

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina
Instituto de Medicina Tropical

Papel de miRNAs na regulação da via de produção de poliaminas/NO em
macrófagos derivados de THP-1 infectados com *Leishmania amazonensis*

Versão corrigida conforme Resolução CoPGr 5890
de 20/12/2010

Juliane Cristina Ribeiro Fernandes

São Paulo
2023

Juliane Cristina Ribeiro Fernandes

Papel de miRNAs na regulação da via de produção de poliaminas/NO em macrófagos derivados de THP-1 infectados com *Leishmania amazonensis*

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Medicina Tropical
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Lucile Maria Floeter Winter
Co-orientadora: Dra. Sandra Marcia Muxel

Versão corrigida conforme Resolução CoPGr 5890 de 20/12/2010

São Paulo
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fernandes, Juliane Cristina Ribeiro
Papel de miRNAs na regulação da via de produção de
poliaminas/NO em macrófagos derivados de THP-1
infectados com Leishmania amazonensis / Juliane
Cristina Ribeiro Fernandes. -- São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Medicina Tropical. Área de
Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.
Orientadora: Lucile Maria Floeter Winter.
Coorientadora: Sandra Marcia Muxel.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Leishmania
3.Macrófagos 4.Expressão gênica 5.microRNAs
6.Metabolômica 7.Arginina

USP/FM/DBD-081/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Guia para apresentação de dissertações e teses no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo / [elaborado por] Carlos José Quinteiro, Sonia Pedrozo Gomes. - 3a ed. rev. e ampl. - São Paulo: Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 2018.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedico esta tese à minha mãe, Valéria,
por acreditar no potencial da minha
escolha profissional e me apoiar sempre

AGRADECIMENTOS

“Sou feita de retalhos.

Pedacinhos coloridos de cada vida que passa pela minha e que vou costurando na alma.

Nem sempre bonitos, nem sempre felizes, mas me acrescentam e me fazem ser quem eu sou.

Em cada encontro, em cada contato, vou ficando maior...

Em cada retalho, uma vida, uma lição, um carinho, uma saudade...

Que me tornam mais pessoa, mais humana, mais completa.

E penso que é assim mesmo que a vida se faz: de pedaços de outras gentes que vão se tornando parte da gente também.

E a melhor parte é que nunca estaremos prontos, finalizados...

Haverá sempre um retalho novo para adicionar a alma.

Portanto, obrigada a cada um de vocês, que fazem parte da minha vida e que me permitem engrandecer minha história com os retalhos deixados em mim. Que eu também possa deixar pedacinhos de mim pelos caminhos e que eles possam ser parte das suas histórias.

E que assim, de retalho em retalho, possamos nos tornar, um dia, um imenso bordado de ‘nós’.”

(Cris Pizzimenti)

O fim do doutorado configura mais um pedacinho de retalho na história da minha vida. A história dessa tese deve ter início quando explorava o quintal e galinheiro da vovó Lourdes (*in memoriam*) procurando resquícios de dinossauros e, com sucesso, montava exposições juntando cada pedaço de osso encontrado (e não é que estava quase certa? galinhas são, pelo menos, primas dos dinossauros). Esses retalhos tão primordiais da vida, que se costuravam ao som da máquina *Singer* da vovó, permanecem não apenas como memórias, mas como fundadoras do meu modo de enxergar a vida. Não poderia iniciar esses agradecimentos sem o imenso destaque às minhas avós, Lourdes e Tereza, às tias Thereza (*in memoriam*) e tia Clores, ao Vinicius e ao meu pai Vanderlei e à minha mãe Valéria. Em especial aos meus pais, obrigada por acreditarem em mim, sem vocês eu não chegaria até aqui.

Agradeço àquelas professoras e professores que conseguiram mostrar com brilho nos olhos a mágica do aprender. Agradeço aos meus professores do Colégio Politécnico de Sorocaba, em especial o Gerson, de biologia, que me fez apaixonar pelo mundo das células. Nessa escola ouvi falar pela primeira vez sobre a USP, a melhor universidade do Brasil, que desde então se tornou meu sonho, ainda que distante e por muitas vezes inalcançável. Agradeço às minhas amigas Bruna, Juliana, Andressa e Michele, por

sonharmos (e conquistarmos os nossos sonhos) juntas, eu tenho o maior orgulho do mundo da história que vocês estão construindo!

Enquanto muitos colegas têm lembranças quicá traumáticas do período de cursinho, eu fico emocionada ao lembrar a jornada cheia de boas pessoas no Cursinho Popular Gerabixo, da Unesp de Sorocaba. Agradeço a todos os professores inesquecíveis, não só pelas aulas, mas pela amizade e o apoio emocional, que me fizeram acreditar que eu podia chegar aonde quisesse. Também agradeço a honra de me receberem como professora de Biologia Celular e Genética anos depois, quando pude retribuir minha gratidão ao projeto e também sonhar junto com jovens que hoje tenho o prazer de encontrar na USP. Para que a minha história não seja exceção, agradeço a todos aqueles que lutam pela universidade pública, gratuita e para todos.

A tão sonhada Universidade de São Paulo é gigante, seja pela dimensão e pelas belezas do campus quanto pela sua história e as pessoas que a compõe. A USP possibilita o encontro de pessoas apaixonadas. Apaixonadas pelo conhecimento e por propósitos, capazes de dividir essa paixão com os demais. Por isso, eu agradeço poder usufruir desse ambiente nos últimos 9 anos com uma grande concentração de apaixonados, de professores que com mais de 30 anos de pesquisa dão aula sobre o seu tema com um sorriso no rosto. Agradeço pela oportunidade de conhecer grandes apaixonados pela educação, didática e extensão, que serão inspiração para a vida, dos quais não posso deixar de mencionar os professores Bayardo Torres, Ana Márcia, Mauro Fantini e Mariana Osako.

Aproveito também para agradecer àqueles que lutaram por políticas de permanência da universidade, sem as quais eu não poderia permanecer em São Paulo.

Agradeço aos meus amigos da graduação, Flávio, Vini (Victor), Camila e Tiago pela caminhada conjunta, todas as risadas, histórias e apoio que continuam até hoje. Em especial ao Vini, por ser meu melhor amigo que, mesmo distante fisicamente, me apoiou, aconselhou e acolheu quando precisei nessa jornada do doutorado.

Agradeço ao meu primeiro orientador, Gerhard Wunderlich, que me ensinou toda a prática em biologia molecular desde o primeiro ano da faculdade e me fez apaixonar pelo mundo da parasitologia. Agradeço ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica.

Agradeço à minha segunda orientadora de iniciação científica e do atual doutorado, Lucile, que me ensinou, me guiou, ouviu todos os meus (muitos) choros nesse período, trouxe muita coxinha para os seminários e pegou no pé toda vez que falávamos sobre o ciclo de vida de *Leishmania* (em itálico!).

Às minhas coorientadoras, Tati (na época do Gerhard) e Sandra (atual), ambas mulheres, mães de filhos pequenos e acadêmicas, que são uma inspiração para mim. Sandra, por ter discutido cada detalhe de cada protocolo, cada erro e cada resultado desse projeto, sem você esse doutorado não seria possível.

Aos Institutos de Biociências e de Medicina Tropical por, respectivamente, ser meu espaço físico de trabalho e por me acolher em seu programa de pós-graduação. Agradeço aos meus colegas e companheiros de laboratório, em especial aos “Juvenis”,

dos quais menciono Jonathan, Samantha, Avery e Stephanie, obrigada por todos os “rolês” e risadas. Agradeço ao técnico do laboratório, Ricardo, por todos os ensinamentos e auxílio nos experimentos, à pós-doutoranda Juliana e à jovem pesquisadora Fernanda, pela troca de conhecimentos.

Agradeço às professoras da minha banca de qualificação Hiro Goto, Maria Carolina e Ana Marcia que, no meio do caminho (e no meio da pandemia), se debruçaram sobre meus resultados, me encorajaram e me guiaram.

Agradezco a la profesora Coral Barbas, Angéles Lopez y Maricruz por darme la bienvenida en su laboratorio en la Universidad de San Pablo (Madrid) y permitir el uso de la metabolómica en este proyecto de investigación.

Agradeço ao CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento dos recursos de laboratório, pelo projeto temático (processo 2018/23512-0), fazendo ser possível ter bons recursos e fazer ciência de ponta no Brasil. Pela bolsa de doutorado (processo 2017/21906-9) e de estágio no exterior (processo 2021/09111-6) e pela reserva técnica, que garantiu a participação em eventos nacionais e internacionais.

Por fim, tem família que a gente nasce e tem família que a gente ganha. Não posso deixar de agradecer a todo acolhimento da minha segunda família que estiveram comigo desde o início da jornada do doutorado. Meu companheiro André me trouxe carinho, apoio e um abraço que sempre esteve disponível, capaz de abrandar todos os medos do mundo lá fora. Escrever essa tese literalmente ao seu lado com toda a certeza foi o que me deu as forças necessárias para concluir esta etapa, obrigada pela companhia e pelo apoio. Meu companheiro também me deu uma família amorosa, com retalhos de cores que jamais havia visto. Agradeço à Sônia, Manoel e Claudia, por me acolherem como filha. Agradeço à pequena Mariah, por me acreditar como a melhor “*senhentista*” do mundo, e por me ajudar na missão de nunca perder a criança em mim. Agradeço à Sessa e Fernando e às “quases” Binha e Tamy pela parceria.

Devo agradecer também à minha psicóloga, Helen, que me permitiu nesse processo descosturar e recosturar meus retalhos de forma com que a colcha seja mais bonita e confortável.

Não foi fácil realizar essa pesquisa em anos de um governo anti-ciência e durante uma pandemia, mas é pela esperança que vemos à nossa frente e por todos estes mencionados que estou aqui, obrigada.

Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que-fazer-se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade.

(Paulo Freire)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP3	Permease de aminoácidos 3
ACN	Acetonitrila
ACY1	Aminoacilase 1
AGMAT	Agmatinase
AGO	Argonauta(s)
AMD1	S-adenosilmetionina descarboxilase
ARG	Arginase
ASL	Arginosuccinato liase
AZIN 1	Inibidor de antianzima 1
BH4	Tetrahidrobiopterina
BMDM	Macrófago derivado de medula óssea
C19MC-HG	do inglês, chromosome 19 mega cluster - host gene
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CAT	Transportador de aminoácidos catiônicos
CCL	do inglês, Chemokine (C-C motif) ligand
CD11b	do inglês, cluster of differentiation 11b
CD14	do inglês, cluster of differentiation 14
CE	Eletroforese capilar
Ct	do inglês, cycle treshold
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
DGCR8	do inglês, DiGeorge syndrome critical region 8
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EI	Impacto eletrônico
ESI	Eletroesprei
EXP-5	Exportina-5
FC	do inglês, fold change
FDR	do inglês, false discovery rate
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
GAPDH/G3PD	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (gene/proteína)

GC	Cromatografia de gases
GP63	Glicoproteína 63
HIF-1 α	Fator 1- α induzível por hipóxia
HILIC	Cromatografia líquida de interação hidrofílica
HuR	Antígeno humano R
IFN	Interferon
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
IRAK4	Quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1
<i>La</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
LATS2	do inglês, large tumor suppressor kinase 2
LC	Cromatografia líquida
<i>Ld</i>	<i>Leishmania donovani</i>
LncRNA	RNA longo não codificante
LNMA	N ^G -metil-L-arginina
LPG	Lipofosfoglicano
LRV1	Vírus de RNA de <i>Leishmania</i>
MAP3K7	do inglês, mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
MD2	Proteína de diferenciação mielóide 2
MFI	Média de intensidade de fluorescência
MIP	Proteína inflamatória do macrófago
miR ou miRNA	microRNA
M \emptyset	Macrófago
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas
MSU	Urato monossódico
MVDA	Análise multivariada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NAGS	N-acetil glutamato sintase
NC	Controle negativo
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NFκB	do inglês, nuclear factor kappa B
NMR	Ressonância magnética nuclear
NO	Óxido nítrico
NOHA/LOHA	L-hidróxi-L-arginina
NOS2	Óxido nítrico sintase 2
ODC	Ornitina descarboxilase
OPLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonal
ORF	Fase aberta de leitura
OTC	Ornitina transcarbamilase
P(corr)	Coeficiente de correlação parcial
PAOX	N1-acetil espermina/espermidina oxidase peroxissomal
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	do inglês, phosphate buffered saline
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PKC	Proteína quinase C
PKM	Piruvato quinase muscular
PLS-DA	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais
PMA	Forbol miristato acetato
Q	Quadrupolo
QC	Controle de qualidade
RBP	Proteína ligante de RNA
RELA	do inglês, reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RMT	Tempo de migração relativo
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
ROS	Espécie reativa de oxigênio
RSD	do inglês, relative standard deviation

RT-qPCR	do inglês, reverse transcriptase - quantitative PCR
SD	Desvio padrão
SEM	Erro padrão da média
SFB	Soro fetal bovino
SLC	do inglês, solute carrier
SMS	Espermina sintase
SNORD	Pequeno RNA nucleolar
SRM	Espermidina sintase
TCA	Ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs
TGFBR	do inglês, transforming growth factor beta receptor
TLR	Receptor do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
TOF	Tempo de voo
TRAF	do inglês, tumor necrosis factor receptor-associated factors
TRBP	do inglês, TAR RNA-binding protein
tRNA	RNA transportador
TRYS	Tripanotona sintetase
UDP	Uridina difosfato
UTR	Região não traduzida
UV	Análise univariada
VIP	Importância da variável na projeção
WT	Selvagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores para avaliação da biogênese de miR-372/373.	60
Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores para genes de interesse.....	61
Tabela 3 - Sequências de DNA de fita simples para anelamento e clonagem no vetor pmiRGLO.....	63
Tabela 4 - Quantificação de 84 microRNAs após 4 e 24h de infecção de macrófagos THP- 1 por <i>La</i> -WT ou <i>La-arg</i>	73
Tabela 5 - Anotação de metabólitos determinados como significativos (p FDR < 0.05) nos dados de macrófagos infectados com <i>La</i> (<i>La</i>) x não infectados (NI).....	88
Tabela 6 - Anotação de metabólitos determinados como significativos (p FDR < 0.05) nos dados de macrófagos infectados com <i>La</i> e tratados com inibidores de miR-372/373/520d (miR) x controles negativos (NC).	91
Tabela 7 - Análise de enriquecimento de vias Reactome a partir de metabólitos significativamente modulados na comparação miR x NC e respectivos genes preditos como alvos de miR-372/373/520d.	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	32
Figura 2 - Biogênese de microRNAs.	38
Figura 3 - Classificação de pareamento da <i>seed</i> do miRNA com mRNAs alvo.	39
Figura 4 - Representação esquemática dos componentes do metabolismo de arginina em macrófagos infectados com <i>Leishmania</i>	51
Figura 5 - Representação esquemática dos <i>gates</i> e fluxo de análise de dados da citometria de imagem.	59
Figura 6 - Frequência de células CD14+ e CD11b+ analisadas como marcadores fenotípicos de diferenciação de macrófagos THP-1 por citometria de fluxo.	69
Figura 7 - Curva de crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> selvagem (<i>La-WT</i>) e nocaute de arginase (<i>La-arg</i> ⁻).	70
Figura 8 - Quantificação absoluta de La-ARG em <i>L. amazonensis</i> (<i>La-WT</i> e <i>La-arg</i>). .	70
Figura 9 - Infecção de macrófagos derivados de THP-1 por <i>La-WT</i> e <i>La-arg</i>	71
Figura 10 - Expressão de miRNAs de macrófagos THP-1 infectados por <i>L. amazonensis</i> selvagem.....	72
Figura 11 - Expressão de miRNAs de macrófagos THP-1 infectados por <i>L. amazonensis</i> nocaute de arginase (<i>La-arg</i>).	72
Figura 12 - Validação da expressão dos miRNAs miR-373, miR-372, miR-520d, miR-302a e miR-302c por RT-qPCR em macrófagos infectados com <i>La-WT</i> ou <i>La-arg</i>	76
Figura 13 - Análise de transcritos intermediários da biogênese de miR-372 e miR-373.	77
Figura 14 - Quantificação relativa dos mRNAs envolvidos no transporte e metabolismo de arginina por RT-qPCR em macrófagos THP-1 infectados com <i>L. amazonensis</i>	78
Figura 15 - Quantificação de nitrito em macrófagos THP-1 infectados com <i>La-WT</i> e <i>La-arg</i> com o método Griess.	79
Figura 16 - Produção de NO acessada por marcação intracelular com DAF-FM por citometria de fluxo.	79
Figura 17 - Infectividade de <i>L. amazonensis</i> selvagem em macrófagos THP-1 mediante inibição de miR-372, miR-373 e/ou miR-520d.	80
Figura 18 - Infectividade com o tratamento de mímicos dos miR-372/373/520d.....	81

Figura 19 - Quantificação relativa dos níveis de miR-372, miR-373 e miR-520d mediante inibição de miRNAs.	82
Figura 20 - Quantificação de SLC7A2 após inibição de miR-372, miR-373 e/ou miR-520d.	83
Figura 21 - Quantificação da proteína CAT2 após a transfecção de mímicos de miR-372, miR-373 e miR-520d.	83
Figura 22 - Quantificação da atividade de luciferase controlada pelo 3'UTR de SLC7A2 com sítio alvo para os miR-372/373/520d.	84
Figura 23 - Análise do sítio de ligação no 3'UTR do mRNA de NOS2 murino e humano.	85
Figura 24 - Agrupamento de amostras de controle de qualidade (QCs) com método não supervisionado PCA-X.	86
Figura 25 - Análises de dados multivariadas do metaboloma de macrófagos THP-1 não infectados ou infectados com <i>L. amazonensis</i> , com ou sem a inibição dos miR-372/373/520d.	87
Figura 26 - Intensidade (área) de picos de metabólitos relacionados com ciclo da ureia, produção de poliaminas e derivados.	93
Figura 27 - Quantificação de metabólitos identificados em nível 1 e relacionados com a via de poliaminas e tripanotiona.	94
Figura 28 - Via de metabolismo de arginina tem alvos putativos de modulação pelos miR-372, miR-373 e miR-520d.	97

RESUMO

Fernandes JCR. *Papel de miRNAs na regulação da via de produção de poliaminas/NO em macrófagos derivados de THP-1 infectados com Leishmania amazonensis* [tese]. São Paulo: “Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo”; 2023.

