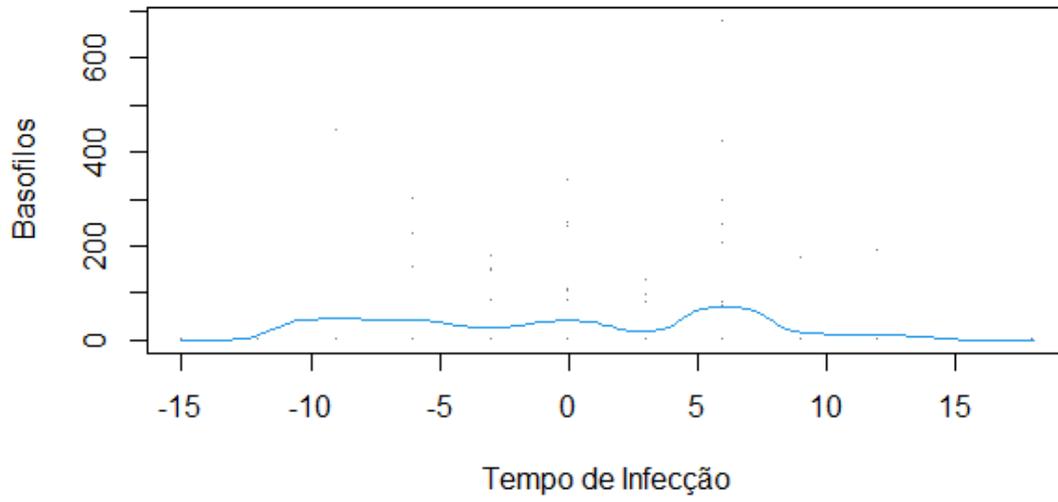
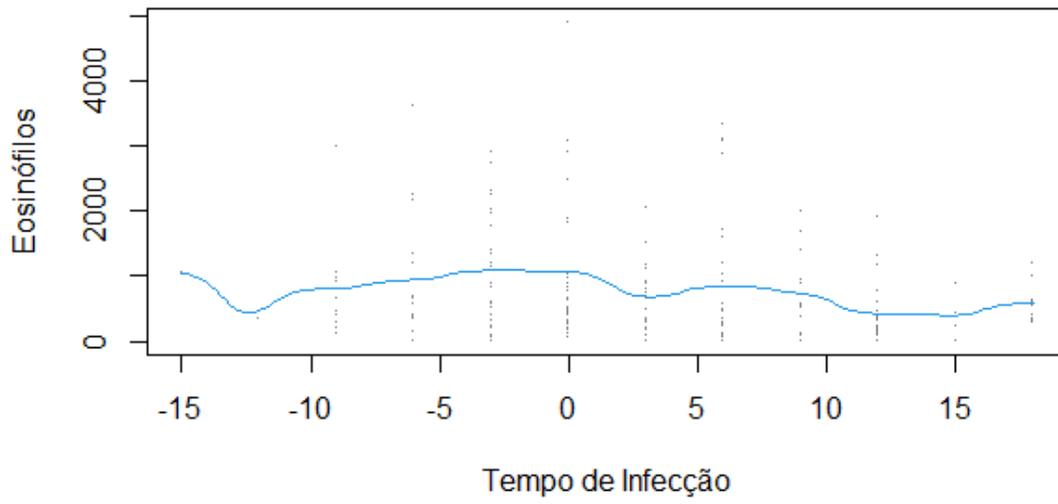
- **Uso de métodos de suavização (kernel) de curvas para análise de comportamento dos parâmetros hematológicos ao longo do tempo Kernel**

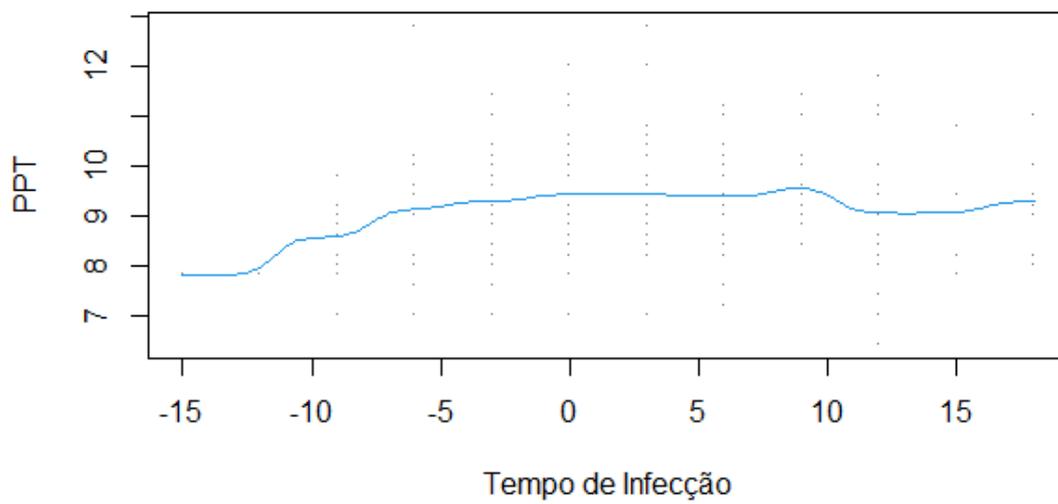
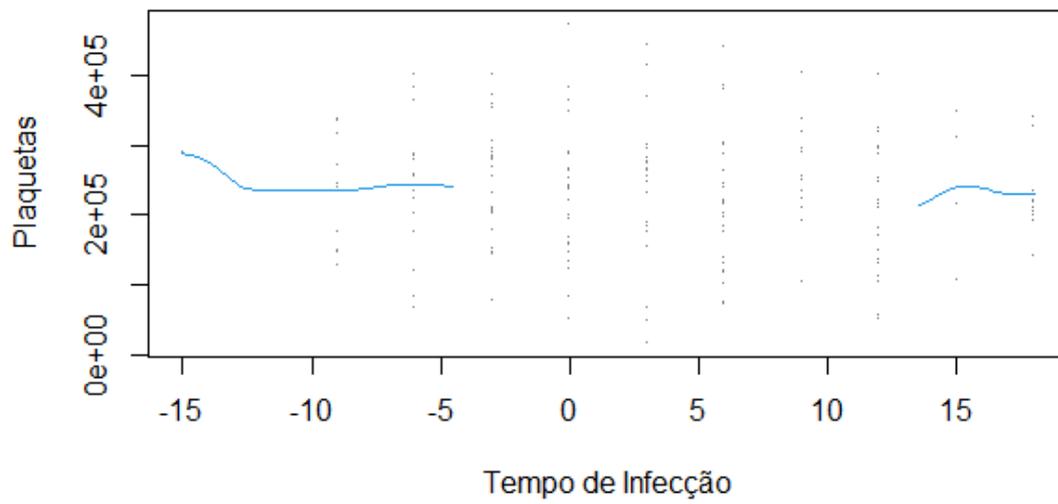




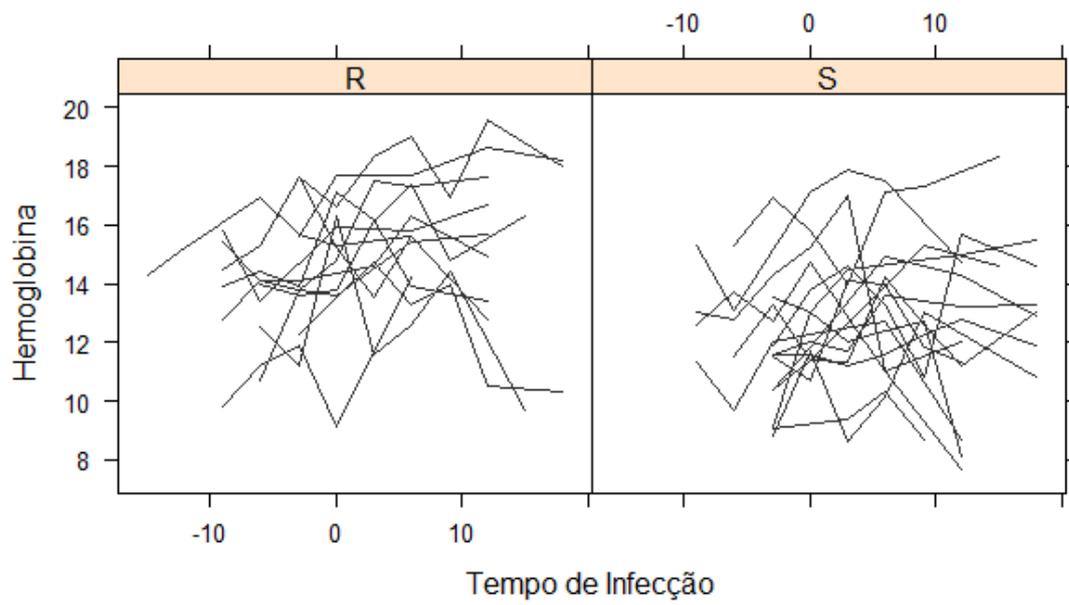
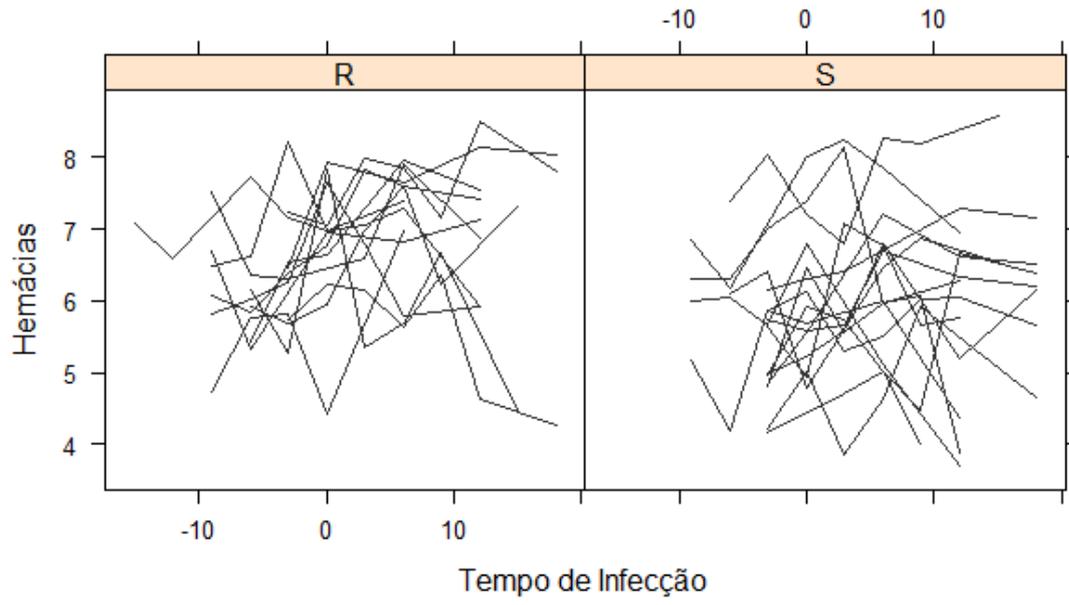