Leishmania amazonensis é um protozoário que causa principalmente leishmaniose cutânea em humanos. O aminoácido arginina exerce papel central na sobrevivência do parasita no macrófago e no estabelecimento da infecção ao suprir ornitina, via arginase 1, precursor da via de poliaminas, que são moléculas essenciais para a proliferação do parasita. Por outro lado, arginina pode levar à produção de óxido nítrico (NO) via óxido nítrico sintase 2 (NOS2), principal molécula efetora leishmanicida. Ao contrário do que ocorre em macrófagos murinos, estudos apontam ausência de atividade de NOS2 em macrófagos humanos. Diversos trabalhos demonstraram a importância de microRNAs na regulação da resposta imune na infecção por diferentes espécies de *Leishmania* e hospedeiros. Neste estudo, investigamos a via de poliaminas/NO e regulações mediadas por miRNAs que alteram a infectividade de *L. amazonensis* em macrófagos humanos derivados da linhagem monocítica THP-1. Inicialmente, quantificamos o perfil de expressão de miRNAs envolvidos na resposta inflamatória e identificamos a modulação positiva de miRNAs pertencentes à família miR-372/373/520, que compartilham a sequência *seed* AAGUGCU, responsável pelo reconhecimento do mRNA alvo. Essa sequência é idêntica à *seed* do miR-294 murino, previamente demonstrado como um importante fator de promoção da infecção ao reduzir o mRNA *Nos2*. Estudos em colaboração demonstraram a regulação positiva desses miRNAs também em THP-1 infectada com *L. braziliensis* e *L. infantum* e em soro de pacientes com leishmaniose visceral. Nossos resultados mostraram que a infecção de *L. amazonensis* nocaute de arginase é reduzida após 24h e correlaciona com a ausência de regulação dos miRNAs estudados. Para entender a importância desses miRNAs na infecção por *L. amazonensis*, inibimos os miR-372, miR-373 e miR-520d sozinhos ou combinados e observamos que a inibição de miR-372, mas não miR-373 ou miR-520d sozinhos, foi capaz de reduzir a proporção de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos. A inibição simultânea dos 3 miRNAs reduziu ainda mais a infecção, enquanto o uso de mímicos aumentou a infecção, indicando um mecanismo sinérgico dos miR-372/373/520d na promoção da infectividade. Esses miRNAs compartilham mRNAs-alvo putativos que codificam proteínas envolvidas na tomada de aminoácidos, metabolismo de poliaminas e ciclo da ureia, incluindo o principal transportador de arginina do macrófago CAT2, cujo mRNA é aumentado com a inibição simultânea dos miR-372/373/520d. Por outro lado, o sítio alvo de NOS2 de camundongos não é conservado no 3'UTR de humanos. De forma geral, nossos resultados mostraram baixa modulação da via de NO/poliaminas a nível transcricional e, para acessar o fenótipo do macrófago, realizamos quantificação a nível de metabólitos utilizando metabolômica baseada em espectrometria de massas. Nossos dados mostraram que a infecção aumenta a produção de componentes do ciclo da ureia e putrescina, enquanto a inibição dos miR-372/373/520d reduz a produção de putrescina, espermina e tripanotona. Nossos resultados evidenciam que a correção da família miR-372/373/520d na infecção por *Leishmania* atua na regulação de genes envolvidos no metabolismo de L-arginina,

culminando na produção de poliaminas e favorecendo o estabelecimento e a manutenção da infecção. Os mecanismos moleculares descritos podem ser base para o desenvolvimento de terapias voltadas ao hospedeiro.

Descritores: Leishmaniose cutânea; *Leishmania*; Macrófagos; Expressão gênica; microRNAs; Metabolômica; Arginina.

ABSTRACT

Fernandes JCR. *Role of miRNAs in the regulation of the polyamine/NO production pathways of THP-1 derived macrophages infected by Leishmania amazonensis* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo"; 2023.

Leishmania amazonensis is a protozoan that causes mainly cutaneous leishmaniasis in humans. The amino acid arginine exerts a central role in the parasite survival within the macrophages and in the establishment of the infection since it supplies ornithine via arginase 1 as a precursor metabolite of the polyamines' pathway, that are essential molecules for the parasite proliferation. On the other hand, arginine can lead to nitric oxide (NO) production via nitric oxide synthase 2 (NOS2), the main effector leishmanicidal molecule. Different from what occurs in murine macrophages, there are studies pointing to the absence of NOS2 activity in human macrophages. Some studies show the importance of microRNAs in the regulation of immune response in the infection by different *Leishmania* and hosts species. In this study, we investigated the polyamines/NO pathway and miRNA-mediated regulations that change *L. amazonensis*' infectivity in human macrophages derived from the monocytic cell line THP-1. Initially, we quantified the expression profile of miRNAs involved in the inflammatory response and we identified positive modulation of miRNAs from the miR-372/373/520 family, that share the seed sequence AAGUGCU, responsible for the recognition of the target mRNA. This sequence is identical to the murine miR-294's seed, previously demonstrated as an important factor promoting infection by reducing the mRNA *Nos2*. Studies in collaboration demonstrated positive regulation of those miRNAs also in THP-1 infected with *L. braziliensis* and *L. infantum* and in the serum of visceral leishmaniasis patients. Our results show that the infection by arginase knockout-*L. amazonensis* is reduced after 24h and correlates with the absence of regulation of the studied miRNAs. To understand the importance of those miRNAs in the infection by *L. amazonensis*, we inhibited the miR-372, miR-373 and the miR-520d either alone or in combination and observed that the inhibition of the miR-372, but not the miR-373 and miR-520d alone, was able to reduce the proportion of infected macrophages and the number of amastigotes per macrophage. The simultaneous inhibition of the 3 miRNAs reduced even further the infection, while the use of mimics increased the proportion of infected macrophages, indicating a synergistic mechanism of the miR-372/373/520d promoting infectivity. These miRNAs share putative target-mRNAs encoding proteins involved in the uptake of amino acids, polyamine metabolism and urea cycle, including the main arginine transporter in macrophages, CAT2, whose mRNA is increased with the simultaneous inhibition of the miR-372/373/520d. On the other hand, the target site of mice NOS2 is not conserved in humans. In general, our results showed low modulation of the NO/polyamines pathway at transcriptional level and, to access the macrophage's phenotype, we quantified the metabolites levels using mass spectrometry-based metabolomics. Our data show that the infection increases production of urea cycle components and putrescine, while the inhibition of miR-372/373/520d reduces the production of putrescine, spermine and trypanothione. Our results evidence that the coregulation of the miR-372/373/520d family in the *Leishmania* infection acts in the regulation of genes involved in the L-arginine metabolism, culminating in the production of polyamines and favoring the establishment and maintaining the infection. The

molecular mechanisms described could be the basis to the development of host-directed therapies.

Descriptors: Cutaneous leishmaniasis; *Leishmania*; Macrophage; Gene expression; microRNAs; Metabolomics; Arginine.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
LISTA DE TABELAS	18
LISTA DE FIGURAS.....	20
RESUMO	22
ABSTRACT.....	24
SUMÁRIO	26
1 INTRODUÇÃO	31
1.1. Leishmanioses e <i>Leishmania</i>	31
1.2. Macrófagos humanos como modelo para o estudo da infecção por <i>Leishmania</i>	33
1.2.1. Linhagem THP-1	33
1.2.2. Macrófagos murinos <i>versus</i> macrófagos humanos	35
1.3. MicroRNAs na regulação da expressão gênica	35
1.3.1. Biogênese e ação de miRNAs	35
1.3.2. miRNAs na resposta à infecção por <i>Leishmania</i>	40
1.3.2.1. miRNAs modulados por <i>Leishmanias</i> dermatrópicas	41
1.3.2.2. miRNAs modulados por <i>Leishmanias</i> viscerotrópicas.....	43
1.4. Metabolismo de arginina e resposta imune.....	44
1.4.1. Metabolismo de arginina em <i>Leishmania</i>	44
1.4.2. Metabolismo de arginina em macrófagos.....	46
1.4.3. Resposta imune e metabolismo de arginina na infecção por <i>Leishmania</i>	49
1.5. Metabolômica	52
1.5.1. Técnicas metabolômicas.....	52
1.5.2. Metabolômica no estudo de leishmanioses	53

2	OBJETIVOS.....	55
2.1	Objetivos gerais.....	55
2.2	Objetivos específicos	55
3	MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	Organismos	57
3.1.1	Parasitas e cultivo	57
3.1.2	Monócitos e diferenciação dos macrófagos	57
3.2	Infecção	58
3.3	Manipulação de ácidos nucleicos	59
3.3.1	Extração de RNA.....	59
3.3.2	Transcrição reversa e RT-qPCR de microRNAs.....	60
3.3.3	Desenho dos primers e preparação de DNA molde para curva padrão ...	60
3.3.4	Transcrição reversa e RT-qPCR de mRNAs.....	61
3.4	Análise do papel dos microRNAs	62
3.4.1	Análise <i>in silico</i> dos alvos potenciais de microRNAs e enriquecimento de vias.....	62
3.4.2	Transfecção dos inibidores ou mimicos de miRNAs	62
3.4.3	Quantificação de proteína após transfecção de mimicos de miRNAs	62
3.4.4	Validação com pmiRGLO.....	63
3.5	Dosagem de óxido nítrico (NO) e nitrito	64
3.6	Metaboloma	64
3.6.1	Preparação de amostras.....	64
3.6.2	Plataforma CE-ESI-TOF/MS	65
3.6.3	Plataforma HILIC-MS	66
3.6.4	Processamento de dados e análise.....	66
3.7	Análise estatística	67
3.7.1	Análises univariadas	67
3.7.2	Análises multivariadas	68
3.8	Ética	68

4	RESULTADOS	69
4.1	Caracterização dos modelos celulares utilizados	69
4.2	Análise do perfil de miRNAs modulados na infecção por <i>Leishmania</i>	71
4.3	Análise do estado transcricional de genes relacionados com o transporte e metabolismo de arginina e produção de NO em macrófagos THP-1 infectados com <i>Leishmania</i>	77
4.4	Análise do papel dos miRNAs miR-372, miR-373 e miR-520d e possíveis alvos moleculares	80
4.5	Análises metabolômicas e a relação da família miR-372/373/520d com alterações metabólicas	85
5	DISCUSSÃO.....	99
5.1	Caracterização dos modelos usados.....	99
5.2	Modulação de miRNAs na infecção por <i>Leishmania</i>	100
5.3	A família de miRNAs miR-372/373/520d.....	103
5.4	Estado transcricional de genes relacionados com o metabolismo de arginina em macrófagos THP-1 infectados por <i>Leishmania</i> e produção de NO	105
5.5	Ação dos miR-372/373/520d na infecção por <i>Leishmania</i>	106
5.6	Metaboloma de macrófagos infectados com <i>Leishmania</i> e a relação com miRNAs e seus mRNAs-alvo.....	109
5.7	Limitações do estudo, perspectivas e considerações finais.....	114
5.7.1	Implicações dos achados de miRNAs	114
5.7.2	Limitações da abordagem de metabolômica utilizada	115
6	CONCLUSÕES	117
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXO A.....	145
	ANEXO B.....	146

1 INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses e *Leishmania*

As leishmanioses se enquadram no grupo de doenças tropicais negligenciadas e afetam cerca de 98 países, sendo predominantes em regiões com baixa estrutura e de conflito (Burza *et al.* 2018). Anualmente são reportados cerca de 1,3 milhões de novos casos (sendo a leishmaniose cutânea mais frequente, correspondendo a 0,7 a 1 milhão de casos) e cerca 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco (Akhoundi *et al.* 2016; Burza *et al.* 2018).

Das aproximadamente 53 espécies descritas de parasitas do gênero *Leishmania*, 20 são capazes de causar leishmaniose em humanos (Burza *et al.* 2018). Dessas, 15 já foram reportadas no Brasil (Herrera *et al.* 2020). As manifestações da doença variam com a espécie de *Leishmania* e com as características imunológicas do paciente. As formas clínicas são classificadas de acordo com a localização nos tecidos do paciente, e podem ser divididas em leishmaniose cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral (Burza *et al.* 2018). Atualmente, não há vacinas disponíveis e há ocorrência de parasitas resistentes aos tratamentos, que ainda são tóxicos (Burza *et al.* 2018).

Leishmania amazonensis causa a forma cutânea e cutânea difusa (caracterizada por 10 ou mais lesões em diferentes partes do corpo) da doença (Lainson & Shaw, 1978; Reithinger *et al.*, 2007). Apesar de apresentar cura espontânea na maioria dos casos, pode deixar cicatrizes (Reithinger *et al.* 2007). Cerca de 75% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, em uma dinâmica zoonótica de transmissão, sendo os principais reservatórios roedores e gambás (Reithinger *et al.* 2007; Burza *et al.* 2018; Herrera *et al.* 2020).

O gênero *Leishmania* (Ross 1903) integra a família Trypanosomatidae. São protozoários flagelados heteroxênicos, pois vivem em duas classes de hospedeiros: células fagocíticas de mamíferos e o trato digestório de insetos flebotomíneos. As promastigotas metacíclicas são regurgitadas durante o repasto sanguíneo (Schlein *et al.* 1992; Bates 2018) de insetos flebotomíneos fêmea dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomya* (Burza *et al.* 2018). No hospedeiro mamífero, os parasitas são fagocitados por

neutrófilos, células dendríticas e macrófagos residentes, mas são nos macrófagos que se multiplicam e estabelecem a infecção (Kaye e Scott 2011) (Figura 1).

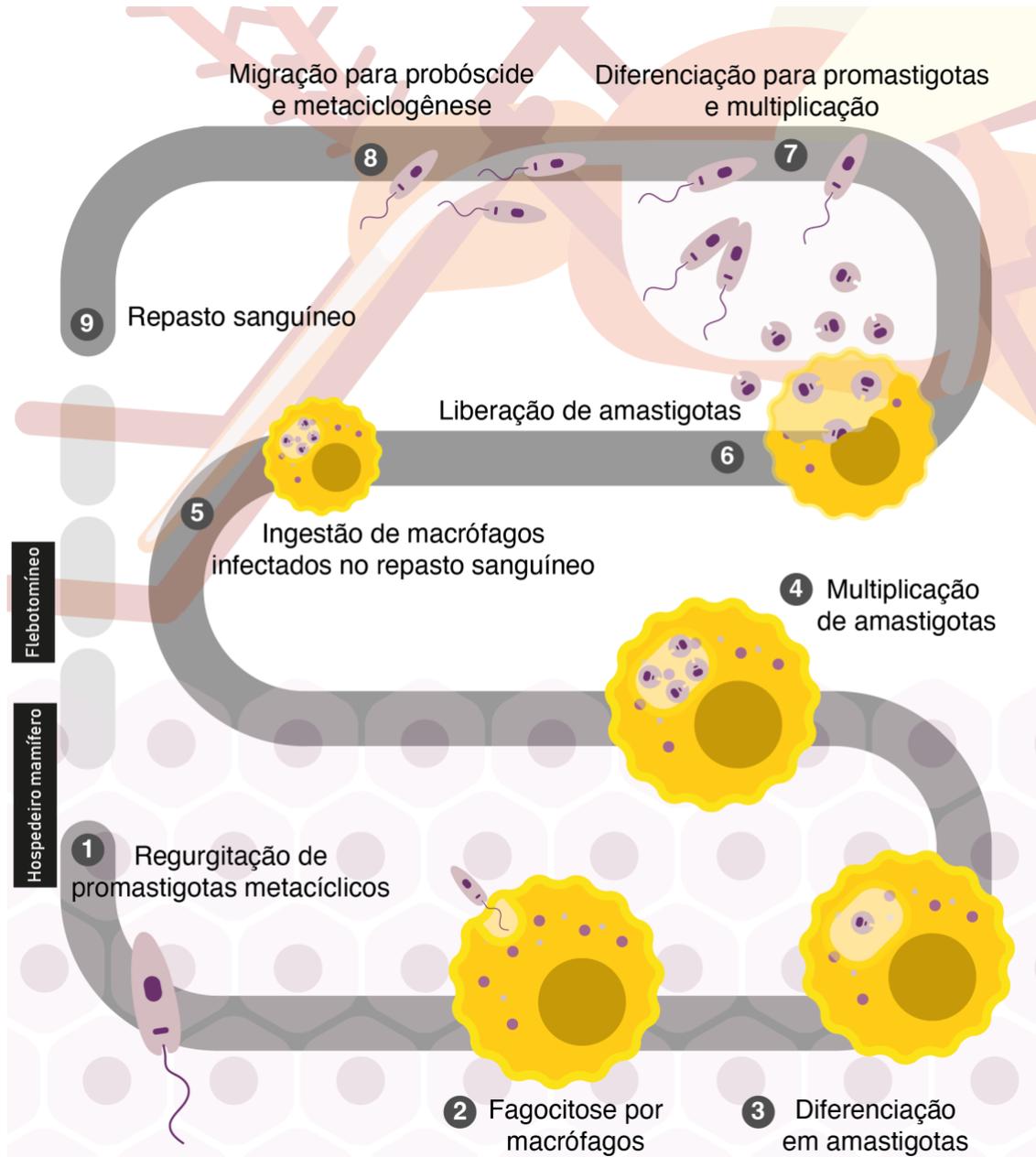


Figura 1 - Etapas do ciclo de vida de *Leishmania*. A infecção inicia com a regurgitação de promastigotas metacíclicas no hospedeiro mamífero (1) e se estabelece com a fagocitose (2) e diferenciação (3) de *Leishmania* em amastigotas. Os parasitas se multiplicam (4) no interior dos macrófagos, que são ingeridos no repasto sanguíneo (5) de flebotomíneos. No inseto, as amastigotas intracelulares são liberadas (6) e se multiplicam após diferenciação em promastigotas (7), que migram para a probóscide e se tornam infectivos no processo de metaciclogênese (8). A promastigota metacíclica é regurgitada no repasto sanguíneo (9), dando continuidade ao ciclo. Figura produzida pela autora com base em (Kaye e Scott 2011).

L. amazonensis se multiplica dentro de um único vacúolo parasitóforo em macrófagos (Carneiro e Peters 2021), onde é capaz de subverter os mecanismos de resposta imunológica (Soong 2012).

1.2. Macrófagos humanos como modelo para o estudo da infecção por *Leishmania*

1.2.1. Linhagem THP-1

A linhagem celular THP-1 foi obtida inicialmente a partir de um isolado de um menino de 1 ano com leucemia monocítica aguda em 1980 (Tsuchiya *et al.* 1980), e posteriormente caracterizada como uma linhagem monocítica (Åbrink *et al.* 1994). Desde então, THP-1 vem sendo utilizada em diversos estudos de função de monócitos e, após a sua diferenciação, de macrófagos (Chanput *et al.* 2014), sendo também, desde o início, amplamente utilizada como modelo de célula hospedeira em estudos com *Leishmania* (Ogunkolade *et al.* 1990; Singh *et al.* 2015; dos Santos *et al.* 2017; Gatto *et al.* 2020; Souza *et al.* 2021; Ramos-Sanchez *et al.* 2022). O modelo de macrófago THP-1 é similar ao modelo de células primárias diferenciadas de monócitos de sangue periférico, as PBMCs (Auwerx 1991), uma vez que, diferente da linhagem U937, apresenta mobilidade ao ser exposta a quimioatraentes (Riddy *et al.* 2018).