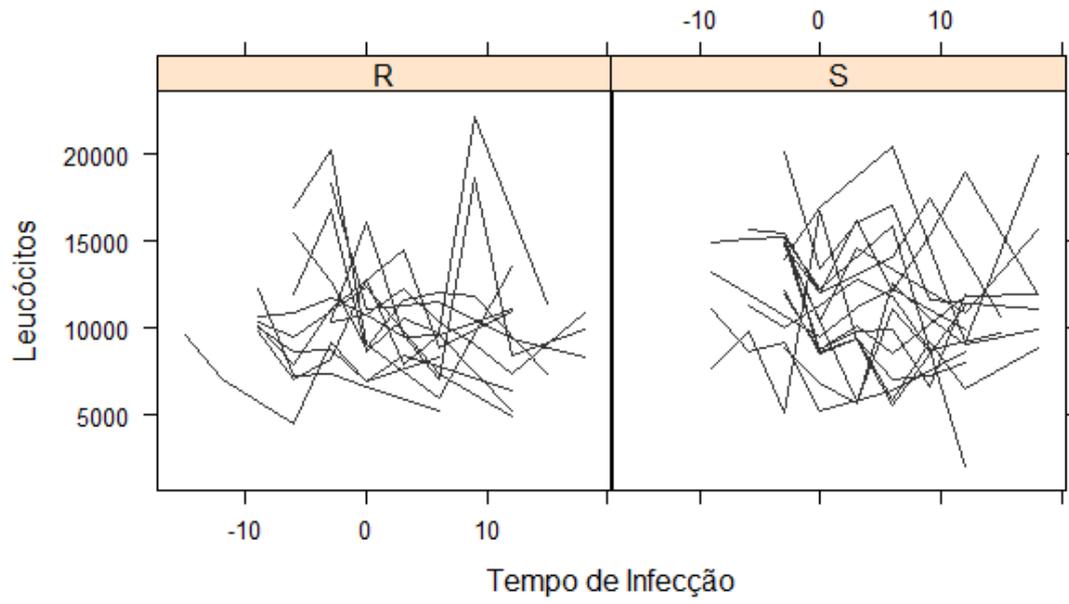
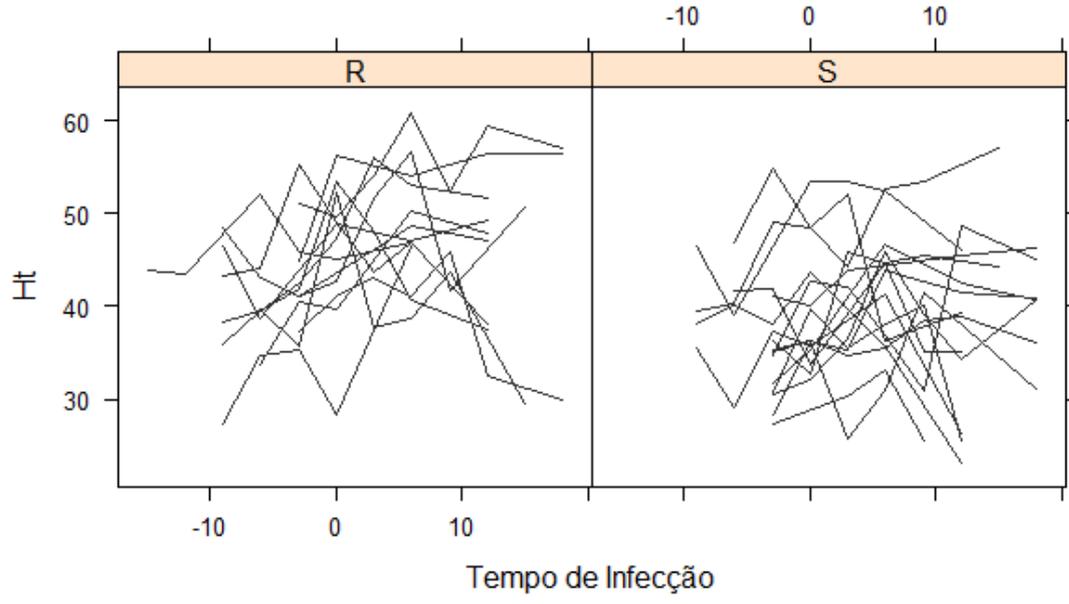


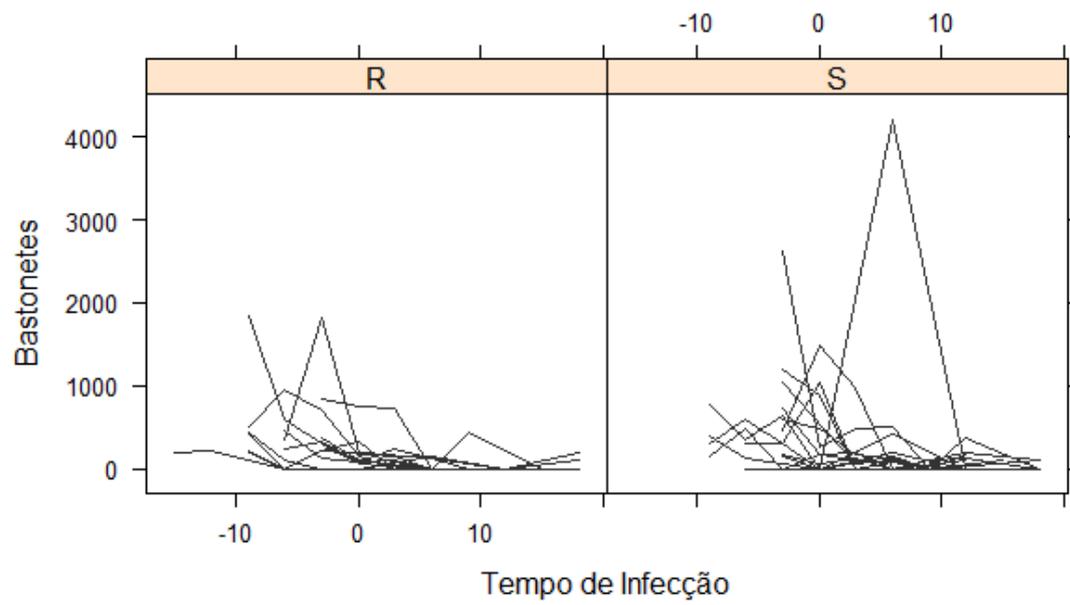
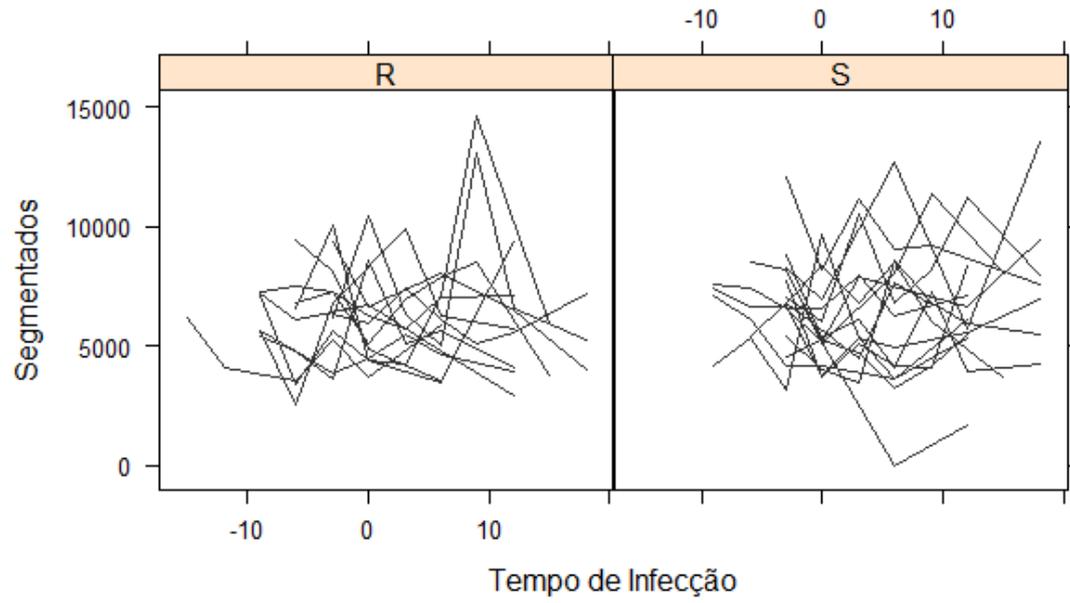


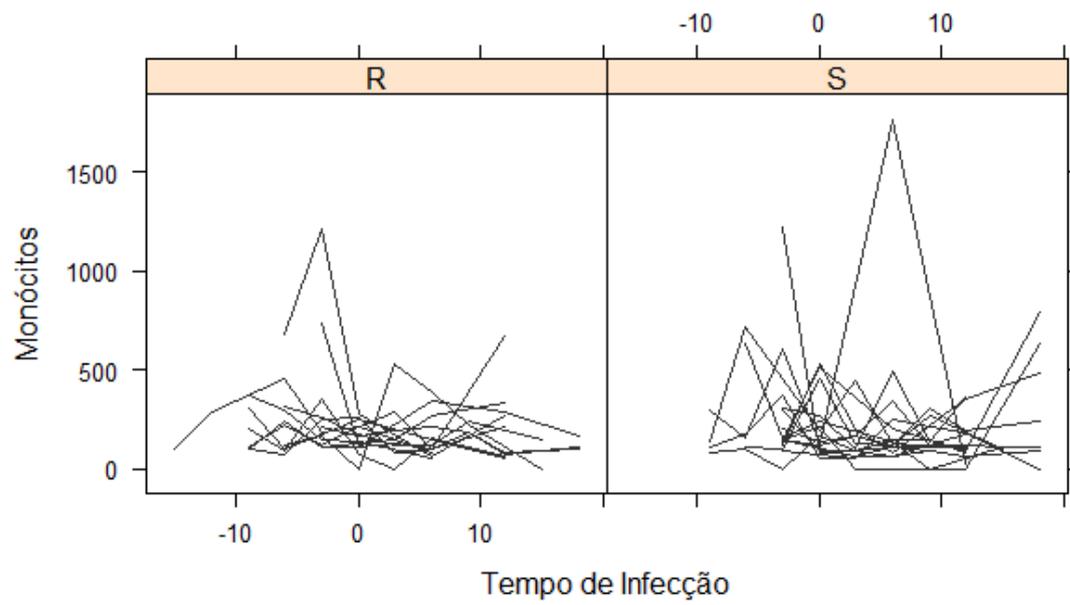
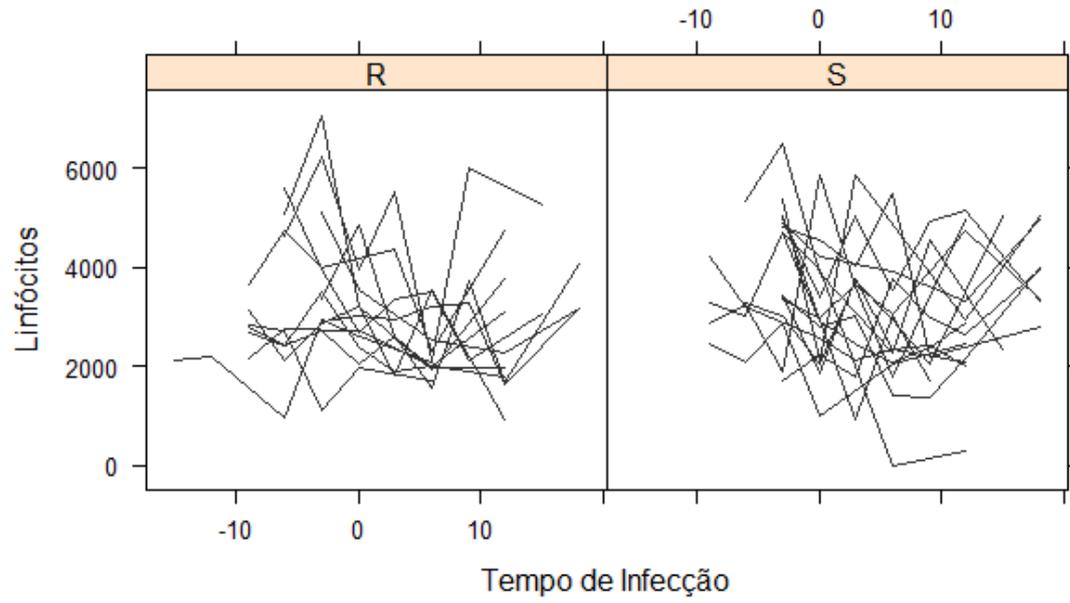


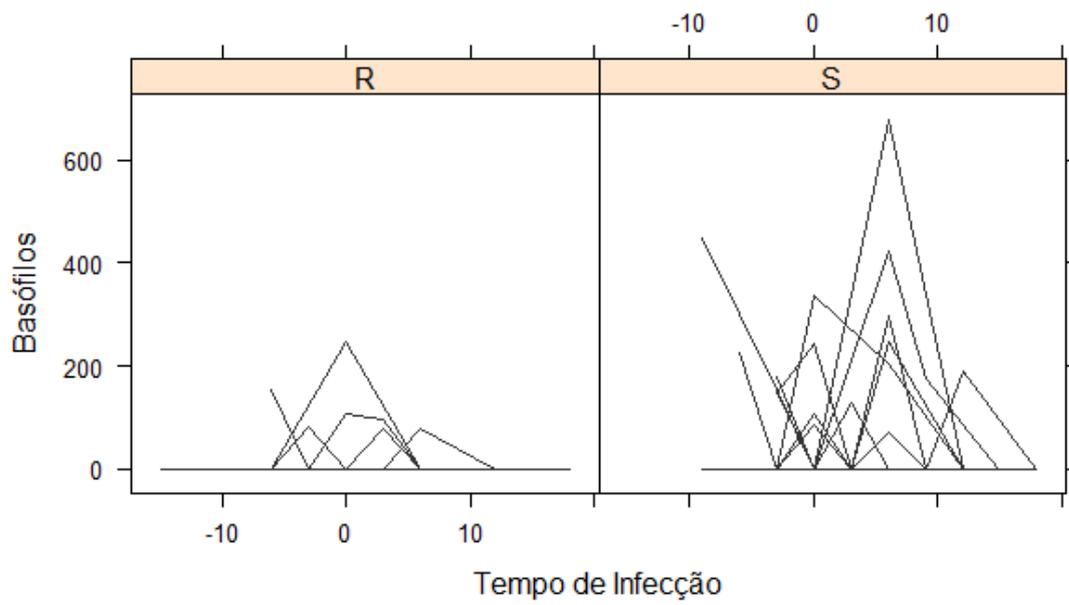
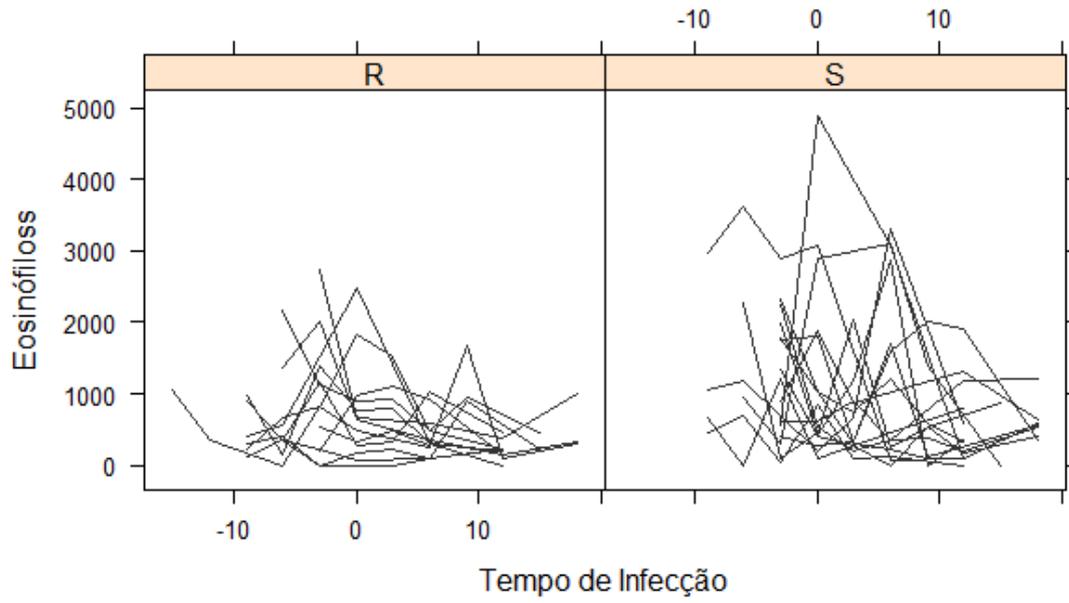
- **Comparar trajetórias de tendência segundo grupo de interesse (Spaghetii plot by group)**

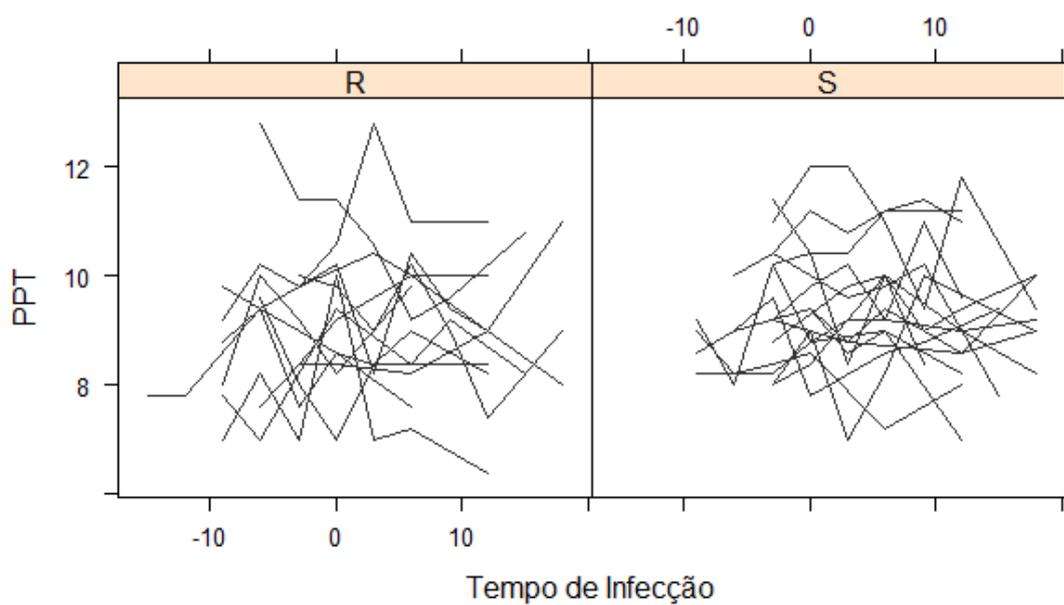
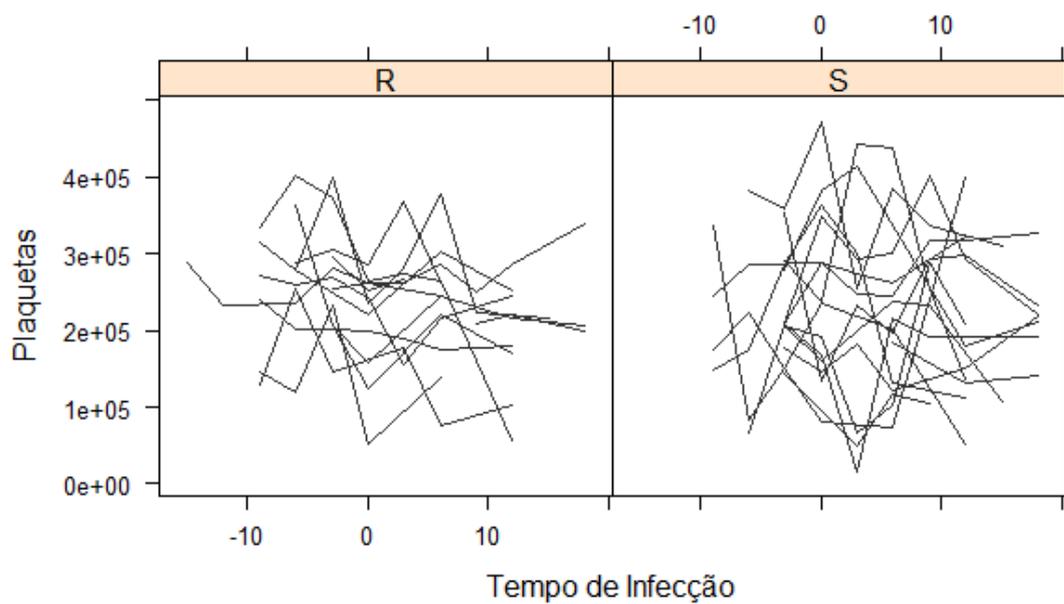












- **Perfis médios por grupo**

Hemácias

	mean.group1	mean.group2
-15	7.090000	6.082500
-12	6.600000	6.038333
-9	6.218333	5.621333
-6	6.115000	6.064667
-3	6.423333	6.091667
0	6.785833	6.222000
3	6.838750	5.916667
6	7.093077	5.760833
9	6.597500	7.565000

12	6.898889	6.102857
15	5.895000	6.082500
18	6.706667	6.038333

Hemoglobina

	mean.group1	mean.group2
-15	14.30000	13.05000
-12	15.20000	12.68667
-9	13.70000	11.80667
-6	13.66000	13.03333
-3	14.25833	13.02333
0	14.91250	13.17333
3	15.31250	12.72222
6	15.70000	12.06083
9	15.02500	16.45000
12	15.53333	13.14286
15	13.00000	13.05000
18	15.50000	12.68667

Hematócrito

	mean.group1	mean.group2
-15	43.90000	39.87500
-12	43.50000	39.48333
-9	39.93333	36.78667
-6	40.78000	39.61333
-3	42.66667	39.92500
0	46.14167	41.20667
3	47.52500	38.81111
6	48.53846	37.20833
9	45.92500	50.65000
12	46.62222	40.08571
15	40.10000	39.87500
18	47.80000	39.48333

Leucócitos

	mean.group1	mean.group2
-15	9600.000	11725.000
-12	7100.000	12083.333
-9	10533.333	13113.333
-6	10010.000	10780.000
-3	12108.333	10866.667
0	10100.000	11400.000
3	10550.000	10622.222
6	8738.462	9866.667
9	15450.000	10200.000
12	8588.889	12771.429
15	9400.000	11725.000
18	9700.000	12083.333

Segmentados

	mean.group1	mean.group2
-15	6144.000	6563.250
-12	4047.000	6557.833
-9	6377.667	6962.533
-6	5539.900	5821.467
-3	6637.000	6563.500
0	5952.417	6082.053
3	6374.000	7077.556

6	5788.615	6079.583
9	10333.500	5909.000
12	5730.889	7878.571
15	4851.000	6563.250
18	5475.000	6557.833

Bastonetes

	mean.group1	mean.group2
-15	192.00000	406.25000
-12	213.00000	312.50000
-9	596.50000	566.60000
-6	268.00000	305.53333
-3	409.25000	173.08333
0	146.00000	390.73333
3	162.50000	22.00000
6	29.92308	82.16667
9	111.00000	53.50000
12	0.00000	30.00000
15	0.00000	406.25000
18	102.33333	312.50000

Linfócitos

	mean.group1	mean.group2
-15	2112.000	3198.250
-12	2201.000	3361.667
-9	2873.167	4045.667
-6	3336.800	3088.133
-3	3814.750	3325.250
0	3010.083	2664.200
3	3136.375	2728.778
6	2342.231	2960.500
9	3783.500	3699.000
12	2429.556	3918.714
15	4139.000	3198.250
18	3458.000	3361.667

Monócitos

	mean.group1	mean.group2
-15	96.0000	154.5000
-12	284.0000	313.0000
-9	197.3333	269.8000
-6	255.4000	215.4000
-3	319.8333	132.9167
0	163.5833	275.9333
3	183.7500	150.6667
6	163.7692	143.9167
9	206.7500	102.0000
12	225.2222	334.5714
15	74.0000	154.5000
18	124.6667	313.0000

Eosinófilos

	mean.group1	mean.group2
-15	1056.0000	1291.0000
-12	355.0000	1450.3333
-9	488.6667	1227.0000
-6	634.9000	1296.1333
-3	920.6667	661.2500
0	798.2500	1243.4667
3	671.6250	623.7778
6	403.7692	584.6667

9	1015.2500	436.5000
12	203.2222	609.5714
15	336.0000	1291.0000
18	540.0000	1450.3333

Basófilos

	mean.group1	mean.group2
-15	0.000000	111.75000
-12	0.000000	88.00000
-9	0.000000	41.73333
-6	15.500000	51.33333
-3	6.833333	10.66667
0	29.666667	128.13333
3	21.750000	19.44444
6	6.000000	15.83333
9	0.000000	0.00000
12	0.000000	0.00000
15	0.000000	111.75000
18	0.000000	88.00000

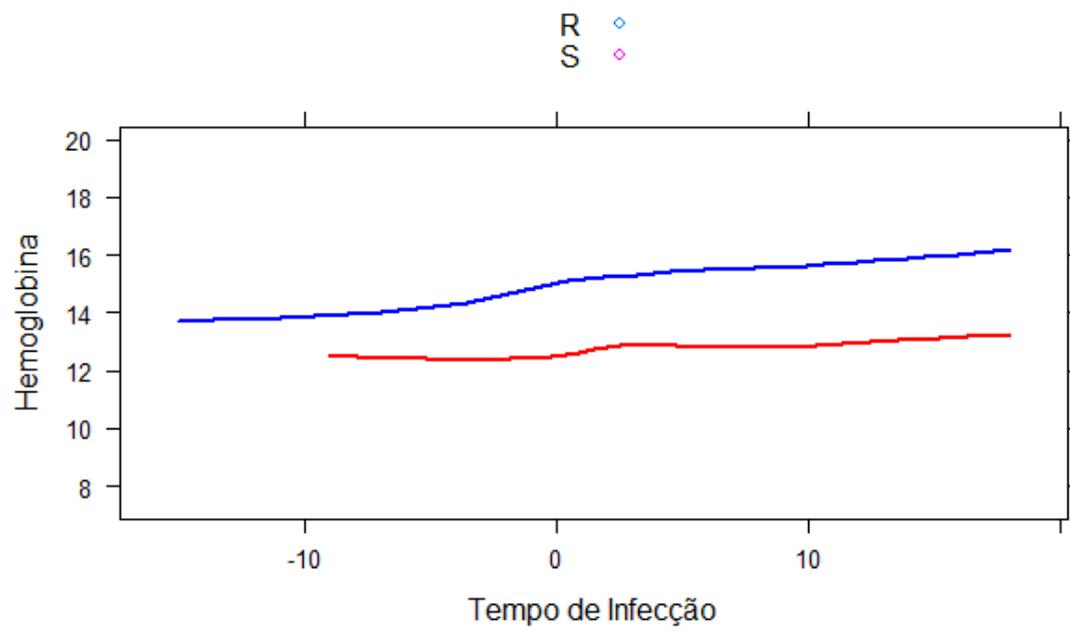
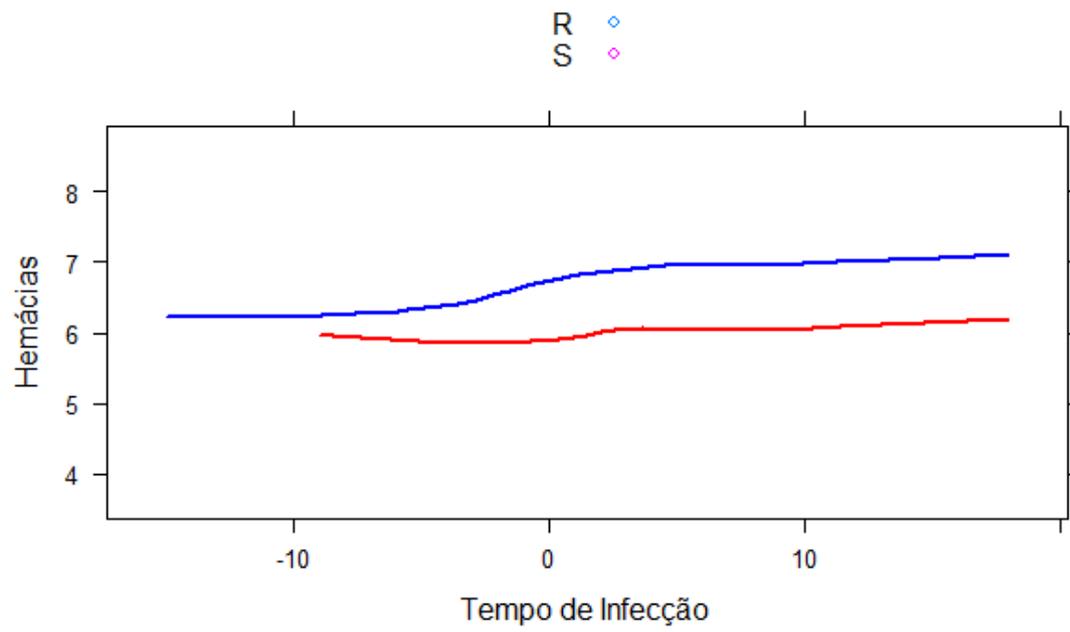
Plaquetas