A vantagem de se utilizar linhagem como modelo experimental é uma menor variação entre células, pois sua manutenção é feita em meio controlado e padronizado, enquanto a maior fonte de variação em culturas primárias se dá entre os diferentes doadores (Aldo *et al.* 2013; Pinto *et al.* 2020). A utilização dessas células também tem vantagens de custo, facilidade de obtenção de maior número de células, uma vez que são imortalizadas e multiplicam com menor tempo de duplicação (Lund *et al.*, 2016; Tsuchiya *et al.*, 1980). Entre as desvantagens estão a característica de *background* maligno (Adati *et al.* 2009; Bosshart e Heinzelmann 2016), diferenças entre as células provenientes de diferentes fornecedores (Noronha *et al.* 2020), diferenças de resposta a estímulos com relação a PBMCs (Kohro *et al.* 2004; Schildberger *et al.* 2013; Shiratori *et al.* 2017), cultura por longos períodos em condições que não se assemelham ao ambiente encontrado no soro (Chanput *et al.* 2014) e alteração de características fenotípicas e funcionais devidas ao tempo de cultivo, número de passagens e densidade de células em cultura (Tominaga *et al.* 1998; Aldo *et al.* 2013).

A diferenciação da linhagem monocítica THP-1 é realizada com forbol miristato acetato (PMA). Forbol ésteres são análogos de diacil glicerol e atuam translocando e ativando isoenzimas do tipo proteína quinase C (PKC) do citosol para membranas. A ativação se dá pela ativação de cPKCs, mais especificamente a isoforma PKC β (Barilli *et al.* 2011). A cascata envolve a ativação da quinase associada a macrófago MAP3K7, central na diferenciação fenotípica e funcional do macrófago (Richter *et al.* 2016). Após o estímulo inicial para sua diferenciação, é realizado um período de “descanso” prévio ao estímulo a ser estudado, uma vez que isso contribui para a redução da ativação de vias relacionadas ao processo de diferenciação (Chanput *et al.* 2014). Após a diferenciação, macrófagos THP-1 exibem um fenótipo de adesão, perda de proliferação, aumento da capacidade fagocítica, produção de espécies reativas de oxigênio e expressão aumentada de marcadores de diferenciação, como CD14 e CD11b (Chanput *et al.*, 2014; Kohro *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2016; Schwende *et al.*, 1996; Starr *et al.*, 2018).

No entanto, na literatura se encontra condições de cultivo e diferenciação extremamente variáveis, que podem ser fonte de variabilidade entre os estudos (Aldo *et al.* 2013; Starr *et al.* 2018; Pinto *et al.* 2020). Alguns estudos não identificaram a modulação de CD14, uma vez que dependendo das condições de cultivo uma alta parcela das células já apresentam a expressão desse marcador (Riddy *et al.* 2018) ou ainda identificaram diminuição de CD14 durante a diferenciação em análise proteômica (Pinto *et al.* 2020). Outro estudo identificou, ainda, que diferenças na densidade de células em cultura podem levar ao aumento ou diminuição em CD14 nos monócitos antes e após a diferenciação em macrófagos, com diferença nas citocinas moduladas durante a diferenciação em diferentes condições (Aldo *et al.* 2013). Em THP-1 e monócitos primários, CD14 foi implicado como importante na produção de IL-8 em resposta a LPS (Bosshart e Heinzelmann 2016), uma vez que junto com receptor do tipo Toll (TLR) 4 e a proteína de diferenciação mieloide 2 (MD2) formam o complexo de resposta a LPS.

Alteração na concentração de PMA, tempo de incubação e troca de meio podem levar a diferentes respostas a estímulos como LPS, indicando que concentrações a partir de 25ng/mL induzem fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-8, CCL4 e IL1 β de maneira dose dependente (Park *et al.* 2007), porém esse estudo desconsidera que o período de descanso possa reverter esse estado hiperativado após a diferenciação. No entanto,

concentrações altas de PMA (100nM), mesmo com período de descanso, podem induzir secreção de TNF- α compatível com o perfil de macrófagos pró-inflamatórios (Lund *et al.*, 2016) e impedem a polarização com estímulos como IL-10 (Maeß *et al.* 2014). O uso de baixas concentrações de PMA foi descrito como uma boa estratégia para a detecção de resposta a estímulos fracos e polarizantes (Park *et al.* 2007; Maeß *et al.* 2014).

1.2.2. Macrófagos murinos *versus* macrófagos humanos

A resposta a estímulos em macrófagos murinos e humanos difere em múltiplos níveis, sendo possível explicar a variação fenotípica de função das células imunes com base na evolução dos genes e sua regulação (Schroder *et al.* 2012).

Diversos estudos demonstraram diferenças funcionais de macrófagos murinos e humanos frente a estímulos inflamatórios, incluindo adesão (Schroder *et al.* 2012) e mecanismos microbicidas, como o metabolismo de arginina, que será apresentado no subcapítulo 1.4 (Mestas e Hughes 2004; Thomas e Mattila 2014).

Em macrófagos murinos a resposta é bem caracterizada de acordo com o fundo genético do hospedeiro, sendo que o paradigma M1 e M2 foi determinado na infecção de camundongos das linhagens isogênicas BALB/c e C57BL/6 por *L. major*, respectivamente com alta produção de Interleucina (IL)-4 e Interferon (IFN)- γ por células T (Heinzel *et al.* 1989). No entanto, a padronização na nomenclatura de macrófagos M1 ou M2 é problemática e dificilmente se pode traduzir os achados de camundongos para humanos (Murray *et al.* 2014).

RNA-seq e miR-seq de macrófagos humanos expostos a 28 estímulos diferentes mostrou que o espectro de ativação pode ser visualizado nos transcritos em resposta a diferentes estímulos. Essa resposta difere de macrófagos murinos e os microRNAs (miRNAs) desempenham um importante papel nessa variabilidade (Xue *et al.* 2014).

1.3. MicroRNAs na regulação da expressão gênica

1.3.1. Biogênese e ação de miRNAs

Diferentes classes de RNAs que não codificam proteínas controlam a expressão gênica, sendo os mais estudados os *long non-coding RNAs* (lncRNAs) (Fernandes *et al.*, 2019), capazes de controlar múltiplas etapas, e os miRNAs, reguladores pós

transcricionais. Cabe destacar que apenas recentemente os lncRNAs foram implicados na infecção com *Leishmania* (Fernandes *et al.*, 2023; Maruyama *et al.*, 2022), enquanto a implicação de miRNAs tem sido amplamente descrita e será apresentada no subcapítulo 1.3.2.

miRNAs possuem de 21 a 22 nucleotídeos e atuam no silenciamento de mRNAs alvo reconhecidos majoritariamente pela porção 3' não traduzida (3' UTR) (Grimson *et al.* 2007). O banco de dados miRBase (versão 22) registra 1913 potenciais miRNAs humanos (Kobayashi e Tomari 2016). O silenciamento mediado por miRNAs pode ocorrer pela degradação do mRNA-alvo ou afetando o nível de proteínas traduzidas a partir dele (Baek *et al.* 2008). Diversos mecanismos são descritos: a) deadenilação ou decapeamento do mRNA alvo, que pode ser degradado ou armazenado nos corpos de processamento (*P bodies*) (Parker e Sheth 2007), b) repressão do início da tradução (Humphreys *et al.* 2005), por bloqueio do 5'cap (Pillai *et al.* 2005) ou do acoplamento das subunidades ribossômicas, c) bloqueio da junção de novos aminoácidos do peptídeo em formação ou d) proteólise (Pereira 2015). Os miRNAs atuam majoritariamente no citoplasma, mas também podem ser encontrados no núcleo em condições específicas (Turunen *et al.* 2019) podendo mediar ativação de genes a nível transcricional (Place *et al.* 2008).

A biossíntese de miRNAs se inicia no núcleo com a transcrição dos miRNAs primários (pri-miRNAs) (Lee *et al.* 2002) pela RNA polimerase II ou, menos frequentemente, pela RNA polimerase III, a depender da região genômica (Borchert *et al.* 2006). Os miRNAs podem ser codificados em regiões intergênicas, que podem codificar um ou mais miRNAs em um *cluster* gerando, respectivamente, transcritos mono- ou policistrônicos, ou de regiões intragênicas, como é o caso dos miRNAs intrônicos (Figura 2). miRNAs intrônicos são frequentemente coexpressos com o gene hospedeiro (Baskerville e Bartel 2005).

O transcrito inicial apresenta estrutura secundária com segmentos de RNA em fita simples e uma estrutura central em grampo com um segmento de RNA em fita dupla (Kim *et al.* 2021). Sequências-motivo do pri-miRNA são reconhecidas e clivadas em sítios específicos pelos componentes do chamado microprocessador: a enzima DROSHA, endonuclease do tipo RNase III, e o cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region*

8). O miRNA precursor (pre-miRNA) resultante da clivagem (Lee *et al.* 2003; Kim *et al.* 2021) sai do núcleo pela exportina 5 (Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2003). O processamento continua no citoplasma, onde a enzima RNase III Dicer cliva o pre-miRNA isolando a região de RNA em fita de aproximadamente 22 nucleotídeos da estrutura do grampo (Grishok *et al.* 2001; Hutvagner *et al.* 2001; Knight e Bass 2001). Uma das fitas corresponde ao miRNA maduro e é incorporada ao miRISC (*miRNA-induced silencing complex*). O complexo ribonucleoproteico é formado pelas proteínas argonautas (AGO1-4) e cofatores, que atuam no silenciamento do mRNA alvo reconhecido pelo miRNA associado (Kobayashi e Tomari 2016) (Figura 2).

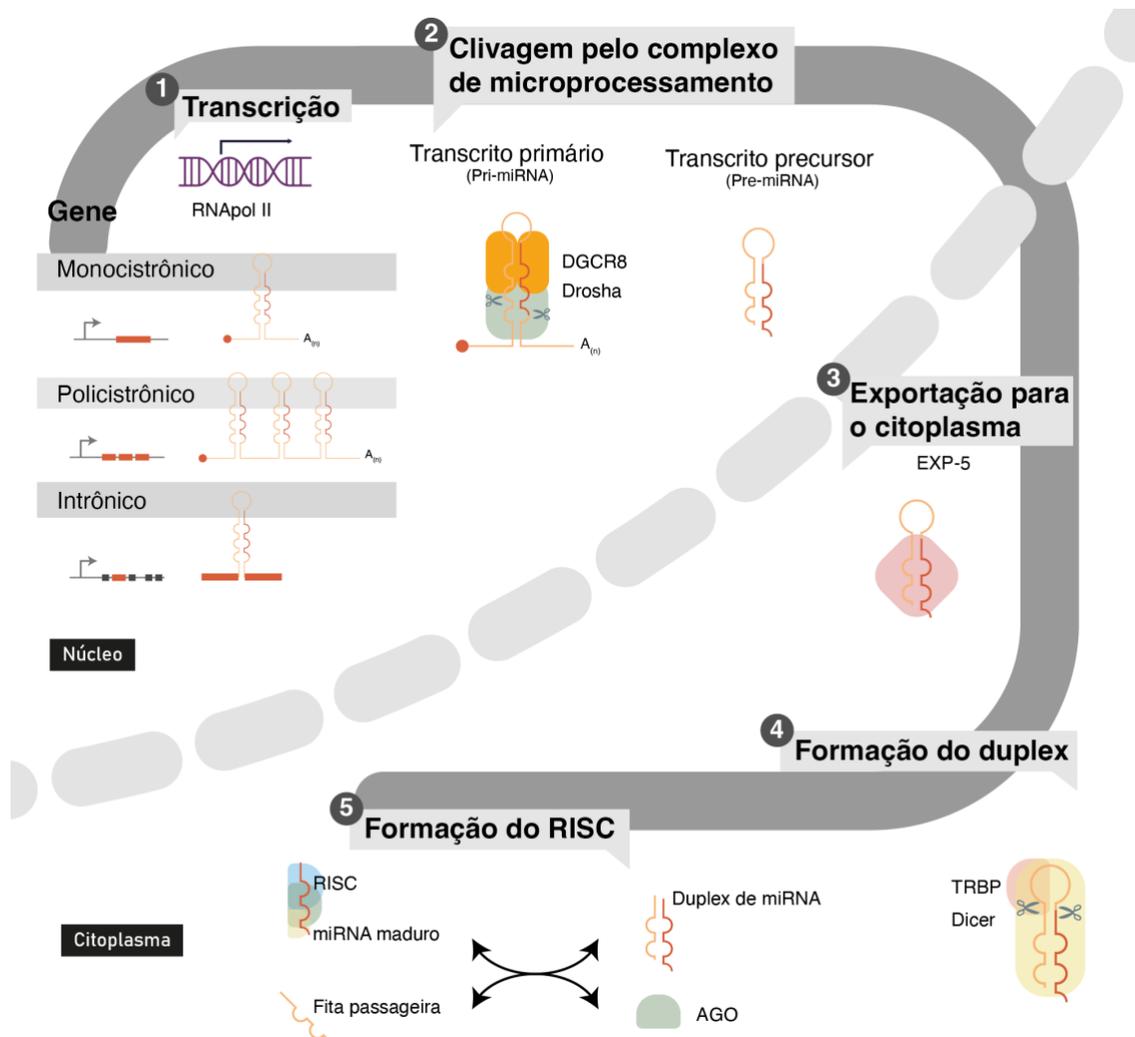


Figura 2 - Biogênese de microRNAs. A transcrição ocorre no núcleo mediada pela RNA pol II (1) e o pri-miRNA é clivado pelo complexo de microprocessamento composto por DGCR8 e Drosha (2), originando o pre-miRNA que é exportado para o citoplasma via EXP5 (3). O pre-miRNA é processado por Dicer/TRBP e origina um duplex de miRNA que participa na formação do RISC (5), sendo que o miRNA permanece associado à AGO e a fita passageira é liberada. RNA pol II: RNA polimerase II; DGCR8: do inglês, *DiGeorge syndrome critical region 8*; EXP-5: exportina-5; TRBP: do inglês, *TAR RNA-binding protein*; AGO: argonata; RISC: do inglês, *RNA-induced silencing complex*. Figura produzida pela autora com base em (Ha e Kim 2014).

Apesar de pequena, a sequência de miRNAs possui motivos funcionais, como a âncora 5', composta pelo primeiro nucleotídeo, na qual ocorre o ancoramento à proteína argonata. O reconhecimento e pareamento por complementariedade ao alvo ocorre pela sequência *seed* (geralmente dos nucleotídeos 2 a 8). Também são caracterizadas as regiões: central (nucleotídeos 9-12), que pode participar do pareamento ao mRNA-alvo, e a região da cauda 3' (nucleotídeos 17-22) (Wee *et al.* 2012). Em diversos organismos-modelo o pareamento pela região *seed* é necessário para a função dos miRNAs (Wang

Em estudo com transfecção de mímicos de miRNAs, a maior parte de mRNAs modulados apresentam complementariedade do tipo 7-8mer, mas outros fatores influenciam a eficácia da modulação, como pareamento complementar via região 13-16 dos miRNAs, o posicionamento ao longo da região 3'UTR, composição "AU" e a proximidade a sítios de ligação de outros miRNAs coexpressos (Grimson *et al.* 2007). Por esse motivo, miRNAs com sequências *seed* semelhantes ou idênticas têm alvos em comum e podem atuar em uma mesma via. miRNAs com sequência distinta também podem apresentar ação conjunta em redes regulatórias mediadas por miRNAs, uma vez que, apesar de distintos, os genes-alvo podem estar envolvidos uma mesma via de sinalização ou metabólica (Kehl *et al.* 2017).

Frequentemente, miRNAs que atuam em conjunto estão organizados *in tandem* em *clusters* genômicos e são expressos em conjunto de maneira policistrônica. Em sua maioria, os *clusters* são originados por duplicações gênicas (miRNAs parálogos), levando ao surgimento de miRNAs especializados (que compartilham ou não a *seed*), mas funcionalmente relacionados, ao longo da evolução (Wang *et al.*, 2016). A função cooperativa de miRNAs coexpressos implica em um mecanismo de repressão mais sensível a pequenas mudanças nos níveis de miRNAs e a regulação torna-se mais complexa, possibilitando mecanismos combinatórios (Grimson *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2019). miRNAs contendo a mesma sequência *seed* em uma mesma espécie são caracterizados como uma família de miRNAs (Ha e Kim 2014) e, portanto, compartilham mRNAs-alvo. No entanto, o pareamento pode se dar também na região central e da cauda 3' dos miRNAs, afetando a eficácia do silenciamento de alvos e a especificidade da regulação por membros de uma mesma família de miRNAs, que compartilham a sequência *seed* mas não regiões à 3' (Broughton *et al.*, 2016; Duan *et al.*, 2022). Um dos mecanismos de regulação e variabilidade que gera os chamados IsomiRs é a adição ou retirada de nucleotídeos na região 5' do miRNA, fazendo com que a sequência *seed* seja deslocada (Bofill-De Ros *et al.* 2020).

1.3.2 miRNAs na resposta à infecção por *Leishmania*

Foram identificados miRNAs específicos para diversas populações celulares envolvidas no sistema imune em condições basais e após estímulos inflamatórios (Rose

et al. 2021). Particularmente, muitos miRNAs foram identificados como importantes na polarização de macrófagos murinos (Zhang *et al.* 2013b; Lu *et al.* 2016) e humanos (Graff *et al.* 2012) por ação em alvos diversos, incluindo fatores de transcrição (Li *et al.* 2018).

miRNAs também foram estudados na infecção por *Leishmania* como importantes reguladores das funções do macrófago e reestruturação da resposta imune (Lemaire *et al.* 2013; Tiwari *et al.* 2017; Rashidi *et al.* 2021). Foi demonstrado que, durante a infecção, miRNAs regulam diversos processos, como a polarização dos macrófagos e células T CD4+, apoptose, autofagia, maturação do fagolisossomo e resistência a drogas (Jafarzadeh *et al.* 2022).

É importante ressaltar que apenas o subgênero *L. (Viannia)* possui maquinaria de RNAi intacta (Lye *et al.* 2010) e, portanto, os miRNAs e seus efeitos encontrados neste estudo são exclusivos dos macrófagos.

1.3.2.1 miRNAs modulados por *Leishmanias* dermatóricas

O estudo de Lemaire *et al.* 2013 foi um dos primeiros a identificar a alteração do perfil de miRNAs de macrófagos derivados de PBMCs infectados com *L. major* (Lemaire *et al.* 2013). Demonstrou-se, ainda, que a alteração do perfil é dependente de fatores de transcrição, no qual foi validada a ligação de HIF-1 α na modulação positiva do hsa-miR-210 (Lemaire *et al.* 2013).

Posteriormente, começou-se a caracterizar o envolvimento de miRNAs em processos celulares conhecidamente implicados na patogênese de *Leishmania*. Dada a importância do metabolismo de arginina, nosso grupo contribuiu com o achado de que os miRNAs murinos mmu-miR-294 e mmu-miR-721 são modulados positivamente e promovem a infecção por inibição da *Nos2* em macrófagos murinos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (Muxel *et al.* 2017), enquanto mmu-miR-294 e mmu-miR-410 regulam os transportadores de arginina CAT1/2 em macrófagos de camundongos C57BL/6 (Acuña *et al.*, 2022). Demonstramos, ainda, que mmu-let7-e é modulado positivamente em macrófagos murinos C57BL/6 e que a inibição desse miRNA também leva ao aumento de NOS2 e produção de NO (Muxel *et al.*, 2018).

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou que mmu-miR-294, mmu-miR-302d e mmu-miR-30e estão envolvidas no mecanismo molecular de ação da melatonina na

infecção por *Leishmania* em macrófagos murinos (Fernandes *et al.*, 2019), previamente demonstrada como importante na redução da infecção de *Leishmania* em hamster (Laranjeira-Silva *et al.* 2015).

Os miRNAs estão implicados também na virulência de *L. guyanensis* contendo o vírus de RNA de *Leishmania* 1 (do inglês, LRV1), uma vez que parasitas contendo o vírus LRV1 estimulam TLR3 e miR-155, levando à persistência do parasita (Eren *et al.* 2016). O mmu-miR-155, apesar de caracterizado como miRNA inflamatório em diversos modelos estudados, também permite a progressão da infecção de *L. major* em modelo murino *in vivo* e *in vitro* em células dendríticas (Varikuti *et al.* 2021).

Além de macrófagos e células dendríticas, outras células apresentam modulação de miRNAs. Foi demonstrado que neutrófilos expostos a *L. amazonensis* liberam miRNAs associadas a AGO2 nas armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, NETs) e modulam a resposta dos macrófagos (Linhares-Lacerda *et al.* 2020).

Alguns estudos exploram também miRNAs reduzidos durante a infecção, como os mmu-miR-340 e mmu-miR-27a em macrófagos murinos RAW 264.7 infectados por *L. major* (Hamidi *et al.* 2021). Nesse caso, a transfecção de mímicos foi capaz de reduzir a infecção (Hamidi *et al.* 2021), revelando que tanto miRNAs aumentados como reduzidos durante a infecção por *Leishmania* são importantes mecanismos para a garantia de um ambiente permissivo à infecção.

Estudos envolvendo amostras de pacientes demonstraram que os miRNAs também estão modulados na doença humana e que são bons marcadores de prognóstico, como avaliado em biopsias de pacientes com lesão por *L. braziliensis* (Nunes *et al.* 2018). Os miRNAs modulados na lesão também circulam, uma vez que foram demonstrados marcadores de miRNAs em soro que diferem em pacientes com lesão ativa ou cura espontânea em comparação com indivíduos saudáveis (Souza *et al.* 2021). Esse último estudo também detectou alteração no perfil de miRNAs *in vitro* em macrófagos humanos THP-1 e validou hsa-miR-548d como essencial para a infectividade de *L. braziliensis* (Souza *et al.* 2021).

Ainda, Geraci *et al.* (2015) demonstraram que 85% dos miRNAs regulados por *L. major* estavam reduzidos com relação ao controle não infectado, enquanto mais da metade dos miRNAs regulados na infecção por *L. donovani* estavam aumentados em

macrófagos e células dendríticas derivados de monócitos de doadores humanos (Geraci *et al.* 2015), sendo um dos primeiros estudos a indicar que a resposta mediada por miRNAs seria diferente na infecção por espécies de *Leishmania* dermatrópicas e viscerotrópicas.

1.3.2.2 miRNAs modulados por *Leishmanias* viscerotrópicas

A modulação de miRNAs é essencial para o estabelecimento da infecção nos macrófagos por *L. donovani*, uma vez que, quando precedida por estimulação com LPS, a fosforilação de AGO2 impede a ação de miRNAs e o estabelecimento da infecção. Por outro lado, AGO2 mutante (insensível a inibição por fosforilação) permite a ação dos miRNAs na reprogramação do macrófago e a infecção por *Leishmania* (Mazumder *et al.* 2013).

Alguns estudos avaliaram a infecção de macrófagos derivados de THP-1 com cepas isoladas de pacientes com leishmaniose visceral (Diotallevi *et al.* 2018; Kumar *et al.* 2020a) ou cepas referência de *L. infantum* (Ramos-Sanchez *et al.* 2022), com destaque para a regulação dos miRNAs miR-93-5p (Kumar *et al.* 2020a), miR-346 (Diotallevi *et al.* 2018) e miR-548d (Ramos-Sanchez *et al.* 2022). Esse último estudo, ainda, validou a expressão de miRNAs encontrados *in vitro* também no soro de pacientes com leishmaniose visceral (Ramos-Sanchez *et al.* 2022).

Kumar *et al.* (2020) demonstraram alteração de miRNAs também em linfócitos T CD4⁺ auxiliares em cocultura com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, limitando a polarização dos linfócitos em Th1 e favorecendo o perfil Th2 (Kumar *et al.*, 2020).

No entanto, poucos estudos demonstraram mecanismos pelo qual *Leishmania* pode regular a expressão de miRNAs do hospedeiro. O aumento da expressão de miR-146a na infecção por *L. donovani* se dá pela ação de um *superenhancer*, elemento transcricional regulatório em *cis* (Das *et al.* 2021). Ghosh *et al.* (2013) demonstraram que a glicoproteína 63 (GP63) é exportada em exossomos por *L. donovani* e é capaz de clivar Dicer1, que leva ao acúmulo de pre-miR-122 e redução do miR-122 maduro, interferindo no metabolismo de lipídeos de camundongos infectados (Ghosh *et al.* 2013). Mais adiante foi demonstrado que a infecção de macrófagos murinos com *L. donovani* leva ao

aumento da expressão de Ucp2 levando ao desacoplamento mitocondrial. O desacoplamento impede a entrada de vesículas extracelulares carregando o miR-122 proveniente do fígado e, por outro lado, aumenta a exportação de vesículas carregadas com miR-146a (Ganguly *et al.* 2021). Goswami *et al.* (2020) identificaram a ação de GP63 de *L. donovani* também na clivagem de HuR (do inglês, *human antigen R*), um exportador de miRNAs, favorecendo o acúmulo de miRNAs que levam à redução de citocinas pró-inflamatórias em macrófago murino (Goswami *et al.* 2020). Colineau *et al.*, (2018) por outro lado, demonstraram redução nos níveis de miRNAs por *L. donovani* durante a infecção de hMDMs por bloqueio da transcrição de miRNAs por c-Myc (Colineau *et al.* 2018). Em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c ocorre o estabelecimento de um ambiente hipóxico e a expressão de HIF-1 α durante a infecção por *L. donovani*, induzindo o miR-210 que impede a ativação e translocação de NF- κ B ao núcleo, produção de citocinas pró-inflamatórias e de radicais livres de oxigênio e nitrogênio (Kumar *et al.*, 2018). Por fim, estudos pré-clínicos de vacina baseada na cepa atenuada de *L. donovani* nocaute de centrina colocam miRNAs também como peças centrais na imunização em modelo de leishmaniose visceral (Gannavaram *et al.* 2019), corroborando a ideia de que o estudo de miRNAs é essencial para o avanço no combate às leishmanioses.

1.4. Metabolismo de arginina e resposta imune

1.4.1. Metabolismo de arginina em *Leishmania*

O aminoácido L-arginina é essencial para o cultivo de promastigotas axênicas de *Leishmania* (Steiger e Steiger 1977), dessa forma, o parasita depende da tomada de arginina via permease de aminoácidos 3 (AAP3). O gene que codifica esse transportador está presente em duas cópias, organizadas *in tandem* no cromossomo 31 do genoma de *L. donovani* (*Ld-aap3* 3.1 e *Ld-aap3* 3.2) e de *L. amazonensis* (*La-aap3* 5.1 e *La-aap3* 4.7) (Castilho-Martins *et al.* 2011). Apesar de apresentarem 98% de identidade na região da fase aberta de leitura (ORF), as sequências 3'UTR são distintas entre as duas cópias, assim como os mecanismos de regulação de expressão de cada cópia (Aoki *et al.*, 2017). Nosso grupo demonstrou a localização do transportador AAP3 de *L. amazonensis* na membrana plasmática e no glicossomo do parasita nas formas promastigotas e

amastigotas (Aoki *et al.*, 2017). A expressão de AAP3 é regulada também na fase intracelular do ciclo de *Leishmania*, uma vez que a privação de arginina no hospedeiro leva a uma resposta de privação (ADR, *arginine deprivation response*), que culmina no aumento da expressão do transportador em *L. donovani* (Goldman-Pinkovich *et al.* 2016). Essa regulação parece ser importante, uma vez que *L. donovani* nocaute para a cópia regulável de AAP3 (AAP3.2) é menos infectiva em BMDM de camundongo BALB/c e em macrófagos THP-1 (Goldman-Pinkovich *et al.* 2020).

Leishmania apresenta a enzima arginase (Camargo *et al.* 1978; da Silva *et al.* 2002) compartimentalizada no glicossomo (da Silva *et al.* 2008; Laranjeira-Silva *et al.* 2012; Boitz *et al.* 2017) enquanto outras enzimas da via de produção de poliaminas, como *Odc*, *AdometDC*, e *Spdsyn* estão localizadas no citoplasma (Roberts *et al.* 2004).

A enzima arginase é essencial para a sobrevivência da promastigota axênica, como demonstrado pela caracterização de linhagens de *Leishmania* nocaute de arginase em espécies como *L. donovani* (Boitz *et al.* 2017), *L. mexicana* (Roberts *et al.* 2004; Gaur *et al.* 2007), *L. major* (Roberts *et al.* 2004) e *L. amazonensis* (da Silva *et al.* 2008). Esse não é o caso das amastigotas intracelulares, pois ocorre tomada de ornitina e poliaminas do hospedeiro (Boitz *et al.* 2017). No entanto, parasitas nocaute de arginase são menos infectivos.

L. mexicana nocaute de arginase é menos infectiva *in vivo* e *in vitro*, ocorrendo maior produção de NO em macrófagos infectados pelo parasita nocaute e maior produção de citocinas pró-inflamatórias nos linfonodos de camundongos infectados (Gaur *et al.* 2007). *L. amazonensis* nocaute de arginase (*La-arg*) ou com arginase sem sinal de endereçamento para o glicossomo (Laranjeira-Silva *et al.* 2012) são menos infectivas em macrófagos murinos. Outros estudos apontam que, independente da atividade de NOS2 do macrófago, *L. major* nocaute de arginase é menos infectiva e retarda o aparecimento de lesão em camundongos susceptíveis, provavelmente devido à redução da atividade de ARG1 (Muleme *et al.* 2009). Em modelo visceral, *L. donovani* nocaute de arginase apresenta menor carga parasitária no fígado, mas não no baço de camundongos infectados em comparação com o parasita selvagem (Boitz *et al.* 2017).

A ausência de arginase no parasita também modula o transcriptoma de macrófagos murinos comparado à infecção com *L. amazonensis* selvagem (Aoki *et al.* 2020) e de

promastigotas comparadas com amastigotas axênicas (Aoki *et al.* 2017), incluindo transcritos de fatores de virulência (Aoki *et al.* 2019), que poderiam explicar mais uma razão pela qual *La-arg* é menos infectiva.

Uma via alternativa de produção de poliaminas em *Leishmania* é via arginina descarboxilase (ADC) produzindo agmatina, que é posteriormente convertida em putrescina pela enzima agmatinase (Aoki *et al.*, 2017; Castilho-Martins *et al.*, 2015). Os transportadores de putrescina e espermidina já foram investigados em *L. donovani*, *L. mexicana* e *L. major* (Basselin *et al.* 2000; Hasne e Ullman 2005).

A produção de espermidina e a tomada de glutatona do hospedeiro é essencial para a produção de tripanotiona (N1-N8-bisglutationil espermidina, T(SH)₂) pela tripanotiona sintetase (TryS) (Colotti e Ilari 2010), essencial para o controle redox do parasita e defesa contra estresse oxidativo no macrófago (Colotti e Ilari 2010; Ali *et al.* 2022).

Diversos estudos já haviam demonstrado a produção de NO e citrulina em *Leishmania* (Basu *et al.* 1997; Genestra *et al.* 2006a; Sarkar *et al.* 2011), sendo mais recentemente demonstrada a presença de uma NOS-like em *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em regiões próximas ao glicosomo, mitocôndria e bolso flagelar (Furtado *et al.* 2021). Nosso grupo detectou o aumento da produção de L-ornitina em *L. amazonensis* nocaute de arginase (Castilho-Martins *et al.* 2015) e demonstrou a importância do papel do NO produzido pelo parasita na metaciclo gênese (Acuña *et al.*, 2017), corroborando os achados da literatura (Genestra *et al.*, 2006), e na diferenciação de amastigotas axênicas (Temporal *et al.* 2008). A evidência de produção de NO em promastigotas e amastigotas corrobora os achados que demonstram que o papel biológico dessa molécula está relacionado à sua concentração no sítio de ação e sinalização (Somasundaram *et al.* 2020).

1.4.2. Metabolismo de arginina em macrófagos

O metabolismo de arginina é central na polarização de macrófagos pró-inflamatórios (M1) e anti-inflamatórios (M2) (Rath *et al.* 2014). Apesar de macrófagos murinos M1 poderem regenerar arginina no ciclo citrulina-NO (Nussler *et al.* 1994), macrófagos nocautes do transportador de aminoácidos catiônicos (CAT) 2 demonstraram abolição

(Nicholson *et al.* 2001) ou redução (Yeramian *et al.* 2006b) na produção de NO, citrulina e poliaminas em macrófagos murinos ativados.

O transportador CAT2 é codificado pelo gene *solute carrier family 7* (SLC7) A2, sendo CAT2B a principal isoforma responsável pelo transporte de arginina em macrófagos ativados, e é induzido por citocinas produzidas por Th1 e Th2. Em macrófagos em condições basais, o transporte de arginina ocorre majoritariamente pelo sistema y+L (transportadores heterodiméricos sensíveis à inibição por L-leucina) e via CAT1 (gene SLC7A1) do sistema y+ (Yeramian *et al.*, 2006).

Existem duas isoformas da enzima arginase que catalisam a hidrólise de L-arginina a ureia e ornitina, e dependem de manganês como cofator (Kanyo *et al.* 1996). A arginase 1 (ARG1) é citoplasmática, enquanto a arginase 2 é encontrada na mitocôndria. Em humanos, os granulócitos possuem ARG1 compartimentalizada em grânulos azurofílicos e a enzima atua em um mecanismo microbicida, uma vez que leva à depleção de arginina no fagolisossomo (Munder *et al.* 2005).

Diversos estudos demonstraram que a expressão de ARG1 é um componente anti-inflamatório em macrófagos M2 pois limita a disponibilidade de substrato L-arginina para a enzima NOS2 (Rath *et al.* 2014). ARG1 é induzida por IL-10, IL-4 e prostaglandina E2 (PGE2) (Corraliza *et al.* 1995) e pelo reconhecimento de receptores do tipo Toll (TLR) (el Kasmi *et al.* 2008; Muxel *et al.* 2018a) em macrófagos murinos.

Em macrófagos alveolares humanos, a ARG1 é sinergisticamente induzida com o aumento de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) em combinação com IL-4 ou TGF- β (Erdely *et al.* 2006). No entanto, outros estudos falharam em detectar expressão de ARG1 ou atividade de arginase em macrófagos humanos (primários ou THP-1) com o tratamento com IL-4 (Munder *et al.*, 2005; Raes *et al.*, 2005).

A enzima ARG2 foi demonstrada como essencial na reprogramação metabólica mitocondrial em resposta a IL-10 em macrófagos murinos. O estudo detectou mRNA e proteína ARG2 em macrófagos humanos THP-1, mas não validou todos os mecanismos de reprogramação metabólica nessas células (Dowling *et al.* 2021). Esses dados corroboram a demonstração anterior de que a deleção de ARG2 aumenta a resposta pró-inflamatória de macrófagos infectados por *Helicobacter pylori* (Hardbower *et al.* 2016).

Por outro lado, a enzima ARG2 tem um componente pró-inflamatório, já que permite a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) mitocondrial (Ming *et al.* 2012).

A ornitina, produto da arginase, é precursora na via de produção de poliaminas, ao ser metabolizada em putrescina pela atividade de ornitina descarboxilase (ODC). Putrescina, por sua vez, é convertida em espermidina pela espermidina sintase (SRM), e esta é substrato da espermina sintase (SMS) na produção de espermina (Latour *et al.* 2020). Putrescina, espermidina e espermina são poliaminas, pequenas moléculas policatiônicas que regulam diversos processos celulares como a replicação do DNA, tradução de proteínas, crescimento celular e diferenciação (Pegg 2009). As poliaminas podem ser imunomoduladoras, uma vez que espermina impede a produção das citocinas pró-inflamatórias TNF, IL-1, IL-6, proteína inflamatória do macrófago (MIP)-1 α e MIP-1 β em macrófagos humanos (Zhang *et al.*, 1997) e a redução de putrescina, espermidina e espermina correlaciona com o aumento da produção de citocinas como TNF α , IL-6 e IL-12 em macrófagos murinos (Wei *et al.* 2022) enquanto o aumento de poliaminas correlaciona com aumento de IL-10 na infecção por *L. donovani* (Mandal *et al.* 2017).

A produção de NO, importante molécula microbicida, e citrulina, via NOS2, é induzida por uma variedade de estímulos pró-inflamatórios em macrófagos murinos, como LPS ou as citocinas IL-1 β , IFN- γ , ou TNF- α (Modolell *et al.* 1995). No entanto, o acúmulo de NO em resposta a estímulos clássicos como LPS, IFN- γ e TNF α não ocorre em macrófagos humanos ou em quantidades muito baixas <0,1 μ mol de nitrito/10⁶ células/24 h (Schaffner *et al.* 1993; Weinberg *et al.* 1995; Thomas e Mattila 2014). Dentre outros motivos, macrófagos humanos são incapazes de sintetizar tetrahydrobiopterina (BH4) (Denis 1994; Albina 1995), cofator essencial, junto com NADPH, para a atividade de NOS2 (Marletta *et al.* 1988), mas a adição desse cofator não é suficiente para a produção de NO (Schaffner *et al.* 1993; Weinberg *et al.* 1995). Estudos demonstraram que a regulação de NOS2 em macrófagos humanos primários (alveolares e derivados de sangue periférico) e na linhagem THP-1 ocorre a nível transcricional, nos quais, diferente dos macrófagos murinos, há uma intensa repressão epigenética do gene de NOS2 (Gross *et al.* 2014).