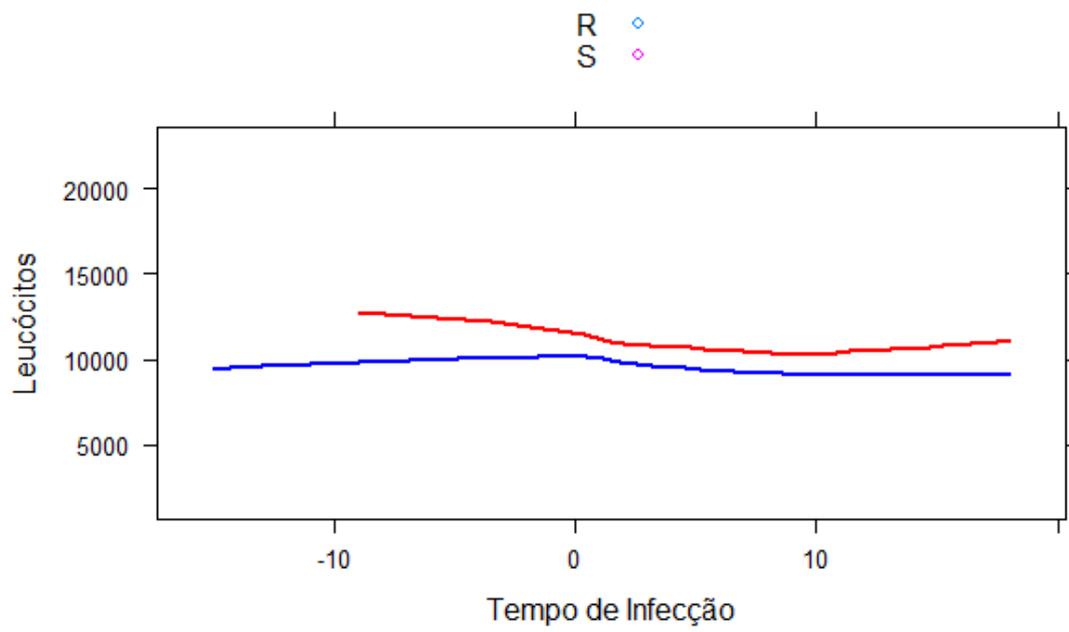
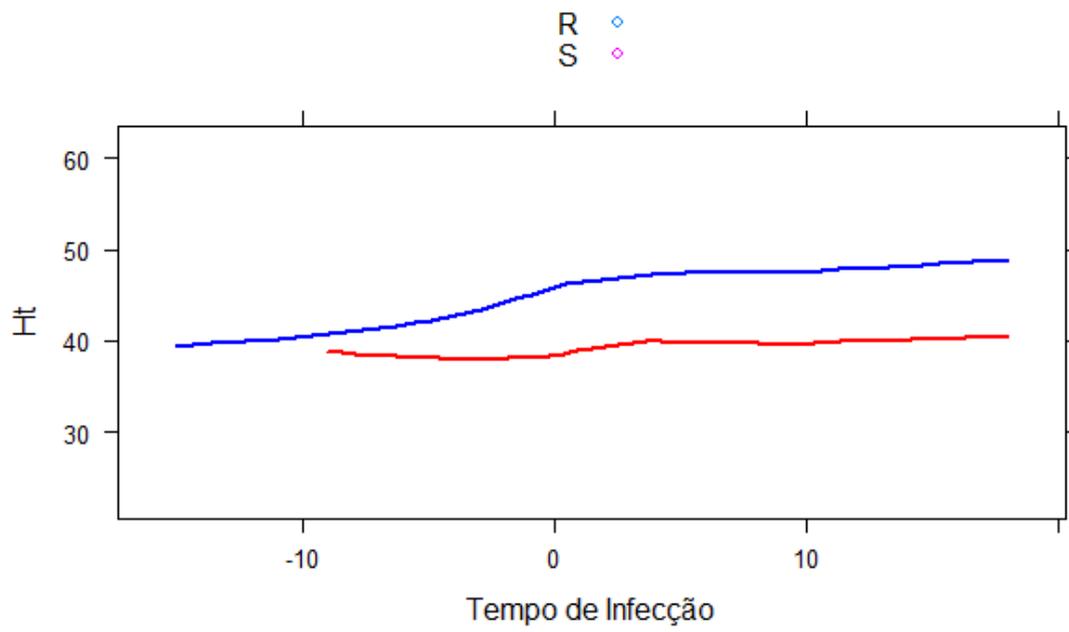
	mean.group1	mean.group2
-15	289000.0	226175.0
-12	234000.0	202766.7
-9	239333.3	220706.7
-6	268000.0	NA
-3	264250.0	231141.7
0	213250.0	214286.7
3	246625.0	269333.3
6	NA	217054.2
9	NA	209500.0
12	192355.6	220571.4
15	282000.0	226175.0
18	248333.3	202766.7

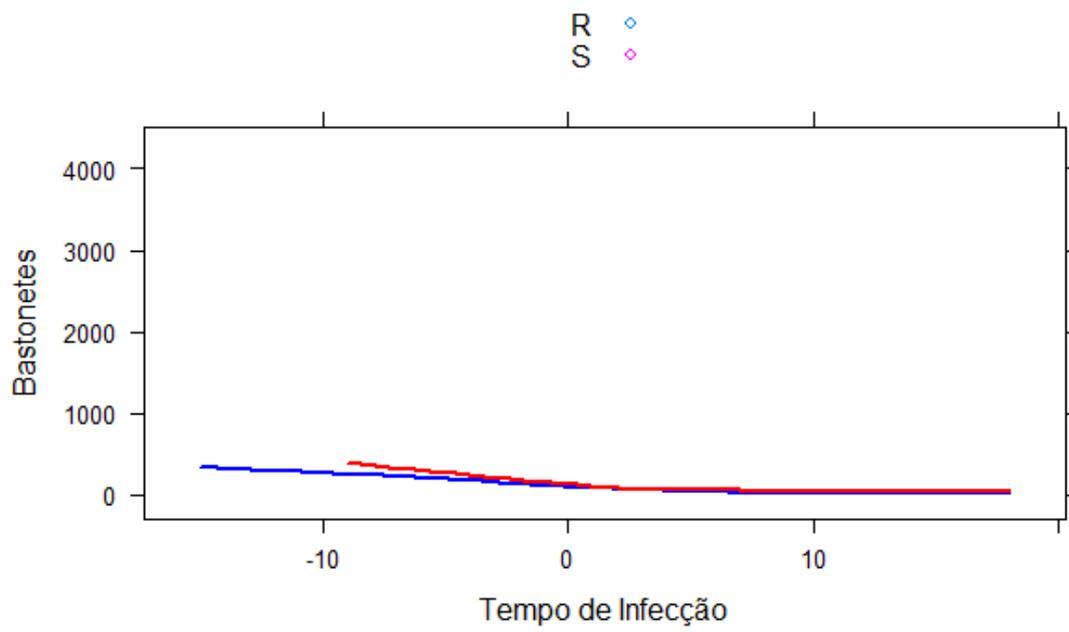
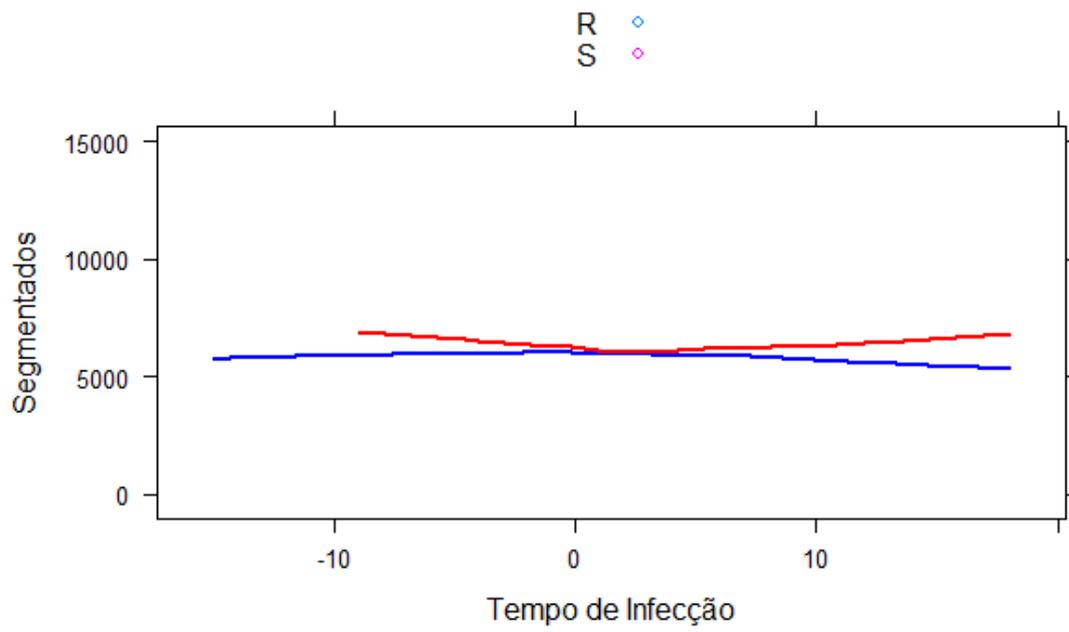
PPT