Cocultura ou transferência de sobrenadante de linfócitos T diferenciados nos perfis Th1 ou Th2 induzem, respectivamente, atividade de NOS2 e ARG1 em macrófagos e,

associado a mecanismos de regulação, favorecem a expressão e atividade mutuamente exclusiva de uma das enzimas (Rath *et al.* 2014). ARG1 e NOS2 competem pelo substrato L-arginina e apresentam papéis antagônicos na imunidade. Além da competição direta pelo substrato, a hidroxilação de L-arginina leva à formação do intermediário L-hidróxi-L-arginina (abreviado como NOHA ou LOHA), que atua como um inibidor de arginase (Rath *et al.* 2014).

1.4.3. Resposta imune e metabolismo de arginina na infecção por *Leishmania*

Diversos estudos apontam que o metabolismo de arginina via ARG1 ou NOS2 são centrais na resposta à infecção por *Leishmania* pelo macrófago hospedeiro (Muxel *et al.*, 2018). De um lado, a síntese de poliaminas mediada por atividade de ARG1 favorece a sobrevivência e o crescimento do parasita (Kropf *et al.* 2005). Por outro, NO é um dos principais fatores leishmanicidas (Liew *et al.* 1990; Mauel *et al.* 1991; Iniesta *et al.* 2001). Ainda, a depleção de arginina extracelular afeta a atividade de células T CD4+, favorecendo a infecção por *L. major* (Modolell *et al.*, 2009; Munder *et al.*, 2009).

A polarização de macrófagos é mediada por citocinas. Foi demonstrado que TNF regula positivamente *Nos2* e negativamente *Arg1* na infecção por *L. major* em camundongos da linhagem C57BL/6 selvagem, mas que em camundongos nocaute de *Tnf* ocorre alta frequência de coexpressão ARG1-NOS2 e a produção de NO é reduzida (Schleicher *et al.* 2016). Por outro lado, tratamento com IL-4 aumenta a acetilação da histona 3 no promotor e *enhancer* putativo de *Arg1*, aumentando sua expressão, enquanto a adição de TNF impediu essa indução (Schleicher *et al.* 2016).

A adição concomitante de LPS e IFN- γ reduz a infectividade de *L. infantum* e *L. major* em camundongos C57BL/6 selvagem, mas não em camundongos nocautes de *Nos2* ou tratados com o inibidor N^G-metil-L-arginina (LNMA), demonstrando que as citocinas medeiam a ativação de NOS2 e controle da infecção (Iniesta *et al.* 2001). Mais recentemente foi demonstrado que a indução de IFN- γ é essencial para o recrutamento de monócitos permissivos à infecção (Carneiro *et al.* 2020), enquanto NO reduz o recrutamento de fagócitos permissivos à infecção (Formaglio *et al.* 2021).

Apesar da ausência de indução de NOS2 em macrófagos humanos, como explicitado no subcapítulo 1.4.2, existem estudos que apontam a presença de NO na

limitação da infecção humana (Sarkar *et al.* 2011), mostrando ser mais complexo do que as condições observadas *in vitro*. Biópsias de pacientes de área endêmica de *L. mexicana*, com leishmaniose cutânea localizada, apresentam maior marcação imunohistoquímica para NOS2 do que a cutânea difusa (Qadoumi e Becker 2002) e dados de colaboradores demonstraram o aumento de citrulina no plasma de pacientes com leishmaniose difusa comparado com a doença localizada (Malta-Santos *et al.* 2020).

Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 ou TGF- β aumentam a atividade de arginase via ARG1 e a proliferação de *L. major* em macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 (Iniesta *et al.* 2002). Fatores de crescimento como o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF-2) e o Fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) estão envolvidos na progressão da infecção por *L. donovani* via indução de ARG1 (Osorio *et al.* 2014). A adição do inibidor NOHA reduz a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos sem mediar a produção de NO, apenas reduzindo a atividade de arginase, cujo efeito pode ser revertido com adição de L-ornitina exógena (Iniesta *et al.* 2001). Outro grupo corroborou esses resultados, demonstrando que nor-NOHA pode inclusive levar à cura espontânea de camundongos BALB/c susceptíveis à infecção com *L. major* (Kropf *et al.* 2005). Na infecção *in vivo*, arginase parece desempenhar papel importante para a progressão da lesão e as diferenças observadas nos modelos experimentais de camundongos BALB/c e C57BL/6 (Iniesta *et al.*, 2005; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2021), mas não é essencial para o processo de resolução espontânea da infecção (Paduch *et al.* 2019).

Uma vez que a atividade de arginase e NOS2 dependem da disponibilidade de arginina, um elemento central na regulação da infecção é a atividade de seus transportadores. A linhagem de camundongo C57BL/6 possui uma deleção no promotor do gene SLC7A2, reduzindo a tomada de arginina e a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* quando comparada à linhagem BALB/c (Sans-Fons *et al.* 2013). A infecção de *L. amazonensis* em BMDM nocaute de CAT2 ou inibição do transporte utilizando os análogos de arginina LNMA e dimetil L-arginina simétrica (L-SDMA), mostrou que IFN- γ +LPS ou IL-4 são incapazes de induzir, respectivamente, a morte ou multiplicação dos parasitas na ausência do principal transportador de arginina quando comparados ao macrófago selvagem (Wanasen *et al.* 2007). Foi demonstrado que IFN- γ induz a

expressão e a atividade do transportador CAT2 na infecção de macrófagos murinos por *L. amazonensis* (Wanasen *et al.* 2007). Em macrófagos humanos THP-1, a redução da tomada de arginina via CAT2 reduz a infecção de *L. donovani*, enquanto o aumento dessa tomada e a atividade de ARG1 induzem a produção de poliaminas, aumento de IL-10 e redução de IL-12 e TNF- α (Mandal *et al.* 2017).

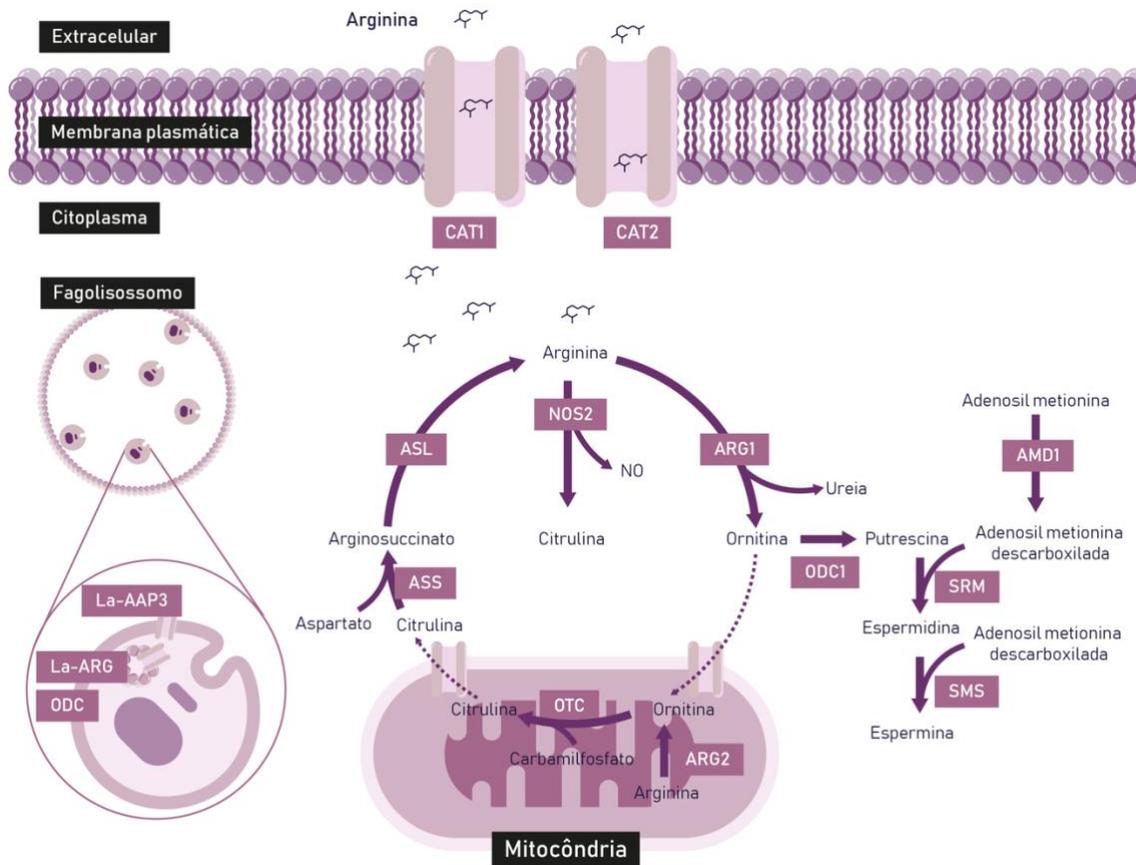


Figura 4 - Representação esquemática dos componentes do metabolismo de arginina em macrófagos infectados com *Leishmania*. Arginina é transportada principalmente por CAT1 e CAT2 em macrófagos infectados, e pode ser metabolizada primariamente por ARG1 e NOS2, produzindo respectivamente, ornitina e NO. Ornitina segue para a via de produção de poliaminas via SRM e SMS, ou é internalizada na mitocôndria e, no ciclo da ureia, é convertida em citrulina, seguido de arginossuccinato e novamente em arginina. No parasita, arginina é internalizada pelo transportador AAP3 e segue na via de produção de poliaminas via ARG ou NO via NOS-like. AAP: permease de amino ácido, CAT: transportador de aminoácidos catiônicos, ARG: arginase, ASL: argininosuccinato liase, ASS: argininosuccinato sintetase, OTC: ornitina transcarbamilase, ODC: ornitina descarboxilase, SRM: espermidina sintase, SMS: espermina sintase, AMD: adenosil metionina descarboxilase. Produzida pela autora com base em (Muxel *et al.*, 2018).

1.5. Metabolômica

1.5.1 Técnicas metabolômicas

Metabolômica é a técnica de identificação e quantificação de metabólitos de baixo peso molecular, comparando diferentes condições (Goodacre *et al.* 2004), sendo que a cobertura dos metabólitos detectados nas amostras depende grandemente da plataforma selecionada. A combinação de diferentes métodos garante dados complementares e maior cobertura do metaboloma (Lioupi *et al.* 2021).

Após a extração dos metabólitos, as amostras são analisadas por uma ou por uma combinação de técnicas de separação, entre elas a cromatografia líquida (LC), cromatografia de gases (GC) e/ou eletroforese capilar (CE). Para acoplar os metabólitos separados ao sistema de espectrometria de massas (MS), as entidades químicas são ionizadas por um eletrosprei (ESI) para LC e CE, uma técnica branda que leva a pouca fragmentação, ou impacto eletrônico (EI) para GC. A detecção dos metabólitos também pode ocorrer com métodos espectroscópicos, como ressonância magnética nuclear (NMR), porém, nessa técnica, a cobertura de metabólitos é baixa. A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) oferece alta resolução de separação de metabólitos polares baseada na eluição de um gradiente de solvente orgânico e água (Goodacre *et al.* 2004; Lioupi *et al.* 2021). CE é uma técnica de separação útil para a análise de metabólitos polares baseada no movimento dependente de voltagem de analitos em um solvente (Goodacre *et al.* 2004; Lioupi *et al.* 2021).

A detecção utilizando MS do tipo tempo de voo (do inglês, *time-of-flight* TOF) gera um espectro que procede para a etapa de integração de picos. Os dados são então exportados para uma matriz tridimensional contendo informações de massa-carga (m/z) exata, tempo de retenção ou migração (RT e MT, respectivamente) e a intensidade dos picos (equivalente à abundância dos metabólitos). Após múltiplas etapas de processamento, os dados são submetidos para as análises estatísticas uni- e multivariantes gerando uma lista de *features* significativamente alteradas. As *features* prosseguem para anotação baseada nas informações de massa experimental exata e os tempos de migração ou retenção. Outras informações como formação de adutos, multímeros, cargas múltiplas e fragmentos (gerados na fonte ou em células de colisão) são usados para a anotação dos metabólitos (Godzien *et al.* 2018). A lista final de

metabólitos identificados é então usada para analisar as vias metabólicas afetadas e as consequências biológicas dessas modificações.

Além de ser amplamente utilizada na descoberta de biomarcadores para doenças, a metabolômica pode ser uma ferramenta importante para a descoberta de mecanismos biológicos e moleculares (Johnson *et al.* 2016; Kloehn *et al.* 2016).

1.5.2 Metabolômica no estudo de leishmanioses

Leishmania ocupa diferentes nichos em seu ciclo de vida, cujos estímulos levam aos processos de diferenciação que envolvem adaptações metabólicas (Rosenzweig *et al.* 2008). No entanto, a maior parte dos estudos de mudanças metabólicas e descobertas de biomarcadores a nível genômico em macrófagos infectados com *Leishmania* foram realizados por transcriptômica (Rabhi *et al.* 2012) e proteômica (Veras *et al.* 2018).

A metabolômica foi utilizada para caracterizar o metabolismo do parasita (Akpunarlieva *et al.*, 2017; Castilho-Martins *et al.*, 2015; Crepaldi *et al.*, 2019; Saunders *et al.*, 2014; Westrop *et al.*, 2015) e se mostrou uma ferramenta útil, uma vez que os mecanismos de controle pós-transcricionais e pós-traducionais dificultam o acesso ao fenótipo do parasita utilizando apenas transcriptômica e proteômica (Scheltema *et al.* 2010; Kloehn *et al.* 2015; Atan *et al.* 2018).

A caracterização metabólica de células hospedeiras infectadas por metabolômica foi realizada explorando apenas poucas espécies de *Leishmania* e tipos de macrófagos *in vitro* (Lamour *et al.* 2012; Muxel *et al.* 2019; Mamani-Huanca *et al.* 2021b). Mais recentemente, foi realizada metabolômica em lesões cutâneas experimentais na infecção por *L. mexicana* (Volpedo *et al.*, 2022) e em hamsters modelos para leishmaniose visceral por *L. donovani* (Lesani *et al.* 2022).

Nosso grupo investigou o metaboloma de BMDMs de camundongos da linhagem BALB/c (Muxel *et al.* 2019) e C57BL/6 (Mamani-Huanca *et al.* 2021b) mostrando que o metabolismo de arginina é central nos modelos experimentais.

Análise metabolômica de BMDM de BALB/c infectado com *L. major* mostrou que apenas macrófagos previamente ativado com IL-4 apresentam atividade de arginase durante a infecção, mas ambos não ativado ou ativado com TNF e IFN- γ apresentam produção de NO após a infecção com *Leishmania* (Lamour *et al.* 2012).

A metabolômica também foi utilizada para desvendar o mecanismo na infecção por *L. mexicana* nocaute para centrina, uma linhagem atenuada e forte candidata para vacinação, demonstrando que a via das pentoses fosfato está aumentada e sua inibição leva ao aumento de NO e citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-1 β (Volpedo *et al.* 2022a).

Levando em conta os dados da literatura, nossa hipótese é que *Leishmania* é capaz de estabelecer a infecção via modulação de miRNAs do hospedeiro importantes na regulação do metabolismo de poliaminas/NO. Nossos resultados mostraram que o parasita pode mediar alterações no macrófago hospedeiro em múltiplos níveis, uma vez que, ao modular uma família específica de miRNAs do hospedeiro, é capaz de regular o transportador de arginina e diversos outros alvos putativos, resultando em uma reprogramação metabólica favorável ao estabelecimento da infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar como a alteração do perfil de miRNAs do hospedeiro modula o metabolismo de arginina e a infectividade de *L. amazonensis* em macrófagos humanos derivados de THP-1.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1. Comparar o perfil de miRNAs expressos diferencialmente em macrófagos derivados de THP-1 infectados com *L. amazonensis* selvagem e *L. amazonensis* nocaute de arginase em relação aos macrófagos não-infectados;

2.2.2. Analisar por bioinformática as possíveis interações entre os miRNAs candidatos e mRNAs de genes envolvidos com o metabolismo de poliaminas/NO;

2.2.3. Avaliar a expressão gênica de mRNAs relacionados com o metabolismo de poliaminas/NO;

2.2.4. Investigar o papel funcional de miRNAs na infecção e na modulação das vias de metabolismo de poliaminas/NO utilizando ferramentas de inibição de miRNAs;

2.2.5. Quantificar metabólitos de macrófagos THP-1 infectados com *L. amazonensis*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Organismos

3.1.1 Parasitas e cultivo

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269) selvagens (*La-WT*) e modelo nocaute de arginase (*La-arg*), obtido a partir da mesma linhagem (Laranjeira-Silva *et al.* 2012), foram mantidos em meio M199 (L-glutamina e sais de Hanks, sem bicarbonato de sódio, Invitrogen, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco), 5 ppm de hemina, 100 µM adenina, 50 U penicilina, 50 µg/mL estreptomicina e tampão Hepes-NaOH 40 mM e NaHCO₃ 12mM, pH 6,85 a 25°C. O meio para *La-arg* é acrescido de 100nM de putrescina, 50mg/mL de higromicina e 10mg/mL de puomicina. A curva de crescimento foi realizada com 5×10⁵ parasitas em 10mL de meio no inóculo inicial com contagens em câmara de Neubauer por 9 dias.

3.1.2 Monócitos e diferenciação dos macrófagos

Os macrófagos foram derivados de diferenciação da linhagem celular de monócitos humanos THP-1 (American Type Culture Collection, ATCC®, VA, USA, TIB-202™). A linhagem foi mantida em sua forma monocítica em estufa a 34°C e 5% CO₂ em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 contendo bicarbonato de sódio (2g/L) e L-glutamina (2,05mM) (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) acrescido de 10% SFB inativado (Gibco), penicilina (20 U/mL) e estreptomicina (20 µg/mL) (Pen-Strep, Gibco). Monócitos foram testados e certificados livres de micoplasma (FJ *et al.* 1992).

A diferenciação em macrófagos foi feita por incubação com 30ng/mL de forbol 12-mistrato 13-acetato (do inglês, *phorbol 12-myristate 13-acetate*, PMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por 72 horas e, após, mantidas por 72 horas em meio RPMI fresco antes da infecção (34°C/5% CO₂). O fenótipo do macrófago resultante foi avaliado por análise citométrica (BD Accuri™) para a presença dos marcadores CD14 (eBioscience, CD14 FITC As2-8) e CD11b (Invitrogen, PE-Cyanine5 M1/70), analisado no *software* FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, USA).

3.2 Infecção

Os monócitos foram plaqueados de acordo com a área da placa (4×10^6 para placas de 6 poços e 1×10^6 para placas de 24 poços). Após a diferenciação, os macrófagos foram expostos a promastigotas *La-WT* ou *La-arg* na fase estacionária do crescimento na proporção de 5 parasitas/macrófago (MOI 5:1). Após 4 horas (34°C / 5% CO_2) a cultura foi lavada com PBS 1X para remover os parasitas não fagocitados e o meio RPMI foi repostado. Os procedimentos de contagem da infecção ou extração do RNA foram feitos nos períodos de 4h, 24h, 48h e/ou 72h após a infecção. As células foram desaderidas gentilmente com raspagem após tratamento com 100 μL de PBS-EDTA 1mM, e fixadas com paraformaldeído (PFA) 1%.

A infecção foi avaliada em citômetro de fluxo com imagem FlowSight®, permitindo a análise visual dos macrófagos na amostra. Para isso, os parasitas foram marcados previamente à infecção com o Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Invitrogen). O cálculo foi feito proporcionalmente para que cada 1×10^8 parasitas fossem diluídos em 1 mL de PBS 1x e 5 μM CFDA SE. A marcação foi feita por 20 minutos a 25°C , seguida de lavagem com RPMI 10% SFB para retirar o excesso de reagente.

As células foram desaderidas com PBS/EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 1mM e fixadas com PBS/PFA 1% nos períodos de 4h, 24h, 48h e 72h após a infecção. No momento da contagem, as células foram ressuspensas em 25 μL de PBS 1X. A análise dos dados foi realizada no *software* IDEAS utilizando a ferramenta *Wizard Spot Count*, capaz de calcular a ocorrência de parasitas fagocitados e, assim, a média de amastigotas por macrófago infectado, por sobreposição dos canais 1 e 2 (Figura 5). O índice de infecção é obtido multiplicando-se os dois parâmetros.

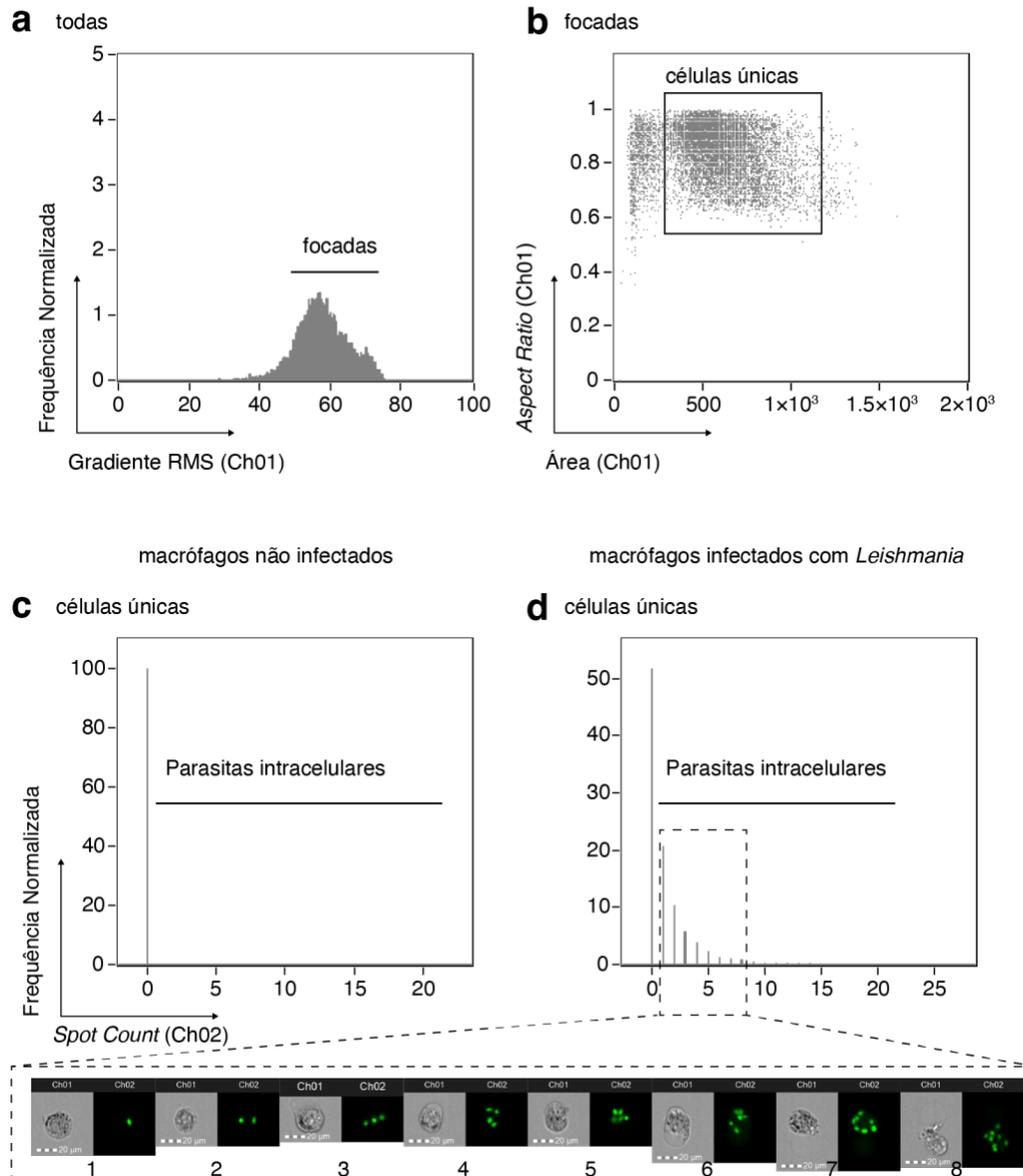


Figura 5 - Representação esquemática dos *gates* e fluxo de análise de dados da citometria de imagem. (a) seleção de eventos com células focadas, (b) seleção de células únicas a partir de células focadas, e resultado da ferramenta *spot count* para (c) macrófagos não infectados e (d) macrófagos infectados, com imagens representativas da contagem de 1 a 8 parasitas intracelulares.

3.3 Manipulação de ácidos nucleicos

3.3.1 Extração de RNA

As células foram lisadas com Qiazol e as amostras foram mantidas a -20°C até o ensaio de extração de RNA. O RNA total foi obtido com o “miRNeasy Mini Kit” (Qiagen) segundo o manual do fabricante. A análise quantitativa e qualitativa foi realizada no

espectrofotômetro NanoDrop. A pureza do RNA extraído foi avaliada pela razão das absorbâncias A260/A280, que deve ser por volta de 2. As amostras foram diluídas para 1µg/10µL e utilizadas nas reações de transcrição reversa.

3.3.2 Transcrição reversa e RT-qPCR de microRNAs

Na transcrição reversa para a síntese do cDNA de miRNAs maduros foi utilizado o “miScript II RT Kit” (Qiagen) a partir de 2µg do RNA total, segundo as recomendações do fabricante. O produto foi diluído em 150µL de água livre de RNase e armazenado a -20°C. Para o RT-qPCR foi utilizado o “Human Inflammatory Response & Autoimmunity miRNA PCR Array: MIHS-105Z” e o “miScript SYBR PCR Kit” (Qiagen). As reações foram feitas em termociclador QuantStudio 3 (Applied Biosystems) a 95°C por 15 segundos seguido de 40 ciclos programado para 94°C por 15 s, 55°C por 30s e 70°C por 30s. Para identificar miRNAs diferencialmente expressos o valor do C_t de cada amostra foi subtraído do valor de C_t dos genes normalizadores (Pequeno RNA nucleolar (SNORD) 61, SNORD68, SNORD72, SNORD95, SNORD96A e RNU6B) para a obtenção do valor de ΔC_t . O $\Delta\Delta C_t$ foi obtido pela diferença do ΔC_t do grupo do macrófago infectado (*La-WT* ou *La-arg*) pelo ΔC_t do macrófago não infectado. O valor de Log2FC (\log_2 Fold change) foi obtido pelo $\log_2(2^{-\Delta\Delta C_t})$. O *cutoff* selecionado para miRNAs expressos diferencialmente foi de Log2FC >1 ou <-1. Os miRNAs indicados como diferencialmente expressos foram validados com os miScript Primer Assay (Qiagen) e normalizados com SNORD95.

Para quantificar os precursores de miRNAs, pri-miR e pre-miR para os miR-372 e miR-373 os oligonucleotídeos iniciadores para a reação de PCR foram desenhados conforme indicado na literatura (Schmittgen *et al.* 2004) (Tabela 1).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores para avaliação da biogênese de miR-372/373.

Alvo	Fw	Rev
Pre-miR-372	GATTGGGTGAGGGGCG	GACGCTCAAATGTGCGAGC
Pre-miR-373	GGCCTCAAATGTGGAGCACTA	GACGCTCAAATGTGCGAGC
Pri-miR-372/373	TACTCAAATGGGGGCGCTT	ACACCCCAAATCGAAGCACT

3.3.3 Desenho dos primers e preparação de DNA molde para curva padrão

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (Tabelas 1 e 2) foram desenhadas utilizando a ferramenta Primer-BLAST do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) a partir da sequência de referência (RefSeq) dos genes de interesse, de modo

que os primers flanqueiem uma sequência intrônica garantindo a não amplificação do DNA genômico, confirmado pelo tamanho do *amplicon* e sequenciamento. O produto de PCR foi clonado no vetor pGEM T Easy (Promega, Madison, WI, USA) e o inserto foi confirmado por seu tamanho após digestão com a enzima de restrição EcoRI e sua sequência pelo método de Sanger (sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências). Por fim, o plasmídeo foi linearizado com digestão com Scal para servir como DNA molde para a construção da curva padrão de amplificação, com número de cópias conhecido, a partir de diluição seriada para uma concentração de 10^1 a 10^8 moléculas a cada 5 μL .

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores para genes de interesse.

Alvo	Fw	Rev
NOS2	AAGCCTACCCCTCCAGATGA	CTTTGTTACCGCTTCCACCC
ARG1	AAGGATTATGGGGACCTGCC	CGCTTGCTTTTCCCACAGAC
CAT1	CTCATTTAAGGTTCCCTTCCTGC	CAGCATCCACACAGCAAACC
CAT2	CCTTATGGCTTTACGGGAACG	TTCTGGGGATTCCGAACCTTCT
ODC1	GACCACGCACATGTAAAGCC	CAATCCGATCGAGGCCATCA
AMD1	GAGTGAGCTTGACCCAGCAG	TCACGAATTCCACTCTCACGA
SRM	ACAGCCCTCAAGGAAGATGGT	GGAACAGGGACTGGCAGAACT
SMS	CGAAAAACGTGTGGCGATGT	TCCCTTCTTTGGCGTACCTC
GAPDH	GGCAAATTC AACGGCACACT	CCTTTTGGCTCCACCCTTCA

3.3.4 Transcrição reversa e RT-qPCR de mRNAs

A transcrição reversa foi realizada a partir de 2 μg do RNA total, 3 μg de Random Hexamer Primer e 2 μL de dNTPs (10 μM) com água livre de RNase q.s.p 24 μL , que foram incubados por 5 minutos a 70°C no termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf). Com os tubos no termociclador a 8°C foram adicionados à reação 8 μL de tampão de reação 5x (250mM TrisHCl (pH 8,3); 250mM KCl; 20mM MgCl₂ e 50mM DTT), 2 μL da enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Waltham, MA), ou água livre de RNase nas reações controle, e 2 μL de RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific). Seguiu-se incubações subsequentes de 5 min a 37°C, 10 min a 25°C, 60 min a 42°C e 10 min a 70°C.

Para o RT-qPCR, a preparação da reação foi feita a partir de 5 μL do cDNA/mRNA diluído 10 \times , 2 \times Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific), 0,2 μM de cada primer e água livre de RNase para um volume final de 20 μL . A reação foi realizada no termociclador PikoReal 96 RealTime PCR System (Thermo Scientific) iniciando a 2

min a 50°C, 10 min a 94°C, e em seguida 40 ciclos de 30s a 94°C e 30s a 61°C. Após o ajuste dos *thresholds*, os valores de C_t foram normalizados a partir do controle endógeno GAPDH. O $\Delta\Delta C_t$ foi obtido pela diferença do ΔC_t do grupo do macrófago infectado (*La-WT* ou *La-arg*) pelo ΔC_t do macrófago não infectado ou, nos ensaios de inibição, a diferença do ΔC_t do grupo do macrófago infectado por *La-WT* não tratados e o ΔC_t dos macrófagos infectados e transfectados com controle negativo ou inibidores de miRNAs. O valor de Log2FC (\log_2 *Fold change*) foi obtido pelo $\log_2(2^{-\Delta\Delta C_t})$.

3.4 Análise do papel dos microRNAs

3.4.1 Análise *in silico* dos alvos potenciais de microRNAs e enriquecimento de vias

Os alvos putativos foram determinados segundo os algoritmos do TargetScan (Agarwal *et al.* 2015) e microRNA.org (Betel *et al.* 2010). O compartilhamento das sequências *seed* foi confirmado a partir das sequências de miRNAs contidas no banco de dados miRBase (Kozomara *et al.* 2019). O TargetScan Human 7.2 foi utilizado para acessar genes mutuamente regulados pelos membros da família miR-372/373/520, cuja lista foi usada para a análise de enriquecimento na ferramenta Reactome, para analisar alvos putativos relativos a vias metabólicas.

3.4.2 Transfecção dos inibidores ou mímicos de miRNAs

Após a diferenciação de 1×10^6 macrófagos/poço em placas de 24 poços ou 4×10^6 macrófagos/poço em placa de 6 poços, foram adicionados 50 nM dos inibidores ou mímicos de miRNAs, miRVana (Thermo Scientific), hsa-miR-372-3p, hsa-miR-373-3p e/ou hsa-miR-520d-3p incubados previamente por 15 minutos a temperatura ambiente com o HiPerfect Transfection Reagent (Qiagen) - 6 μ L para 24 poços e 15 μ L para 6 poços - em 250 μ L de meio RPMI 1640 (LGC). O ensaio de infecção foi feito após 24h.

3.4.3 Quantificação de proteína após transfecção de mímicos de miRNAs

A determinação do nível da proteína CAT2 foi feita por citometria de fluxo utilizando o equipamento BD Accuri™ C6 e *software* FlowJo. Placas de 24 poços com 1×10^6 macrófagos/poço foram infectados com *La-WT* ou tratados com mímicos de miRNAs por 24 horas, conforme supracitado. Após, as células foram desaderidas com 100 μ L de PBS/EDTA 1mM e transferidas para placas de 96 poços, centrifugadas e fixadas com 1% PFA. A permeabilização foi feita com 100 μ L do BD Cytotfix/Cytoperm por 20 minutos e

lavagem com o BD Perm/Wash, seguido da marcação com o anticorpo primário anti-CAT2 (Santa Cruz CA, USA, sc-87038) na concentração 1:100 *overnight* a 4°C e o anticorpo secundário *Donkey anti-Goat IgG* (Invitrogen PA1-29953) na concentração 1:200 por 2 horas a temperatura ambiente. Após a marcação, as células foram lavadas com o BD Perm/Wash, ressuspensas em 100 µL de PBS e analisadas no citômetro.

3.4.4 Validação com pmiRGLO

Os vetores pmiRGLO *Dual-Luciferase miRNA Target Expression Vector* (Promega) foram construídos clonando a sequência 3'UTR de SLC7A2 (CAT2) contendo a sequência de pareamento de miRNAs de interesse ou sequências mutadas (Tabela 3) após o gene da luciferase Firefly, seguindo as recomendações do fabricante. Macrófagos (1×10^6) da linhagem RAW 264.7 (TIB-71, ATCC) foram transfectados com 5 µg do vetor pmiRGLO utilizando o reagente de transfecção FuGene HD (Promega) e tratados com 50nM de mímicos de miRNAs. Após 24 horas da transfecção, os macrófagos foram desaderidos com PBS 1mM EDTA, lavados com PBS 1X, diluídos em meio RPMI e transferidos para microplacas pretas de fundo transparente de 96 poços. A reação de luciferase foi feita utilizando o Dual-Glo® Luciferase Assay (Promega), segundo recomendações do fabricante, e lidos no luminômetro GloMax® (Promega).

Tabela 3 - Sequências de DNA de fita simples para anelamento e clonagem no vetor pmiRGLO.

3' UTR	Seed	Orientação
Sequência		
CAT2.2	3947-3953	Senso
CTAGCGGCCGCCCCATAAATTGTGTAGCACTTTT		
CAT2.2	3947-3953	Antisenso
CTAGAAAAGTGCTACACAATTTATGGGGGCGGCCGCTAGAGCT		
CAT2.2 mutada	3947-3953*	Senso
CTAGCGGCCGCCCCATAAATTGTGTAGACTTTT		
CAT2.2 mutada	3947-3953*	Antisenso
CTAGAAAAGTCTACACAATTTATGGGGGCGGCCGCTAGAGCT		
CAT2.1	1327-1333	Senso
CTAGCGGCCGCCATGATGACAGAGGGAGCACTTGT		
CAT2.1	1327-1333	Antisenso
CTAGACAAGTGCTCCCTCTGTCATCATGGCGGCCGCTAGAGCT		
CAT2.1 mutada	1327-1333*	Senso
CTAGCGGCCGCCATGATGACAGAGGGAGACTTGT		
CAT2.1 mutada	1327-1333*	Antisenso
CTAGACAAGTCTCCCTCTGTCATCATGGCGGCCGCTAGAGCT		

3.5 Dosagem de óxido nítrico (NO) e nitrito

A presença NO foi avaliada com a marcação das células com DAF-FM (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína, Thermo Scientific) analisada por citometria de fluxo (Sarkar *et al.* 2011; Muxel *et al.* 2017; Fernandes *et al.* 2019b). A quantificação foi feita nos períodos de 4h e 24h em macrófagos infectados, estimulados com 200ng/mL LPS ou controle não infectado e não tratado. As análises de células positivas e intensidade de fluorescência (NO+ e NO MFI) foram feitas no software IDEAS com base nos controles não marcados e *background* de anticorpo secundário.

Para o ensaio de Griess, 50 μ L do sobrenadante foram mesclados com 50 μ L do reagente de Griess, composto por 25 μ L da solução 0,1% de N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich) e 25 μ L de 1% sulfanilamide em 2,5% H_3PO_4 . Depois de 10 minutos, a absorbância foi medida a 570nm. A quantidade de $NaNO_2$ foi calculada em comparação com a curva padrão de 3 a 100 μ M.