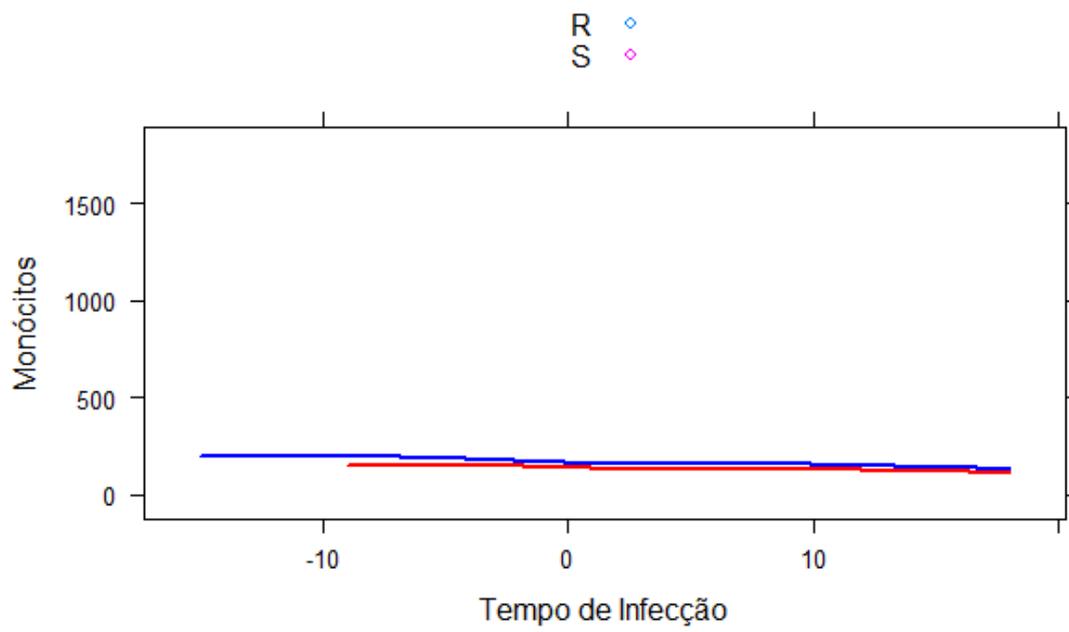
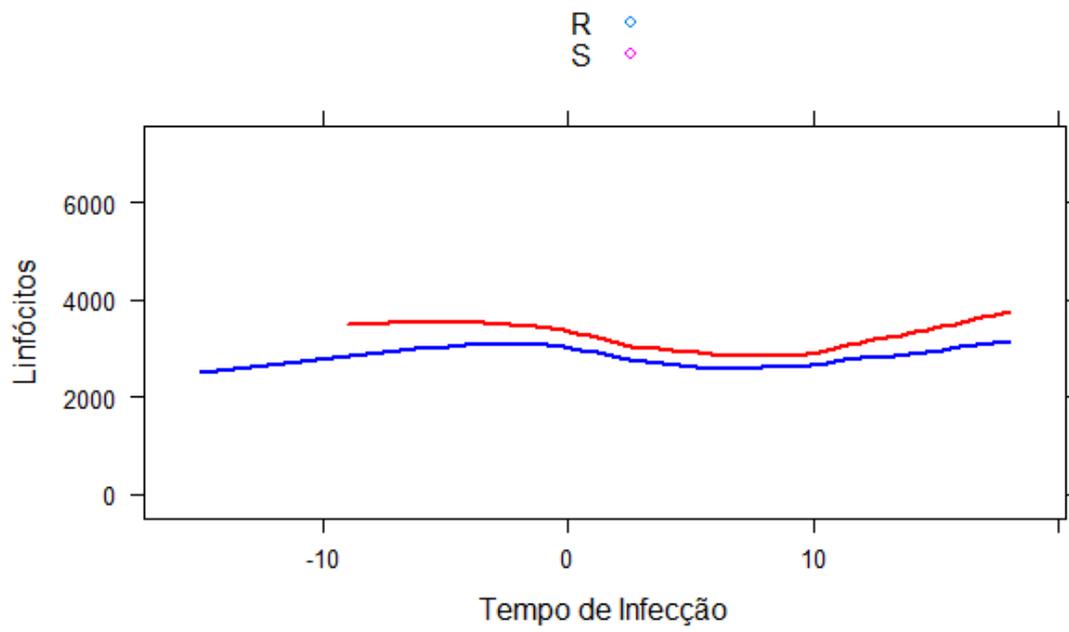
	mean.group1	mean.group2
-15	7.800000	8.750000
-12	7.800000	8.733333
-9	8.433333	9.480000
-6	9.360000	9.533333
-3	9.033333	9.466667
0	9.283333	9.533333
3	9.350000	9.688889
6	9.184615	9.283333
9	9.300000	8.600000
12	8.711111	9.257143
15	9.500000	8.750000
18	9.333333	8.733333

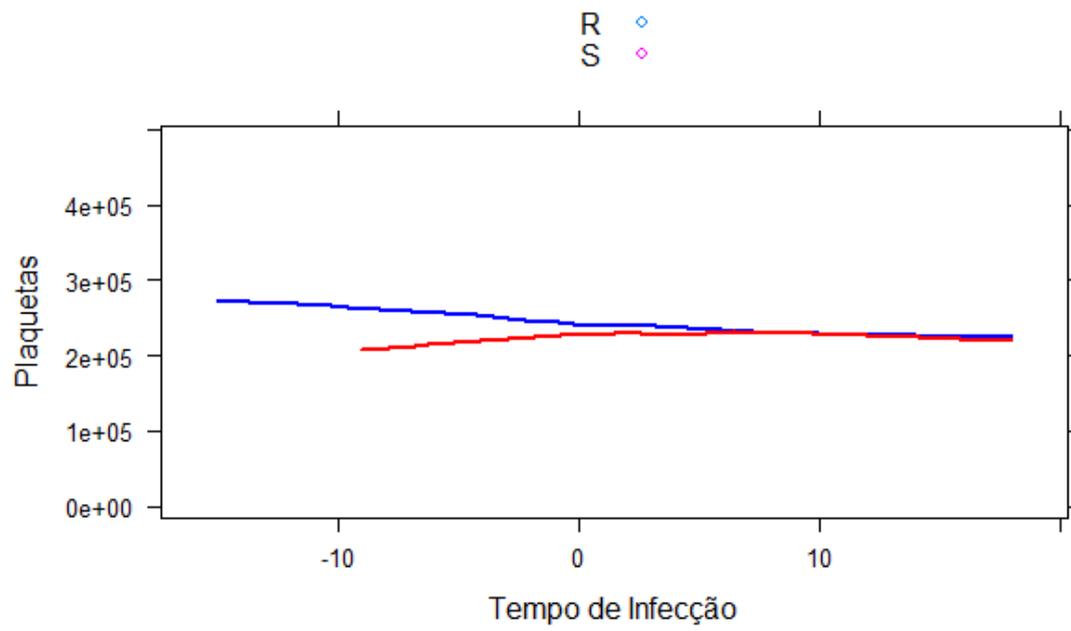
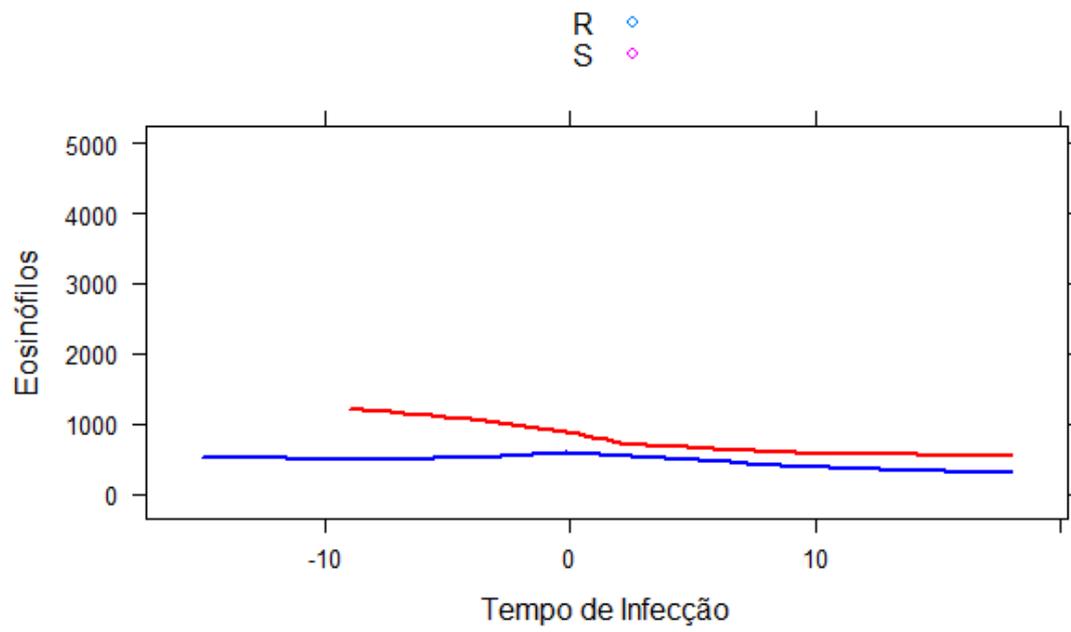
- **Uso de métodos de suavização (kernel) de curvas para análise de comportamento dos parâmetros hematológicos ao longo do tempo Kernel**

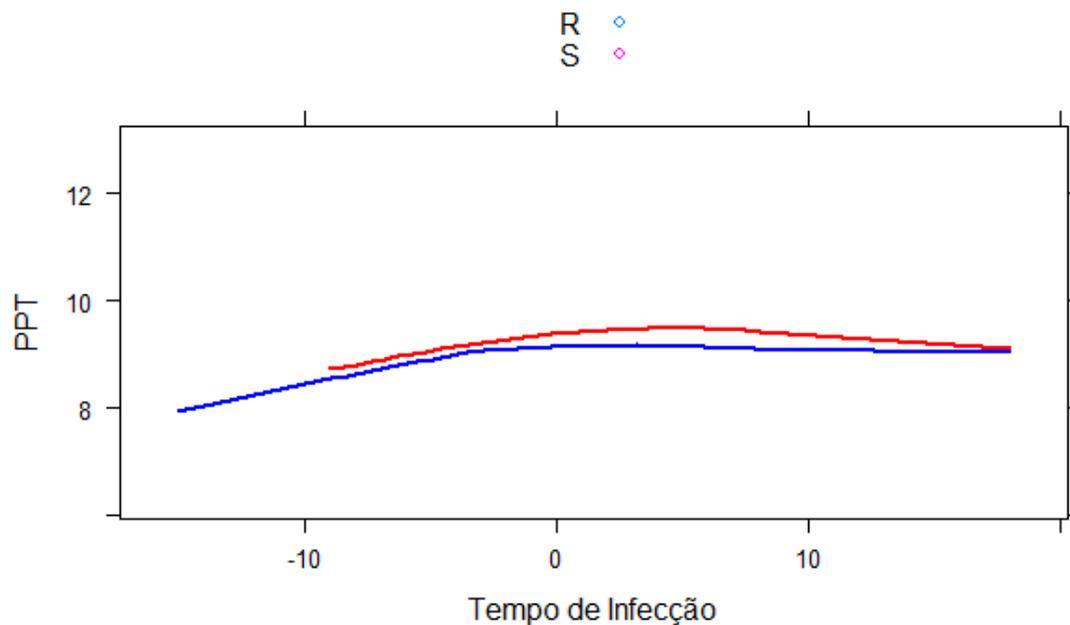












9.3 MODELOS DE EFEITOS ALEATÓRIOS

```
> model = lmer(Hemacias ~ Tempo + classificacao + (Tempo|Amostra), data = banco)
```

```
> summary(model)
```

```
Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
```

```
Formula: Hemacias ~ Tempo + classificacao + (Tempo | Amostra)
```

```
Data: banco
```

```
REML criterion at convergence: 455.5
```

```
Scaled residuals:
```

```
      Min       1Q   Median       3Q      Max
-2.27954 -0.57808  0.01251  0.57095  2.59312
```

```
Random effects:
```

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Amostra	(Intercept)	0.452638	0.67278	
	Tempo	0.001021	0.03196	0.51
	Residual	0.495205	0.70371	

```
Number of obs: 178, groups: Amostra, 29
```

```
Fixed effects:
```

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	7.29861	0.44357	16.454
Tempo	0.02075	0.00979	2.119
classificacao	-0.69818	0.27431	-2.545

```
Correlation of Fixed Effects:
```

	(Intr)	Tempo
Tempo	0.106	
classificac	-0.950	-0.062

```
> model = lmer(Hemoglob ~ Tempo + classificacao + (Tempo|Amostra), data = banco)
```

```
> summary(model)
```

```
Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
```

```
Formula: Hemoglob ~ Tempo + classificacao + (Tempo | Amostra)
```

```
Data: banco
```

```
REML criterion at convergence: 719.9
```

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.2470	-0.5221	-0.0211	0.6130	2.4181

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Amostra	(Intercept)	2.59421	1.61066	
	Tempo	0.00606	0.07784	0.34
	Residual	2.11023	1.45266	

Number of obs: 178, groups: Amostra, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	16.82715	1.04794	16.057
Tempo	0.04597	0.02170	2.118
classificacao	-2.16261	0.64675	-3.344

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr)	Tempo
Tempo	0.079	
classificac	-0.951	-0.051

```
> model = lmer(Ht ~ Tempo + classificacao + (Tempo|Amostra), data = banco)
```

```
> summary(model)
```

Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']

Formula: Ht ~ Tempo + classificacao + (Tempo | Amostra)

Data: banco

REML criterion at convergence: 1146.1

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.25046	-0.58179	-0.00833	0.52423	2.36643

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Amostra	(Intercept)	22.42312	4.7353	
	Tempo	0.05007	0.2238	0.42
	Residual	25.83450	5.0828	

Number of obs: 178, groups: Amostra, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	50.11407	3.16252	15.846
Tempo	0.16169	0.06991	2.313
classificacao	-5.74892	1.95566	-2.940

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr)	Tempo
Tempo	0.087	
classificac	-0.951	-0.062

```
> model = lmer(Leuco ~ Tempo + classificacao + (Tempo|Amostra), data = banco)
```

```
> summary(model)
```

Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']

Formula: Leuco ~ Tempo + classificacao + (Tempo | Amostra)

Data: banco

REML criterion at convergence: 3345.5

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-3.1365	-0.5732	-0.0802	0.4719	3.5533

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Amostra	(Intercept)	4.265e+06	2065.10	
	Tempo	1.928e+01	4.39	-1.00

Residual 8.560e+06 2925.82
 Number of obs: 178, groups: Amostra, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	9036.49	1443.00	6.262
Tempo	-94.34	31.80	-2.967
classificacao	1392.52	888.26	1.568

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr) Tempo
Tempo	0.001
classificac	-0.949 -0.078

convergence code: 0
 boundary (singular) fit: see ?issingular

```
> model = lmer(Segmentados ~ Tempo + classificacao + (Tempo|Amostra), data = banco)
> summary(model)
Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
Formula: Segmentados ~ Tempo + classificacao + (Tempo | Amostra)
Data: banco
```

REML criterion at convergence: 3196.3

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.3244	-0.5846	-0.0836	0.4575	3.7559

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Amostra	(Intercept)	1027221	1013.52	
	Tempo	2063	45.42	1.00
	Residual	3756492	1938.17	