3.6 Metaboloma

3.6.1 Preparação de amostras

O *quenching* metabólico foi feito com o esfriamento das placas em gelo com adição de PBS gelado. O material foi centrifugado e todo o sobrenadante foi retirado, e o *pellet* foi congelado a $-80^\circ C$. Para a extração dos metabólitos, os *pellets* foram agitados em vórtex com 350 μ L de metanol/água (4:1) gelado, seguido por 4 ciclos de congelamento/descongelamento (1 minuto cada) em nitrogênio líquido/gelo e processamento no TissueLyzer LT (Qiagen, Germany) com 25 mg de *beads* de vidro (710–1180 μ m, G1152, SigmaAldrich, Germany) por 10 minutos a 50 Hz com 1 minuto de intervalo com amostras mantidas no gelo. As amostras foram centrifugadas (10min, 15,700 \times g, $4^\circ C$) e 300 μ L do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo tipo Eppendorf. Foi feita uma alíquota de 80 μ L de cada amostra para uso no instrumento HILIC-LC-MS. O restante do sobrenadante foi secado no SpeedVac SPD121P (Thermo Scientific) a $35^\circ C$ por 2,5 horas. O resíduo sólido foi ressuspendido em 110 μ L de uma solução contendo 0,1M de ácido fórmico contendo padrões internos (0,2 $mmol \cdot L^{-1}$ de metionina sulfona, 0,2 $mmol \cdot L^{-1}$ MES e 1 $mmol \cdot L^{-1}$ paracetamol) e misturado por 15 minutos em um vórtex. Após a centrifugação (10 min, 15700 \times g, $4^\circ C$), foram preparadas

amostras de controle de qualidade (QC) mesclando 5 μL de cada amostra. Por fim, as amostras de QC e 90 μL de cada amostra foram transferidos nos frascos de polipropileno para CE (Agilent Technology, Waldbronn, Germany). As amostras foram estocadas a 4°C antes e depois de cada corrida analítica. As amostras foram ordenadas de forma aleatorizada nos instrumentos.

3.6.2 Plataforma CE-ESI-TOF/MS

O sistema CE-ESI-TOF/MS utilizado é composto por um sistema de eletroforese capilar (7100 Agilent Technologies) acoplado ao espectrômetro de massas TOF (6224 Agilent Technologies) equipado com uma fonte de ionização em eletrosprei e uma bomba para o suprimento do *Sheath liquid* do tipo 1200 Series Pump (Agilent Technologies). O sistema foi controlado por meio do *software* MassHunter Workstation versão B.06.01.

O *Sheath liquid* (6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) foi preparado com metanol/água (1:1, v:v) adicionado os compostos de referência purina (5×10^{-3} mol $\times\text{L}^{-1}$, m/z 121.0509) e HP-0921 (hexakis($^1\text{H},^1\text{H},^3\text{H}$ -tetrafluoropropoxy)phosphazene, 2.5×10^{-3} mol $\cdot\text{L}^{-1}$, m/z 922.0098) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A separação foi realizada em capilar de sílice fundida com 100 cm de comprimento total e 50 μm de diâmetro interno (Agilent Technologies). No modo positivo (CE-ESI(+)-TOF/MS), utilizamos os seguintes parâmetros de MS: fragmentador a 125 V, Skimmer a 65 V, octopolo a 750 V, pressão do nebulizador de 10 psi, temperatura do gás de secagem a 200 °C, fluxo de 10 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ e voltagem do capilar a 3500 V. Os dados foram adquiridos no modo positivo Dual-ESI com um escaneamento completo de m/z 74 a 1000, numa taxa de 1,02 escaneamentos por segundo. A corrida foi realizada em polaridade normal com eletrólito de fundo (do inglês, BGE) composto de 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ ácido fórmico em água ultrapura com 10% (v/v) metanol. O capilar novo foi pré-condicionado com injeção (950 mbars) de NaOH 1 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ por 30min, seguido de água MilliQ por 30 min e eletrólito de fundo por 30 min. As amostras foram injetadas de forma hidrodinâmica a 50mbar por 50s com *stacking* aplicando eletrólito de fundo a 100 mbar por 10 segundos. A voltagem de separação foi de 30 kV com 25 mbar de pressão interna. O tempo da corrida foi de 40 minutos.

No modo negativo (CE-ESI(-)-TOF/MS) o *sheath liquid* foi composto de metanol/água (1/1, v/v) contendo massas de referência purina, trifluoroacetato de amônia

em acetonitrila:água TFANH4 (m/z 112.9856, Agilent) e HP-0921. Utilizamos os seguintes parâmetros de MS: fragmentador a 120 V, Skimmer a 65 V, octopolo a 750 V, pressão do nebulizador de 10 psi, temperatura do gás de secagem a 250 °C, fluxo de 1 mL·min⁻¹ e voltagem do capilar a 4000 V. Os dados foram adquiridos no modo negativo Dual-ESI com um escaneamento completo de m/z 74 a 1000, numa taxa de 1,02 escaneamentos por segundo. Antes de cada análise, os capilares foram condicionados com eletrólito de fundo por 5 minutos.

3.6.3 Plataforma HILIC-MS

As amostras foram medidas utilizando um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) (1290 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), acoplado com um QTOF (6545 Agilent Technologies) com ionização em eletrosprei Agilent Jet Stream source (ESI (AJS)-QqQ-MS), 6470 Agilent Technologies, operada nos modos positivo e negativo. A separação dos metabólitos foi realizada por cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) em uma coluna XBridge Ethylene bridged hybrid (BEH) Amide (2.1 mm x 100 mm, 2.5 µm; Waters, Milford, MA, USA) com uma coluna de guarda BEH amide (2.1 × 5 mm, 1.7 µm; Waters) a 50°C.

No modo positivo (LC-HILIC(+)-QTOF), as fases móveis foram compostas de 10 mmol·L⁻¹ de formato de amônio, 2,5 µmol·L⁻¹ do reagente *Infinitylab deactivator additive* (Agilent) e 0,1% de ácido fórmico diluído em (A) água ou (B) água e acetonitrila (H₂O/ACN, 10:90, v/v). No modo negativo, as fases móveis (pH=9) foram compostas de 10 mM de acetato de amônio contendo 2,5 µmol·L⁻¹ do reagente *Infinitylab deactivator additive* (Agilent) diluído em (A) água ou (B) água e acetonitrila (H₂O/ACN, 15:85, v/v). O gradiente consistiu em uma mistura das fases móveis A e B usando um gradiente não linear com início de 98% de fase móvel B nos minutos 0-3, 70% B no minuto 11 e 60% no minuto 12, 5% B nos minutos 16-18 e novamente 98% B nos minutos 19-20. As amostras foram mantidas a 4°C e 3 µL foram injetados a 0.25 µL·min⁻¹. Os top 10 íons foram selecionados para MS/MS.

3.6.4 Processamento de dados e análise

Os eletroferogramas de massas foram alinhados usando o tempo de migração de padrões internos como parâmetros no software Mass Hunter Profinder (10.0, Agilent

Technologies, Santa Clara, CA, USA). A deconvolução e integração dos picos foi realizada no software Profinder 10.0. A matriz final contendo dados de área dos picos para cada sinal foi processada para incluir valores faltantes utilizando algoritmos do CEMBio no MATLAB (MathWorks, R2015) e amostra foi normalizada utilizando o método QC *support vector regression correction* (QC-SVRC) (Kuligowski *et al.* 2015) para dados CE-ESI(+)-TOF/MS e pela soma total dos sinais (TUS) para dados CE-ESI(-)-TOF/MS para corrigir variações instrumentais detectadas na variabilidade de amostras QC. Foi aplicado um filtro baseado na porcentagem de variação de QCs para cada sinal, com o limite de RSD de 30% para prosseguimento na análise. A identificação dos picos foi baseada na massa exata de metabólitos e no tempo de migração relativo (do inglês, RMT) (Mamani-Huanca *et al.* 2021a; López-López *et al.* 2022) acessados no banco de dados CEU Mass (Gil de la Fuente *et al.* 2018), usando um erro máximo de 20 ppm. Além disso, identificação de fragmentos e adutos e o uso cromatogramas de amostras com fragmentação em fonte foram usados para corroborar a identificação, mas essas amostras ou sinais foram eliminados da análise estatística. A confiança da anotação foi majoritariamente de nível 2, indicando que a anotação se baseou em massa exata e informações adicionais (tempo, formação de adutos, padrão de fragmentação em fonte) e nível 1 para os metabólitos dos quais foram analisados padrões analíticos correspondentes.

3.7 Análise estatística

3.7.1 Análises univariadas

Dados de Log₂FC de qPCR foram analisados com o teste de t Student bicaudal de uma amostra comparado a uma média teórica de 0 utilizando o software GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Dados aparecem como a média ± erro padrão da média (SEM) e os valores de p foram apresentados, sendo p<0,05 considerado significativo.

Dados de metaboloma foram analisados usando algoritmos do CEMBio no MATLAB (R120151, Mathworks). A normalidade e homoscedasticidade dos dados de área correspondente a cada sinal foi avaliada com os testes de Kolmogorov e Levene, respectivamente, com alfa 0,05. Sinais obedecendo a normalidade foram testados com o teste de t Student com variâncias iguais ou diferentes, enquanto dados não normais foram

testados por Mann-Whitney. O valor de p corrigido por FDR (teste de Benjamin-Hochberg) foi calculado e considerado significativo quando $< 0,05$.

Para as demais análises foi realizado teste t Student não pareado bicaudal de duas amostras ou ANOVA, quando correspondente à múltiplas comparações.

3.7.2 Análises multivariadas

A análise multivariada (do inglês, MVDA) foi realizada utilizando o software SIMCA 16.0.1 (Umetrics, Umea, Sweden). A análise de componentes principais (PCA) após escalonamento univariado (UV) para CE-MS+ ou transformação log seguido de escalonamento Pareto para CE-MS- foi usada para validar a qualidade da performance analítica, enquanto a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (do inglês, PLS-DA) e a ortogonal (OPLS-DA) foram realizadas para discriminar a variação entre os grupos, calculando a qualidade do modelo por variância explicada R^2 e variância predita Q^2 . As variáveis VIP (do inglês, *variable importance in projection*) e P(corr) (*partial correlation coefficient*) dos gráficos S ou Volcano foram obtidos a partir do modelo OPLS-DA, nos quais $|P(\text{corr})| < 0.5$ e $VIP > 1$ indicam importância da variável na discriminação entre os grupos testados.

3.8 Ética

Protocolo de pesquisa nº0023/18 aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (ANEXO A).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos modelos celulares utilizados

A linhagem monocítica THP-1 foi diferenciada em macrófagos e os marcadores fenotípicos de diferenciação foram acessados para a caracterização da linhagem utilizada. Os resultados mostram que, em média, 17,3% dos monócitos expressam CD14 (Figura 6a), mas não há expressão de CD11b em THP-1 antes da diferenciação (Figura 6b). A diferenciação com PMA leva ao aumento da porcentagem de células que expressam CD11b (48,6%) enquanto em média 16,1% das células são positivas para CD14 e não há diferença significativa entre monócitos e macrófagos (Figura 6).

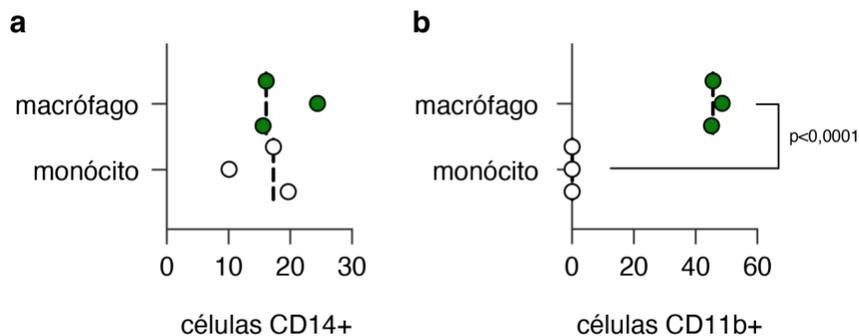


Figura 6 - Frequência de células CD14+ e CD11b+ analisadas como marcadores fenotípicos de diferenciação de macrófagos THP-1 por citometria de fluxo. Monócitos THP-1 e macrófagos derivados de THP-1 após diferenciação por 72 horas com 30ng/mL de PMA seguido de 72 horas com meio RPMI sem PMA foram analisados por citometria de fluxo para avaliar a marcação com anti-CD14 (a) e anti-CD11b (b). Os resultados foram analisados utilizando o teste t de Student bicaudal não pareado e foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (N=3).

Os parasitas utilizados, *L. amazonensis* M2269 selvagem (*La-WT*) ou nocaute de arginase (*La-arg*) também foram caracterizados. A curva de crescimento mostrou que ambas as cepas atingem a fase estacionária por volta do dia 7 e que a cepa nocaute tem maior número de parasitas por mL do que a cepa selvagem nos dias 5, 7 e 9 (Figura 7).

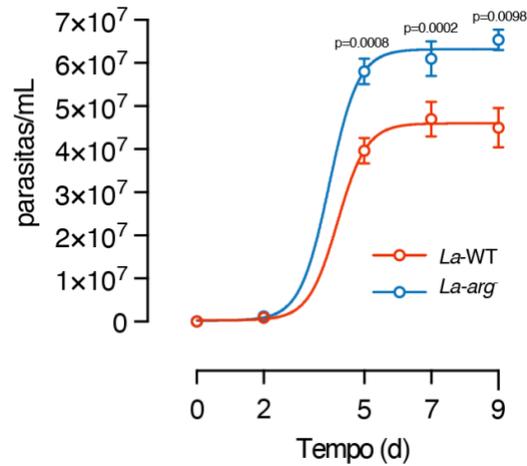


Figura 7 - Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* selvagem (*La-WT*) e nocaute de arginase (*La-arg*). Parasitas foram contados em câmara de Neubauer após 2, 5, 7 e 9 dias. Valores de p foram calculados com os testes de ANOVA de duas vias e *post-hoc* de Šidák comparando o número médio de parasitas/mL nas garrafas de *La-WT* x *La-arg* no mesmo dia de crescimento. N=3.

Quantificamos o transcrito de arginase do parasita (*La-ARG*) e observamos que *La-arg* de fato não expressa o transcrito. Por outro lado, o transcrito de *La-ARG* é mais expresso em amastigotas *La-WT* após 24 horas de infecção em macrófagos THP-1 comparado com a expressão após 4 horas de infecção (Figura 8).

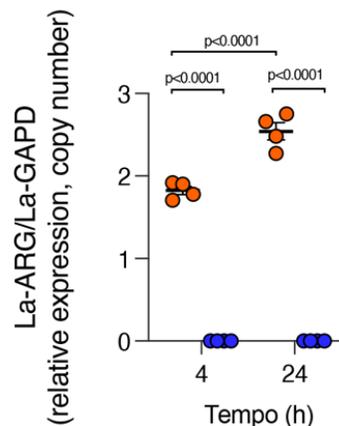


Figura 8 - Quantificação absoluta de *La-ARG* em *L. amazonensis* (*La-WT* e *La-arg*). RT-qPCR a partir de cDNA de RNA total extraído após 4 e 24 horas da infecção de macrófagos THP-1 por *La-WT* ou *La-arg* (N=4 poços). A quantificação absoluta do transcrito foi feita com base na curva padrão de concentrações. A análise foi feita utilizando-se ANOVA de uma via com *post-hoc* de Šidák para 4 comparações de interesse ("*La-WT* 4h vs. *La-arg* 4h", "*La-WT* 4h vs. *La-WT* 24h", "*La-WT* 24h vs. *La-arg* 24h", "*La-arg* 4h vs. *La-arg* 24h"). Valores absolutos de p, quando menores do que alfa (0,05) estão representados na figura. *La-ARG*: arginase, *La-GAPD*: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

Para caracterizar a infecção das cepas utilizadas, formas promastigotas em fase estacionária do crescimento (dia 7) foram cocultivadas por 4 horas com macrófagos THP-1 com MOI 5:1. A proporção de macrófagos infectados e média de amastigotas por macrófago foi acessada por citometria de fluxo por 4, 24, 48 e 72 horas. A análise mostrou que *La-WT* e *La-arg* não apresentam diferenças nas primeiras 4h de infecção (Figura 9), relativo ao momento de fagocitose do parasita. No entanto, *La-arg* apresentou menor proporção de macrófagos infectados após 48 e 72 horas (Figura 9a) e menor número de amastigotas por macrófago (Figura 9b) e índice de infecção (Figura 9c) após 24, 48 e 72 horas. A cepa *La-arg* não teve diferenças significativas na proporção de macrófagos infectados nos períodos estudados (Figura 9a), indicando que não houve invasão de novos macrófagos não infectados inicialmente.

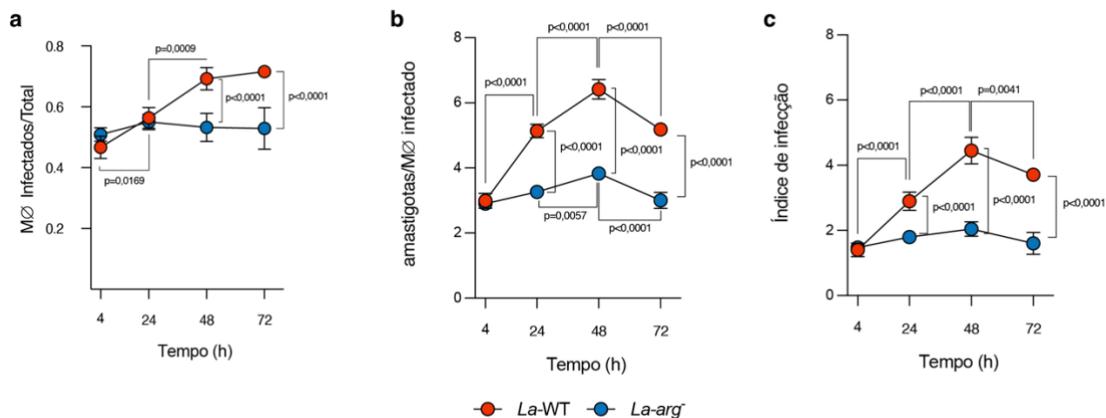


Figura 9 - Infecção de macrófagos derivados de THP-1 por *La-WT* e *La-arg*. A infecção foi quantificada no citômetro FlowSight usando os parâmetros de internalização e *spot count* nos períodos de 4, 24, 48 e 72 horas. Os gráficos mostram (a) a proporção de macrófagos (MØ) infectados (MØ infectados/totais), (b) média do número de amastigotas por macrófago infectado e (c) o índice de infecção, que foi obtido multiplicando-se os dois parâmetros anteriores. O valor de p foi obtido pelos testes de ANOVA de duas vias e *post-hoc* de Šidák comparando *La-WT* e *La-arg* no mesmo tempo de infecção e comparando a mesma cepa em relação ao tempo anterior de infecção (24hx4h, 48hx24h, 72h x 48h). N=4.