Number of obs: 178, groups: Amostra, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	5739.57	789.95	7.266
Tempo	-13.70	22.54	-0.608
classificacao	393.87	493.13	0.799

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr) Tempo
Tempo	0.121
classificac	-0.950 -0.104

convergence code: 0
 boundary (singular) fit: see ?issingular

```
> model = lmer(Linfocitos ~ Tempo + classificacao + (Tempo|Amostra), data = banco)
> summary(model)
Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']
Formula: Linfocitos ~ Tempo + classificacao + (Tempo | Amostra)
Data: banco
```

REML criterion at convergence: 2992.1

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.36678	-0.52783	-0.04522	0.55386	2.75950

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Amostra	(Intercept)	549975.1	741.60	
	Tempo	932.4	30.54	-0.32
	Residual	1105232.9	1051.30	

Number of obs: 178, groups: Amostra, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	2887.13	511.32	5.646
Tempo	-30.41	12.80	-2.376
classificacao	241.41	313.52	0.770

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr) Tempo
Tempo	-0.033
classificac	-0.947 -0.070

```
> model = lmer(Monocitos ~ Tempo + classificacao + (Tempo|Amostra), data = banco)
```

```
> summary(model)
```

Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']

Formula: Monocitos ~ Tempo + classificacao + (Tempo | Amostra)

Data: banco

REML criterion at convergence: 2403.5

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.9891	-0.5080	-0.3195	0.1965	7.0442

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Amostra	(Intercept)	3064.16	55.355	
	Tempo	11.07	3.327	-1.00
	Residual	46495.25	215.628	

Number of obs: 178, groups: Amostra, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	200.065	59.927	3.338
Tempo	-2.437	2.331	-1.045
classificacao	14.225	36.777	0.387

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr) Tempo
Tempo	-0.050
classificac	-0.940 -0.116

convergence code: 0

boundary (singular) fit: see ?issingular

```
> model = lmer(PPT ~ Tempo + classificacao + (Tempo|Amostra), data = banco)
```

```
> summary(model)
```

Linear mixed model fit by REML ['lmerMod']

Formula: PPT ~ Tempo + classificacao + (Tempo | Amostra)

Data: banco

REML criterion at convergence: 505

Scaled residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-2.1294	-0.5277	-0.0200	0.5735	2.8640

Random effects:

Groups	Name	Variance	Std.Dev.	Corr
Amostra	(Intercept)	0.783870	0.88536	
	Tempo	0.001201	0.03465	-0.12
	Residual	0.636745	0.79796	

Number of obs: 178, groups: Amostra, 29

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	8.805298	0.572906	15.370
Tempo	-0.001077	0.010952	-0.098
classificacao	0.274205	0.351844	0.779

Correlation of Fixed Effects:

	(Intr) Tempo

Tempo -0.013
classificac -0.951 -0.047

9.4 QUADRO COM TODAS AS VIAS ENRIQUECIDAS COM O BANCO DE DADOS ENRICH

List of downregulated pathways in ENRICH	
Susceptible dogs	Resistant dogs
DNA biosynthetic process (GO:0071897)	regulation of small GTPase mediated signal transduction (GO:0051056)
strand displacement (GO:0000732)	non-motile cilium assembly (GO:1905515)
telomere maintenance via telomere lengthening (GO:0010833)	cilium assembly (GO:0060271)
cellular response to alcohol (GO:0097306)	negative regulation of protein polymerization (GO:0032272)
regulation of DNA recombination (GO:0000018)	negative regulation of actin filament polymerization (GO:0030837)
negative regulation of TORC1 signaling (GO:1904262)	negative regulation of cytoskeleton organization (GO:0051494)
integrin-mediated signaling pathway (GO:0007229)	sensory perception of pain (GO:0019233)
cytoskeleton organization (GO:0007010)	ciliary basal body-plasma membrane docking (GO:0097711)
negative regulation of double-strand break repair (GO:2000780)	negative regulation of endothelial cell migration (GO:0010596)
DNA double-strand break processing (GO:0000729)	negative regulation of epithelial cell migration (GO:0010633)
regulation of actin filament polymerization (GO:0030833)	cytoskeleton organization (GO:0007010)
telomere maintenance via telomerase (GO:0007004)	regulation of plasma membrane bounded cell projection assembly (GO:0120032)
double-strand break repair (GO:0006302)	glomerular visceral epithelial cell differentiation (GO:0072112)
RNA-dependent DNA biosynthetic process (GO:0006278)	membrane depolarization (GO:0051899)
response to heparin (GO:0071503)	mitotic sister chromatid cohesion (GO:0007064)
negative regulation of protein polymerization (GO:0032272)	regulation of establishment of cell polarity (GO:2000114)
negative regulation of actin filament polymerization (GO:0030837)	glycoprotein metabolic process (GO:0009100)
cellular response to ionizing radiation (GO:0071479)	positive regulation of dendrite morphogenesis (GO:0050775)
polyol metabolic process (GO:0019751)	negative regulation of axon guidance (GO:1902668)
inositol phosphate metabolic process (GO:0043647)	regulation of establishment or maintenance of cell polarity (GO:0032878)
inositol phosphate dephosphorylation (GO:0046855)	purine-containing compound metabolic process (GO:0072521)
negative regulation of telomere capping (GO:1904354)	positive regulation of stem cell proliferation (GO:2000648)

phosphorylated carbohydrate dephosphorylation (GO:0046838)	regulation of intracellular signal transduction (GO:1902531)
negative regulation of cytoskeleton organization (GO:0051494)	retrograde protein transport, ER to cytosol (GO:0030970)
non-recombinational repair (GO:0000726)	establishment of epithelial cell polarity (GO:0090162)
double-strand break repair via nonhomologous end joining (GO:0006303)	metal ion transport (GO:0030001)
regulation of telomere maintenance (GO:0032204)	negative regulation of supramolecular fiber organization (GO:1902904)
peptidyl-lysine hydroxylation (GO:0017185)	monovalent inorganic cation transport (GO:0015672)
inositol phosphate catabolic process (GO:0071545)	positive regulation of cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0010770)
regulation of double-strand break repair via homologous recombination (GO:0010569)	regulation of monocyte chemotaxis (GO:0090025)
positive regulation of cellular component biogenesis (GO:0044089)	negative regulation of sprouting angiogenesis (GO:1903671)
DNA recombination (GO:0006310)	cellular amide metabolic process (GO:0043603)
regulation of TORC1 signaling (GO:1903432)	neuronal action potential (GO:0019228)
fatty-acyl-CoA biosynthetic process (GO:0046949)	regulation of cardiac muscle cell action potential (GO:0098901)
telomere maintenance via recombination (GO:0000722)	glycolytic process through glucose-6-phosphate (GO:0061620)
regulation of phospholipase activity (GO:0010517)	canonical glycolysis (GO:0061621)
positive regulation of lipase activity (GO:0060193)	glucose catabolic process to pyruvate (GO:0061718)
central nervous system projection neuron axonogenesis (GO:0021952)	regulation of lamellipodium assembly (GO:0010591)
positive regulation of protein localization to membrane (GO:1905477)	regulation of actin filament polymerization (GO:0030833)
substrate adhesion-dependent cell spreading (GO:0034446)	regulation of histone acetylation (GO:0035065)
positive regulation of telomere maintenance (GO:0032206)	response to ketone (GO:1901654)
negative regulation of protein localization to cell surface (GO:2000009)	regulation of endothelial cell migration (GO:0010594)
histone mRNA catabolic process (GO:0071044)	dephosphorylation (GO:0016311)
phosphatidylinositol biosynthetic process (GO:0006661)	protein dephosphorylation (GO:0006470)
stem cell differentiation (GO:0048863)	recombinational repair (GO:0000725)
phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)	cardiac muscle cell action potential (GO:0086001)
DNA synthesis involved in DNA repair (GO:0000731)	double-strand break repair via homologous recombination (GO:0000724)
signal transduction involved in G2 DNA damage checkpoint (GO:0072425)	positive regulation of B cell proliferation (GO:0030890)

carbohydrate derivative transport (GO:1901264)	negative regulation of cell-cell adhesion (GO:0022408)
cellular response to DNA damage stimulus (GO:0006974)	positive regulation of dendrite development (GO:1900006)
DNA strand elongation (GO:0022616)	double-strand break repair (GO:0006302)
negative regulation of macrophage derived foam cell differentiation (GO:0010745)	regulation of DNA recombination (GO:0000018)
DNA replication-independent nucleosome organization (GO:0034724)	cellular glucose homeostasis (GO:0001678)
positive regulation of cellular component organization (GO:0051130)	epithelial tube morphogenesis (GO:0060562)
DNA repair (GO:0006281)	regulation of axon extension (GO:0030516)
actomyosin structure organization (GO:0031032)	protein modification process (GO:0036211)
recombinational repair (GO:0000725)	regulation of cell cycle G2/M phase transition (GO:1902749)
cellular response to nitrogen compound (GO:1901699)	regulation of heart rate by cardiac conduction (GO:0086091)
regulation of RNA metabolic process (GO:0051252)	apical junction assembly (GO:0043297)
DNA replication-independent nucleosome assembly (GO:0006336)	proteolysis (GO:0006508)
negative regulation of TOR signaling (GO:0032007)	centromere complex assembly (GO:0034508)
positive regulation of kinase activity (GO:0033674)	sodium ion transmembrane transport (GO:0035725)
regulation of establishment of cell polarity (GO:2000114)	mitotic cell cycle phase transition (GO:0044772)
peptide transport (GO:0015833)	sodium-independent organic anion transport (GO:0043252)
DNA duplex unwinding (GO:0032508)	positive regulation of axonogenesis (GO:0050772)
positive regulation of cell division (GO:0051781)	cellular protein modification process (GO:0006464)
double-strand break repair via homologous recombination (GO:0000724)	membrane depolarization during action potential (GO:0086010)
response to ionizing radiation (GO:0010212)	mitotic DNA damage checkpoint (GO:0044773)
regulation of osteoblast proliferation (GO:0033688)	extracellular matrix organization (GO:0030198)
neurotransmitter transport (GO:0006836)	neuron migration (GO:0001764)
RNA catabolic process (GO:0006401)	regulation of protein localization (GO:0032880)
regulation of multicellular organism growth (GO:0040014)	cellular response to organonitrogen compound (GO:0071417)
high-density lipoprotein particle remodeling (GO:0034375)	ceramide metabolic process (GO:0006672)
reverse cholesterol transport (GO:0043691)	regulation of glomerular filtration (GO:0003093)
negative regulation of axon guidance (GO:1902668)	positive regulation of protein glycosylation (GO:0060050)
regulation of telomere maintenance via telomere lengthening (GO:1904356)	hindlimb morphogenesis (GO:0035137)
cellular response to gamma radiation (GO:0071480)	purine ribonucleoside monophosphate catabolic process (GO:0009169)
ureteric bud development (GO:0001657)	positive regulation of adaptive immune response (GO:0002821)

negative regulation of telomere maintenance (GO:0032205)	vocal learning (GO:0042297)
negative regulation of B cell activation (GO:0050869)	response to heparin (GO:0071503)
regulation of establishment or maintenance of cell polarity (GO:0032878)	negative regulation of cytoplasmic translation (GO:2000766)
mesonephric tubule development (GO:0072164)	positive regulation of myelination (GO:0031643)
positive regulation of blood vessel endothelial cell migration (GO:0043536)	cellular hyperosmotic response (GO:0071474)
regulation of DNA metabolic process (GO:0051052)	positive regulation of ATP biosynthetic process (GO:2001171)
positive regulation of DNA metabolic process (GO:0051054)	regulation of cell cycle checkpoint (GO:1901976)
positive regulation of cell cycle (GO:0045787)	establishment of endothelial intestinal barrier (GO:0090557)
dephosphorylation (GO:0016311)	SREBP signaling pathway (GO:0032933)
long-chain fatty-acyl-CoA biosynthetic process (GO:0035338)	renal system process involved in regulation of blood volume (GO:0001977)
mitotic recombination (GO:0006312)	imitative learning (GO:0098596)
regulation of cellular response to growth factor stimulus (GO:0090287)	retinal ganglion cell axon guidance (GO:0031290)
cell-substrate adherens junction assembly (GO:0007045)	glomerular epithelial cell differentiation (GO:0072311)
focal adhesion assembly (GO:0048041)	epithelial tube formation (GO:0072175)
fatty acid biosynthetic process (GO:0006633)	renal filtration cell differentiation (GO:0061318)
positive regulation of chromosome organization (GO:2001252)	dendrite extension (GO:0097484)
histone deubiquitination (GO:0016578)	regulation of ribonucleoprotein complex localization (GO:2000197)
positive regulation of phospholipase activity (GO:0010518)	negative regulation of mononuclear cell migration (GO:0071676)
telomere capping (GO:0016233)	regulation of mRNA export from nucleus (GO:0010793)
regulation of telomere maintenance via telomerase (GO:0032210)	regulation of chemokine-mediated signaling pathway (GO:0070099)
telomere maintenance (GO:0000723)	response to UV-A (GO:0070141)
negative regulation of gene expression (GO:0010629)	positive regulation of protein localization to centrosome (GO:1904781)
negative regulation of nucleic acid-templated transcription (GO:1903507)	regulation of B cell proliferation (GO:0030888)
mRNA transcription (GO:0009299)	response to unfolded protein (GO:0006986)
non-motile cilium assembly (GO:1905515)	plasma membrane bounded cell projection assembly (GO:0120031)
histone lysine demethylation (GO:0070076)	
cellular response to alkaloid (GO:0071312)	
cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0000904)	

negative regulation of supramolecular fiber organization (GO:1902904)	
positive regulation of protein autophosphorylation (GO:0031954)	
regulation of DNA biosynthetic process (GO:2000278)	
NLS-bearing protein import into nucleus (GO:0006607)	
negative regulation of transcription, DNA-templated (GO:0045892)	
negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process (GO:2000113)	
regulation of signal transduction by p53 class mediator (GO:1901796)	
regulation of cellular catabolic process (GO:0031329)	
regulation of RNA splicing (GO:0043484)	
phospholipid dephosphorylation (GO:0046839)	
cholesterol efflux (GO:0033344)	
regulation of telomere capping (GO:1904353)	
protein import (GO:0017038)	
mRNA metabolic process (GO:0016071)	
negative regulation of cell motility (GO:2000146)	
histone mRNA metabolic process (GO:0008334)	
intrinsic apoptotic signaling pathway in response to endoplasmic reticulum stress (GO:0070059)	
DNA geometric change (GO:0032392)	
transition metal ion homeostasis (GO:0055076)	
negative regulation of endothelial cell apoptotic process (GO:2000352)	
phospholipid transport (GO:0015914)	
positive regulation of cell morphogenesis involved in differentiation (GO:0010770)	
cellular response to transforming growth factor beta stimulus (GO:0071560)	
organophosphate ester transport (GO:0015748)	
long-chain fatty-acyl-CoA metabolic process (GO:0035336)	
inorganic cation import across plasma membrane (GO:0098659)	
regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator (GO:0043516)	
regulation of lamellipodium assembly (GO:0010591)	
negative regulation of cellular protein localization (GO:1903828)	
regulation of kinase activity (GO:0043549)	
nucleosome assembly (GO:0006334)	
protein import into nucleus (GO:0006606)	

internal peptidyl-lysine acetylation (GO:0018393)	
response to gamma radiation (GO:0010332)	
positive regulation of wound healing (GO:0090303)	
negative chemotaxis (GO:0050919)	
regulation of intracellular signal transduction (GO:1902531)	
negative regulation of small GTPase mediated signal transduction (GO:0051058)	
regulation of protein localization to cell surface (GO:2000008)	
response to endoplasmic reticulum stress (GO:0034976)	
cellular response to starvation (GO:0009267)	
positive regulation of sprouting angiogenesis (GO:1903672)	

List of upregulated pathways in ENRICH

Susceptible dogs	Resistant dogs
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	positive regulation of cell migration (GO:0030335)
positive regulation of leukocyte chemotaxis (GO:0002690)	cellular response to oxygen-containing compound (GO:1901701)
positive regulation of cell migration (GO:0030335)	positive regulation of cell motility (GO:2000147)
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	positive regulation of cell-substrate adhesion (GO:0010811)
positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)	cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)
positive regulation of cell motility (GO:2000147)	regulation of hormone biosynthetic process (GO:0046885)
protein phosphorylation (GO:0006468)	positive regulation of fibroblast proliferation (GO:0048146)
regulation of establishment of cell polarity (GO:2000114)	positive regulation of leukocyte chemotaxis (GO:0002690)
regulation of intracellular signal transduction (GO:1902531)	cellular response to decreased oxygen levels (GO:0036294)
regulation of establishment or maintenance of cell polarity (GO:0032878)	regulation of gene expression (GO:0010468)
regulation of cell migration (GO:0030334)	cellular response to reactive oxygen species (GO:0034614)
cellular response to interferon-gamma (GO:0071346)	cyclic-nucleotide-mediated signaling (GO:0019935)
response to interleukin-1 (GO:0070555)	epithelial cilium movement involved in determination of left/right asymmetry (GO:0060287)
phosphorylation (GO:0016310)	cellular response to oxidative stress (GO:0034599)
regulation of steroid biosynthetic process (GO:0050810)	glycerolipid metabolic process (GO:0046486)
endothelial cell development (GO:0001885)	regulation of signal transduction (GO:0009966)

regulation of gene expression (GO:0010468)	regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway (GO:0008277)
establishment of endothelial barrier (GO:0061028)	cellular response to lipid (GO:0071396)
positive regulation of chemotaxis (GO:0050921)	interleukin-2-mediated signaling pathway (GO:0038110)
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006357)	positive regulation of actin filament depolymerization (GO:0030836)
positive regulation of cell-substrate adhesion (GO:0010811)	cellular response to interleukin-2 (GO:0071352)
chemokine-mediated signaling pathway (GO:0070098)	PERK-mediated unfolded protein response (GO:0036499)
regulation of cell-matrix adhesion (GO:0001952)	response to cAMP (GO:0051591)
regulation of protein localization to early endosome (GO:1902965)	regulation of cell migration (GO:0030334)
positive regulation of protein localization to endosome (GO:1905668)	cellular response to retinoic acid (GO:0071300)
positive regulation of protein localization to early endosome (GO:1902966)	positive regulation of supramolecular fiber organization (GO:1902905)
regulation of cortisol biosynthetic process (GO:2000064)	cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)
regulation of relaxation of cardiac muscle (GO:1901897)	positive regulation of heart rate (GO:0010460)
response to tumor necrosis factor (GO:0034612)	interleukin-12-mediated signaling pathway (GO:0035722)
regulation of hormone biosynthetic process (GO:0046885)	regulation of fibroblast proliferation (GO:0048145)
cAMP catabolic process (GO:0006198)	cellular response to interleukin-12 (GO:0071349)
cellular response to ketone (GO:1901655)	cell-matrix adhesion (GO:0007160)
cell chemotaxis (GO:0060326)	regulation of macrophage chemotaxis (GO:0010758)
positive regulation of transforming growth factor beta production (GO:0071636)	epithelial cilium movement (GO:0003351)
positive regulation of cell projection organization (GO:0031346)	regulation of establishment of cell polarity (GO:2000114)
regulation of leukocyte chemotaxis (GO:0002688)	cellular response to acid chemical (GO:0071229)
regulation of transcription, DNA-templated (GO:0006355)	ruffle organization (GO:0031529)
cellular protein modification process (GO:0006464)	positive regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010604)
cellular response to oxygen-containing compound (GO:1901701)	positive regulation of lymphocyte migration (GO:2000403)
positive regulation of gene expression (GO:0010628)	regulation of establishment or maintenance of cell polarity (GO:0032878)
regulation of cell communication by electrical coupling involved in cardiac conduction (GO:1901844)	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0006357)
establishment of epithelial cell apical/basal polarity (GO:0045198)	chemokine-mediated signaling pathway (GO:0070098)

cyclic nucleotide catabolic process (GO:0009214)	proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0043161)
cyclic-nucleotide-mediated signaling (GO:0019935)	positive regulation of angiogenesis (GO:0045766)
MAPK cascade (GO:0000165)	regulation of transcription, DNA-templated (GO:0006355)
cholesterol metabolic process (GO:0008203)	positive regulation of gene expression (GO:0010628)
positive regulation of kinase activity (GO:0033674)	positive regulation of phospholipase activity (GO:0010518)
cellular response to oxidative stress (GO:0034599)	endothelial cell development (GO:0001885)
neuron projection fasciculation (GO:0106030)	response to retinoic acid (GO:0032526)
polarized epithelial cell differentiation (GO:0030859)	embryonic digestive tract development (GO:0048566)
regulation of transforming growth factor beta production (GO:0071634)	organelle disassembly (GO:1903008)
glycerolipid metabolic process (GO:0046486)	long-term synaptic potentiation (GO:0060291)
positive regulation of protein kinase activity (GO:0045860)	establishment of endothelial barrier (GO:0061028)
morphogenesis of an epithelial sheet (GO:0002011)	cell chemotaxis (GO:0060326)
positive regulation of actin filament depolymerization (GO:0030836)	positive regulation of kinase activity (GO:0033674)
regulation of actin cytoskeleton organization (GO:0032956)	protein localization to cell surface (GO:0034394)
cellular response to lipid (GO:0071396)	positive regulation of cell projection organization (GO:0031346)
axonal fasciculation (GO:0007413)	positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation (GO:0050731)
regulation of mononuclear cell migration (GO:0071675)	lamellipodium assembly (GO:0030032)
establishment of apical/basal cell polarity (GO:0035089)	positive regulation of protein polymerization (GO:0032273)
regulation of protein import into nucleus, translocation (GO:0033158)	positive regulation of neutrophil chemotaxis (GO:0090023)
PERK-mediated unfolded protein response (GO:0036499)	negative regulation of endothelial cell apoptotic process (GO:2000352)
regulation of cell communication by electrical coupling (GO:0010649)	macromolecular complex assembly (GO:0065003)
positive regulation of protein catabolic process (GO:0045732)	phosphate-containing compound metabolic process (GO:0006796)
regulation of calcium-mediated signaling (GO:0050848)	positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity (GO:0043552)
regulation of ERK1 and ERK2 cascade (GO:0070372)	lamellipodium organization (GO:0097581)
regulation of GTPase activity (GO:0043087)	positive regulation of neutrophil migration (GO:1902624)
positive regulation of supramolecular fiber organization (GO:1902905)	prostaglandin metabolic process (GO:0006693)

positive regulation of GTPase activity (GO:0043547)	cytoskeleton-dependent intracellular transport (GO:0030705)
positive regulation of cell adhesion mediated by integrin (GO:0033630)	regulation of p38MAPK cascade (GO:1900744)
positive regulation of osteoclast differentiation (GO:0045672)	positive regulation of granulocyte chemotaxis (GO:0071624)
regulation of small GTPase mediated signal transduction (GO:0051056)	phospholipid metabolic process (GO:0006644)
interleukin-12-mediated signaling pathway (GO:0035722)	vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway (GO:0048010)
cellular response to interleukin-12 (GO:0071349)	positive regulation of lipid kinase activity (GO:0090218)
regulation of macrophage chemotaxis (GO:0010758)	ubiquitin-dependent protein catabolic process (GO:0006511)
pyrimidine nucleoside biosynthetic process (GO:0046134)	positive regulation of phospholipid metabolic process (GO:1903727)
pyrimidine nucleoside metabolic process (GO:0006213)	cellular response to ketone (GO:1901655)
pyrimidine-containing compound metabolic process (GO:0072527)	cellular response to hydrogen peroxide (GO:0070301)
positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade (GO:0070374)	positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:2001238)
positive regulation of cellular metabolic process (GO:0031325)	nitrogen compound transport (GO:0071705)
DNA alkylation (GO:0006305)	positive regulation of cell proliferation (GO:0008284)
DNA methylation or demethylation (GO:0044728)	cellular response to hypoxia (GO:0071456)
ruffle organization (GO:0031529)	negative regulation of epithelial cell apoptotic process (GO:1904036)
positive regulation of positive chemotaxis (GO:0050927)	regulation of neutrophil chemotaxis (GO:0090022)
peptidyl-serine phosphorylation (GO:0018105)	cAMP-mediated signaling (GO:0019933)
regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol (GO:0051279)	cellular response to organic cyclic compound (GO:0071407)
positive regulation of protein phosphorylation (GO:0001934)	regulation of actin cytoskeleton reorganization (GO:2000249)
positive regulation of lymphocyte migration (GO:2000403)	cellular response to cAMP (GO:0071320)
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (GO:0000122)	regulation of leukocyte chemotaxis (GO:0002688)
positive regulation of protein metabolic process (GO:0051247)	regulation of ARF protein signal transduction (GO:0032012)
positive regulation of neuron projection development (GO:0010976)	positive regulation of cytoskeleton organization (GO:0051495)
response to molecule of bacterial origin (GO:0002237)	regulation of MAPK cascade (GO:0043408)
DNA methylation (GO:0006306)	MAPK cascade (GO:0000165)
establishment of epithelial cell polarity (GO:0090162)	positive regulation of telomere maintenance (GO:0032206)

regulation of cell proliferation (GO:0042127)	regulation of potassium ion transmembrane transport (GO:1901379)
purine ribonucleotide catabolic process (GO:0009154)	negative regulation of signal transduction (GO:0009968)
covalent chromatin modification (GO:0016569)	positive regulation of protein catabolic process (GO:0045732)
embryonic digestive tract development (GO:0048566)	regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity (GO:0043551)
regulation of calcium ion transmembrane transport (GO:1903169)	positive regulation of cytokine-mediated signaling pathway (GO:0001961)
response to retinoic acid (GO:0032526)	positive regulation of cell-matrix adhesion (GO:0001954)
positive regulation of cellular catabolic process (GO:0031331)	platelet aggregation (GO:0070527)
receptor metabolic process (GO:0043112)	negative regulation of gene expression (GO:0010629)
regulation of stress fiber assembly (GO:0051492)	protein modification process (GO:0036211)
response to reactive oxygen species (GO:0000302)	regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation (GO:0050730)
viral genome replication (GO:0019079)	regulation of endothelial cell apoptotic process (GO:2000351)
protein localization to cell surface (GO:0034394)	regulation of ion transmembrane transport (GO:0034765)
regulation of DNA replication (GO:0006275)	regulation of cardiac muscle contraction (GO:0055117)
peptidyl-serine modification (GO:0018209)	T cell activation (GO:0042110)
regulation of interleukin-8 secretion (GO:2000482)	negative regulation of translation (GO:0017148)
regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum (GO:0010880)	positive regulation of cellular protein metabolic process (GO:0032270)
positive regulation of ion transmembrane transporter activity (GO:0032414)	regulation of protein catabolic process (GO:0042176)
protein autophosphorylation (GO:0046777)	protein phosphorylation (GO:0006468)
positive regulation of protein polymerization (GO:0032273)	positive regulation of neuron death (GO:1901216)
cellular response to decreased oxygen levels (GO:0036294)	homotypic cell-cell adhesion (GO:0034109)
positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation (GO:0050731)	phosphorylation (GO:0016310)
positive regulation of neutrophil chemotaxis (GO:0090023)	negative regulation of cytokine secretion (GO:0050710)
positive regulation of immune effector process (GO:0002699)	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway (GO:0007169)
negative regulation of endothelial cell apoptotic process (GO:2000352)	positive regulation of protein metabolic process (GO:0051247)
cAMP metabolic process (GO:0046058)	epithelial cell differentiation (GO:0030855)
regulation of angiogenesis (GO:0045765)	bicarbonate transport (GO:0015701)

regulation of cell division (GO:0051302)	regulation of calcium-mediated signaling (GO:0050848)
cellular response to reactive oxygen species (GO:0034614)	proteasomal protein catabolic process (GO:0010498)
negative regulation of cell adhesion (GO:0007162)	positive regulation of neuron projection development (GO:0010976)
regulation of potassium ion transmembrane transporter activity (GO:1901016)	response to tumor necrosis factor (GO:0034612)
positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity (GO:0043552)	cellular response to organonitrogen compound (GO:0071417)
positive regulation of neutrophil migration (GO:1902624)	regulation of protein modification process (GO:0031399)
positive regulation of interleukin-12 production (GO:0032735)	determination of left/right symmetry (GO:0007368)
regulation of ryanodine-sensitive calcium-release channel activity (GO:0060314)	regulation of inflammatory response (GO:0050727)
positive regulation of nitric oxide biosynthetic process (GO:0045429)	plasma membrane bounded cell projection assembly (GO:0120031)
positive regulation of nitric oxide metabolic process (GO:1904407)	protein transmembrane import into intracellular organelle (GO:0044743)
regulation of cardiac conduction (GO:1903779)	histone H3 acetylation (GO:0043966)
peptidyl-threonine phosphorylation (GO:0018107)	response to hydrogen peroxide (GO:0042542)
response to interferon-gamma (GO:0034341)	regulation of protein localization to early endosome (GO:1902965)
cytoskeleton-dependent intracellular transport (GO:0030705)	macropinocytosis (GO:0044351)
regulation of cardiac muscle cell contraction (GO:0086004)	response to chemokine (GO:1990868)
positive regulation of granulocyte chemotaxis (GO:0071624)	positive regulation of axon guidance (GO:1902669)
inflammatory response (GO:0006954)	positive regulation of cellular extravasation (GO:0002693)
negative regulation of macromolecule metabolic process (GO:0010605)	immunological synapse formation (GO:0001771)
positive regulation of endothelial cell migration (GO:0010595)	transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway (GO:0007185)
stress-activated protein kinase signaling cascade (GO:0031098)	response to heparin (GO:0071503)
interferon-gamma-mediated signaling pathway (GO:0060333)	cellular response to chemokine (GO:1990869)
vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway (GO:0048010)	gland morphogenesis (GO:0022612)
regulation of calcium ion transmembrane transporter activity (GO:1901019)	positive regulation of hormone metabolic process (GO:0032352)
positive regulation of lipid kinase activity (GO:0090218)	negative regulation of cytoplasmic translation (GO:2000766)
regulation of cation channel activity (GO:2001257)	positive regulation of protein localization to endosome (GO:1905668)

positive regulation of phospholipid metabolic process (GO:1903727)	cellular hyperosmotic response (GO:0071474)
positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway (GO:2001238)	regulation of superoxide metabolic process (GO:0090322)
organelle fission (GO:0048285)	positive regulation of protein localization to early endosome (GO:1902966)
positive regulation of fibroblast proliferation (GO:0048146)	positive regulation of cardiac muscle contraction (GO:0060452)
regulation of macromolecule metabolic process (GO:0060255)	negative regulation of type I interferon-mediated signaling pathway (GO:0060339)
protein localization to plasma membrane (GO:0072659)	regulation of digestive system process (GO:0044058)
negative regulation of epithelial cell apoptotic process (GO:1904036)	regulation of cortisol biosynthetic process (GO:2000064)
regulation of neutrophil chemotaxis (GO:0090022)	negative regulation of lymphocyte migration (GO:2000402)
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to stress (GO:0036003)	negative regulation of glucocorticoid receptor signaling pathway (GO:2000323)
positive regulation of epithelial cell migration (GO:0010634)	nucleobase metabolic process (GO:0009112)
cellular response to tumor necrosis factor (GO:0071356)	regulation of MHC class I biosynthetic process (GO:0045343)
cAMP-mediated signaling (GO:0019933)	regulation of inositol phosphate biosynthetic process (GO:0010919)
regulation of actin cytoskeleton reorganization (GO:2000249)	choline catabolic process (GO:0042426)
negative regulation of stress-activated MAPK cascade (GO:0032873)	regulation of saliva secretion (GO:0046877)
positive regulation of reactive oxygen species biosynthetic process (GO:1903428)	glomerular epithelial cell differentiation (GO:0072311)
positive regulation of cytoskeleton organization (GO:0051495)	regulation of mesenchymal stem cell differentiation (GO:2000739)
regulation of cytokinesis (GO:0032465)	peroxisomal membrane transport (GO:0015919)
cellular response to organic cyclic compound (GO:0071407)	enteric nervous system development (GO:0048484)
positive regulation of interleukin-1 beta production (GO:0032731)	renal filtration cell differentiation (GO:0061318)
secondary alcohol metabolic process (GO:1902652)	positive regulation of fever generation (GO:0031622)
vesicle-mediated transport to the plasma membrane (GO:0098876)	morphogenesis of an endothelium (GO:0003159)
positive regulation of cell proliferation (GO:0008284)	regulation of relaxation of cardiac muscle (GO:1901897)
regulation of MAPK cascade (GO:0043408)	rescue of stalled ribosome (GO:0072344)
regulation of nitric oxide biosynthetic process (GO:0045428)	regulation of cellular response to oxidative stress (GO:1900407)

positive regulation of myeloid leukocyte differentiation (GO:0002763)	blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis (GO:0002043)
regulation of hydrolase activity (GO:0051336)	nucleoside phosphate catabolic process (GO:1901292)
response to lipid (GO:0033993)	regulation of protein K63-linked ubiquitination (GO:1900044)
regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity (GO:0043551)	carbohydrate transport (GO:0008643)
positive regulation of cell-matrix adhesion (GO:0001954)	negative regulation of programmed cell death (GO:0043069)
regulation of interleukin-12 production (GO:0032655)	regulation of kinase activity (GO:0043549)
establishment or maintenance of epithelial cell apical/basal polarity (GO:0045197)	sprouting angiogenesis (GO:0002040)
positive regulation of phosphorylation (GO:0042327)	regulation of steroid biosynthetic process (GO:0050810)
positive regulation of cellular process (GO:0048522)	
positive regulation of leukocyte migration (GO:0002687)	
positive regulation of chemokine production (GO:0032722)	
establishment of protein localization to membrane (GO:0090150)	
negative regulation of signal transduction (GO:0009968)	
activation of GTPase activity (GO:0090630)	
lipid phosphorylation (GO:0046834)	
regulation of endothelial cell apoptotic process (GO:2000351)	
positive regulation of DNA replication (GO:0045740)	
positive regulation of ATPase activity (GO:0032781)	
membrane protein proteolysis (GO:0033619)	
negative regulation of cell proliferation (GO:0008285)	
regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation (GO:0050730)	
regulation of cell cycle (GO:0051726)	
regulation of protein kinase activity (GO:0045859)	
positive regulation of MAPK cascade (GO:0043410)	
cellular response to interleukin-1 (GO:0071347)	
regulation of osteoclast differentiation (GO:0045670)	
positive regulation of stress fiber assembly (GO:0051496)	
positive regulation of multi-organism process (GO:0043902)	
peptidyl-threonine modification (GO:0018210)	
positive regulation of neuron death (GO:1901216)	

regulation of cell cycle process (GO:0010564)	
cell-matrix adhesion (GO:0007160)	
positive regulation of response to external stimulus (GO:0032103)	
regulation of protein catabolic process (GO:0042176)	
cellular response to acid chemical (GO:0071229)	
inositol lipid-mediated signaling (GO:0048017)	
Golgi to plasma membrane transport (GO:0006893)	
response to lipopolysaccharide (GO:0032496)	
negative regulation of transcription, DNA-templated (GO:0045892)	
response to cAMP (GO:0051591)	
negative regulation of cytokine secretion (GO:0050710)	
regulation of apoptotic process (GO:0042981)	
axon guidance (GO:0007411)	
extracellular matrix organization (GO:0030198)	
positive regulation of cellular biosynthetic process (GO:0031328)	
regulation of heart contraction (GO:0008016)	
regulation of cholesterol metabolic process (GO:0090181)	
regulation of signal transduction (GO:0009966)	
cellular response to retinoic acid (GO:0071300)	
type B pancreatic cell development (GO:0003323)	
pyrimidine-containing compound biosynthetic process (GO:0072528)	
positive regulation of microtubule motor activity (GO:2000576)	
macropinocytosis (GO:0044351)	
positive regulation of interferon-gamma secretion (GO:1902715)	
response to chemokine (GO:1990868)	
positive regulation of axon guidance (GO:1902669)	
granzyme-mediated apoptotic signaling pathway (GO:0008626)	
positive regulation of cellular extravasation (GO:0002693)	
immunological synapse formation (GO:0001771)	
arginine biosynthetic process (GO:0006526)	
positive regulation of protein import into nucleus, translocation (GO:0033160)	
transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase signaling pathway (GO:0007185)	
regulation of endothelial cell development (GO:1901550)	

response to heparin (GO:0071503)	
cellular response to chemokine (GO:1990869)	
gland morphogenesis (GO:0022612)	
B cell chemotaxis (GO:0035754)	
positive regulation of hormone metabolic process (GO:0032352)	
negative regulation of cytoplasmic translation (GO:2000766)	
regulation of extent of cell growth (GO:0061387)	
positive regulation of aspartic-type peptidase activity (GO:1905247)	
regulation of superoxide metabolic process (GO:0090322)	
regulation of aldosterone biosynthetic process (GO:0032347)	
negative regulation of stress-activated protein kinase signaling cascade (GO:0070303)	
regulation of interleukin-10 secretion (GO:2001179)	
negative regulation of lymphocyte migration (GO:2000402)	
positive regulation of humoral immune response (GO:0002922)	
plasma membrane fusion (GO:0045026)	
ceramide transport (GO:0035627)	
regulation of cardiac muscle cell apoptotic process (GO:0010665)	
nucleobase metabolic process (GO:0009112)	
regulation of anion channel activity (GO:0010359)	
regulation of inositol phosphate biosynthetic process (GO:0010919)	
regulation of dendritic cell chemotaxis (GO:2000508)	
positive regulation of autophagosome maturation (GO:1901098)	
glomerular epithelial cell differentiation (GO:0072311)	
regulation of mesenchymal stem cell differentiation (GO:2000739)	
enteric nervous system development (GO:0048484)	
renal filtration cell differentiation (GO:0061318)	
positive regulation of fever generation (GO:0031622)	
morphogenesis of an endothelium (GO:0003159)	
endosome to lysosome transport via multivesicular body sorting pathway (GO:0032510)	
regulation of histone deacetylase activity (GO:1901725)	
glandular epithelial cell development (GO:0002068)	

citrate metabolic process (GO:0006101)	
regulation of cellular response to oxidative stress (GO:1900407)	
negative regulation of mononuclear cell migration (GO:0071676)	
blood vessel endothelial cell proliferation involved in sprouting angiogenesis (GO:0002043)	
negative regulation of cAMP-mediated signaling (GO:0043951)	
regulation of interleukin-13 secretion (GO:2000665)	
negative regulation of leukocyte degranulation (GO:0043301)	
regulation of interleukin-12 secretion (GO:2001182)	
acetyl-CoA biosynthetic process (GO:0006085)	
positive regulation of aspartic-type endopeptidase activity involved in amyloid precursor protein catabolic process (GO:1902961)	