4.2 Análise do perfil de miRNAs modulados na infecção por *Leishmania*

Para investigar quais miRNAs podem ser importantes para a modulação da resposta do macrófago mediante a infecção por *Leishmania*, foi utilizado um qPCR *array* com oligonucleotídeos específicos para 84 miRNAs relacionados com resposta imune. As figuras 10 e 11, referentes, respectivamente, à infecção com *La-WT* e *La-arg*, mostram a distribuição de $\log(2^{-\Delta C_t})$ de miRNAs destacando os resíduos com expressão diferencial

na comparação com os valores dos macrófagos não infectados (Figuras 10 e 11). As figuras ainda destacam os miR-520d, miR-302a/c, miR-372 e miR-373, pois estes pertencem à uma mesma família de miRNAs.

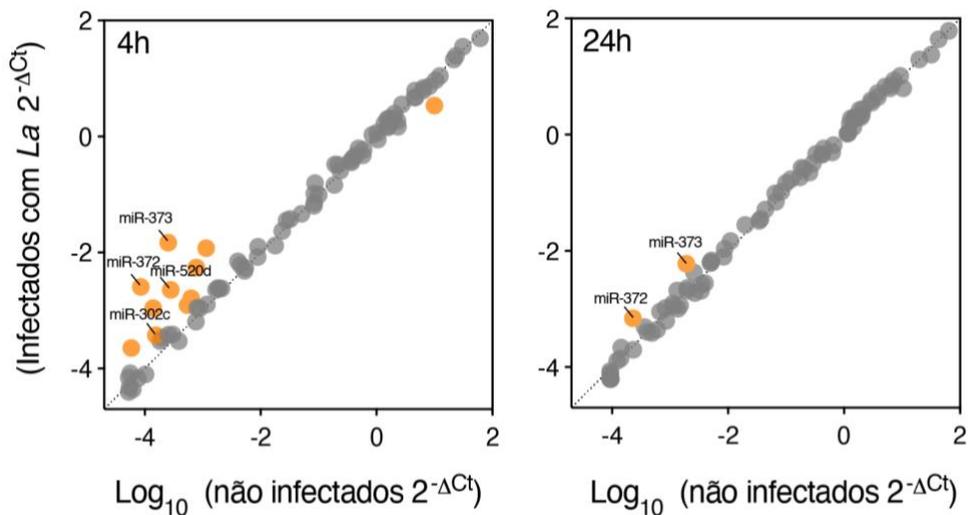


Figura 10 - Expressão de miRNAs de macrófagos THP-1 infectados por *L. amazonensis* selvagem. Cada ponto representa o valor de $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = \text{média Ct miRNA} - \text{média geométrica dos Cts de controles endógenos}$) dos miRNAs nos macrófagos não infectados ou infectados com *La-WT* nos períodos de 4h e 24h após a diferenciação. miRNAs apontados pertencem à família miR-302/372/373/520d. Pontos marcados em laranja representam miRNAs modulados positivamente ou negativamente.

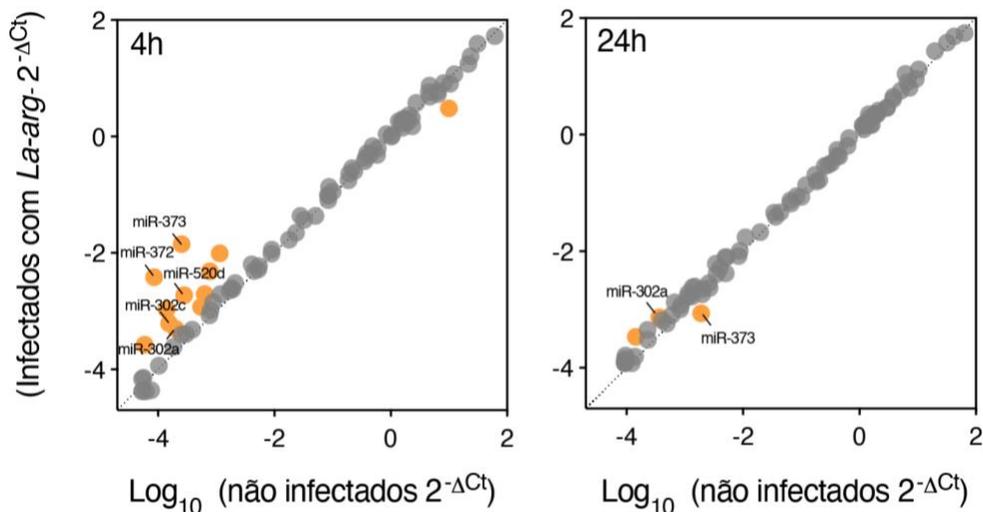


Figura 11 - Expressão de miRNAs de macrófagos THP-1 infectados por *L. amazonensis* nocaute de arginase (*La-arg*). Cada ponto representa o valor de $2^{-\Delta Ct}$ ($\Delta Ct = \text{média Ct miRNA} - \text{média geométrica dos Cts de controles endógenos}$) dos miRNAs nos macrófagos não infectados ou infectados com *La-arg* nos períodos de 4h e 24h após a diferenciação. miRNAs apontados pertencem à família miR-302/372/373/520d. Pontos marcados em laranja representam miRNAs modulados positivamente ou negativamente.

Após os testes estatísticos e correções para múltiplas comparações, identificamos 8 miRNAs regulados positivamente na infecção por *La*-WT (miR-202, miR-300, miR-372, miR-373, miR-381, miR-520d, miR-543 e miR-545), sendo os mesmos miRNAs, com exceção de miR-300, modulados na infecção por *La*-arg após 4 horas de infecção. No entanto, após 24 horas de infecção, nenhum miRNA aparece significativamente modulado na infecção por *La*-WT ou *La*-arg (Tabela 4).

Tabela 4 - Quantificação de 84 microRNAs após 4 e 24h de infecção de macrófagos THP-1 por *La*-WT ou *La*-arg. São representados os valores de Log2 *Fold Change* (Log2FC), dos quais valores maiores que 1 ou menores que -1 estão destacados e foram submetidos às análises estatísticas. Valores de p foram determinados por teste t bicaudal de duas amostras comparando macrófagos não infectados e infectados (P) e corrigidos (Padj) pelo método linear de dois estágios de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Valores de p ajustado < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

	4h		24h	
	<i>La</i> -WT Log2FC (P; Padj)	<i>La</i> -arg Log2FC (P; Padj)	<i>La</i> -WT Log2FC (P; Padj)	<i>La</i> -arg Log2FC (P; Padj)
hsa-let-7a-5p	-0,4141	-0,3537	-0,5888	0,35355
hsa-let-7b-5p	0,07025	0,35423	0,46069	0,0857
hsa-let-7c-5p	-0,0666	0,11796	-0,1201	0,62854
hsa-let-7d-5p	0,29184	0,41857	0,29772	0,33685
hsa-let-7e-5p	0,42191	0,67843	0,03844	0,85591
hsa-let-7f-5p	-0,0249	-0,2831	0,00101	0,47695
hsa-let-7g-5p	0,01207	0,05575	0,19535	0,21574
hsa-let-7i-5p	-0,6652	-0,654	0,40795	0,36267
hsa-miR-101-3p	0,00346	-0,091	0,49313	0,09464
hsa-miR-106b-5p	-1,5513 (0,102259; 0,357094)	-1,7023 (0,35499; 0,31062)	0,40577	-0,0367
hsa-miR-125a-5p	0,18625	-0,0469	-0,1494	0,24074
hsa-miR-125b-5p	0,3575	0,63589	-0,0395	0,11676
hsa-miR-128-3p	0,12948	0,40643	0,14418	0,39506
hsa-miR-130a-3p	0,19131	0,52797	-0,4229	0,21586
hsa-miR-130b-3p	-0,3432	-0,0766	0,0827	0,2181
hsa-miR-1324	0,68715	0,39287	0,59579	1,23063 (0,15524; 0,30508)
hsa-miR-144-3p	-0,3553	0,17607	-0,1076	0,42718
hsa-miR-145-5p	-0,2231	-0,0595	0,05492	-0,0265
hsa-miR-15a-5p	0,08366	0,0686	0,14574	0,06461
hsa-miR-15b-5p	-0,0274	-0,071	0,11143	0,24403
hsa-miR-16-5p	-0,1504	0,02772	0,25036	-0,1821
hsa-miR-17-5p	0,38626	0,46216	0,26123	-0,0297

	4h		24h	
	<i>La</i> -WT Log2FC (P; Padj)	<i>La-arg</i> Log2FC (P; Padj)	<i>La</i> -WT Log2FC (P; Padj)	<i>La-arg</i> Log2FC (P; Padj)
hsa-miR-181a-5p	0,29842	0,2005	0,33697	0,08963
hsa-miR-181b-5p	0,13435	0,10501	-0,1912	0,19333
hsa-miR-181c-5p	-0,391	0,24391	0,57114	0,17556
hsa-miR-181d-5p	0,23756	0,20727	-0,0577	0,43018
hsa-miR-186-5p	-0,0583	0,19686	0,51096	-0,0158
hsa-miR-195-5p	-0,1644	-0,3675	0,1564	-0,0469
hsa-miR-19a-3p	0,7946	0,25653	0,54122	-0,2272
hsa-miR-19b-3p	0,58756	0,38968	0,3364	-0,2784
hsa-miR-202-3p	3,36772 (0,001002; 0,001590)	3,10585 (0,00451; 0,02368)	0,70699	0,11876
hsa-miR-20a-5p	0,07341	-0,2726	0,39298	0,15225
hsa-miR-20b-5p	0,2806	0,17044	0,41251	0,29113
hsa-miR-21-5p	0,18396	0,33262	0,04768	0,19396
hsa-miR-211-5p	1,17498 (0,057784; 0,183440)	1,10487 (0,08920; 0,10407)	0,65682	0,32815
hsa-miR-23a-3p	0,06392	0,01421	-0,4199	0,24683
hsa-miR-23b-3p	-0,2428	0,0049	-0,123	0,3421
hsa-miR-29a-3p	0,30498	0,28345	0,35907	-0,0618
hsa-miR-29b-3p	-0,1407	-0,2262	0,22959	0,08079
hsa-miR-29c-3p	0,36255	0,24111	0,22589	-0,1357
hsa-miR-300	1,35586 (0,000140; 0,000147)	1,61955 (0,05362; 0,07038)	-0,3644	0,74252
hsa-miR-301a-3p	0,42557	0,4453	-0,4925	-0,1885
hsa-miR-301b-3p	0,42632	0,43029	0,06323	0,16517
hsa-miR-302a-3p	0,75719	1,29825 (0,13875; 0,13244)	0,43093	1,01257 (0,19370; 0,30508)
hsa-miR-302b-3p	0,39375	0,35907	-0,6565	0,74132
hsa-miR-302c-3p	1,27435 (0,020283; 0,057950)	1,99233 (0,11993; 0,12593)	-0,4383	0,41251
hsa-miR-30a-5p	-0,3281	-0,1551	0,11023	0,149
hsa-miR-30b-5p	-0,1769	-0,09	-0,7406	0,32562
hsa-miR-30c-5p	-0,3103	-0,2102	-0,0569	-0,2139
hsa-miR-30d-5p	-0,122	-0,1507	0,52677	0,17441
hsa-miR-30e-5p	0,05728	0,03731	0,52717	0,27202
hsa-miR-340-5p	0,85758	0,65434	0,54468	-0,2346
hsa-miR-34a-5p	-0,0345	0,16659	0,4917	0,16298
hsa-miR-34c-5p	-0,0032	0,1149	0,38869	0,60065
hsa-miR-372-3p	4,89975	5,49616	1,58275	0,95271

	4h		24h	
	<i>La</i> -WT Log2FC (P; Padj)	<i>La-arg</i> Log2FC (P; Padj)	<i>La</i> -WT Log2FC (P; Padj)	<i>La-arg</i> Log2FC (P; Padj)
	(0,00000; 0,00000)	(0,00079; 0,00830)	(0,04524; 0,09500)	
hsa-miR-373-3p	5,8643 (0,010257; 0,025550)	5,81492 (0,02210; 0,04305)	1,65787 (0,16681; 0,17515)	-1,144 (0,99989; 1,00000)
hsa-miR-374a-5p	0,10769	0,1573	0,13093	0,06364
hsa-miR-381-3p	2,83015 (0,000018; 0,000028)	2,64764 (0,03227; 0,04841)	0,21325	-0,1289
hsa-miR-410-3p	0,79751	0,65297	-0,5291	0,34676
hsa-miR-424-5p	0,35851	0,48532	0,36983	-0,1008
hsa-miR-449a	-0,1308	-0,0215	0,34028	0,66129
hsa-miR-449b-5p	0,10528	0,73101	0,1564	0,54112
hsa-miR-454-3p	-0,2812	-0,2622	-0,3425	0,03759
hsa-miR-497-5p	-0,093	0,12181	-0,0821	-0,0106
hsa-miR-511-5p	0,48512	0,37484	-0,0547	0,7337
hsa-miR-513b-5p	-0,3827	0,3173	-0,4614	0,46613
hsa-miR-519c-3p	-0,236	-0,3151	-0,5888	0,45238
hsa-miR-519d-3p	0,56013	0,35355	-0,2711	0,60824
hsa-miR-520d-3p	3,01403 (0,010257; 0,026050)	2,74222 (0,02460; 0,04305)	0,4321	0,97988
hsa-miR-520e	0,35997	0,43189	0,00518	0,69857
hsa-miR-524-5p	0,58919	0,65031	-0,2292	0,36737
hsa-miR-543	2,97089 (0,000969; 0,001230)	2,92987 (0,02193; 0,04305)	-0,3432	0,21039
hsa-miR-545-3p	1,94703 (0,007140; 0,013600)	2,17651 (0,02444; 0,04305)	0,0686	-0,0556
hsa-miR-548c-3p	-0,2634	0,14209	0,31034	0,26159
hsa-miR-548d-3p	-0,4434	-0,077	0,40479	0,64081
hsa-miR-548e-3p	0,48553	0,33754	0,30147	0,20589
hsa-miR-590-5p	0,4351	0,13934	0,29772	-0,2531
hsa-miR-607	-0,5031	-0,5664	-0,3313	0,35355
hsa-miR-655-3p	-0,1581	-0,7767	0,0049	0,15108
hsa-miR-656-3p	0,31174	0,31115	-0,7269	0,84607
hsa-miR-875-3p	0,31615	0,69305	-0,4465	0,82204
hsa-miR-9-5p	0,08488	-0,1321	0,04222	0,23401
hsa-miR-93-5p	0,33971	0,38294	-0,1589	0,0588
hsa-miR-98-5p	-0,0233	0,04949	0,00518	0,39715

Os miRNAs miR-302a/c, miR-372, miR-373 e miR-520d foram validados por RT-qPCR, utilizando oligonucleotídeos específicos para cada (Figura 12). A análise com oligonucleotídeos individuais confirma a modulação positiva de miR-372, miR-373 e miR-520d (Figura 12a-c) após 4 horas de infecção por *La*-WT e revela que, após 24 horas, os miRNAs permanecem modulados. No entanto, miR-302a/c, que apareceram com alto log2FC no array, não foram significativos no ensaio de validação (Figura 12d,e). Por outro lado, a infecção por *La-arg* modula positivamente miR-372 (Figura 12a), miR-373 (Figura 12b) e miR-302c (Figura 12e) apenas após 4 horas de infecção, mas não miR-520d (Figura 12c), como indicado nos resultados de qPCR *array*, e miR-302a (Figura 12d). Após 24 horas de infecção, *La-arg* modula negativamente miR-373 (Figura 12b).

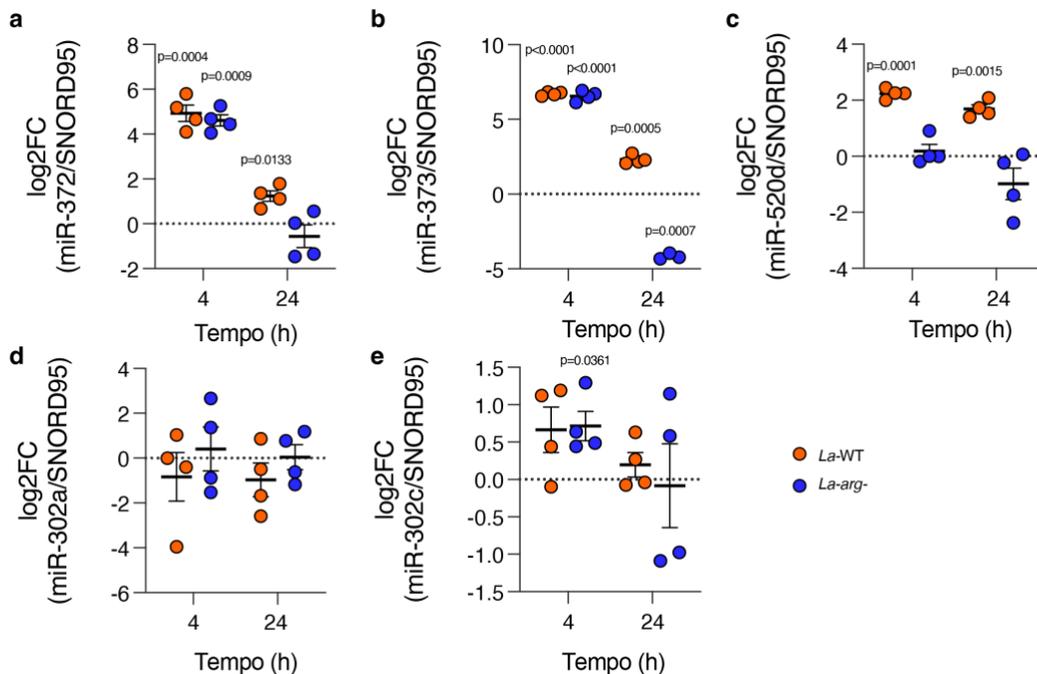


Figura 12 - Validação da expressão dos miRNAs miR-373, miR-372, miR-520d, miR-302a e miR-302c por RT-qPCR em macrófagos infectados com *La*-WT ou *La-arg*. Os valores individuais de log2FC relativos ao controle endógeno SNORD95 e normalizado pelos valores do macrófago não infectado são mostrados em círculos e a barra central representa a média \pm SEM (N=4). O valor de p foi determinado pelo teste t de Student de uma amostra bicaudal comparando à média teórica 0. Um ponto foi removido na análise de miR-373/SNORD95 após ter sido detectado como outlier pelo teste de Grubbs.

Uma vez que os miR-372 e miR-373 pertencem a um mesmo *cluster* e, portanto, são coexpressos, quantificamos o miRNA primário resultante dessa transcrição policistrônica, o pri-miR-372-373 e os transcritos originados do primeiro processamento,

os miRNA precursores pre-miR-372 e pre-miR-373. A análise mostrou que não há diferença significativa desses transcritos intermediários após 4 ou 24 horas de infecção (Figura 13).

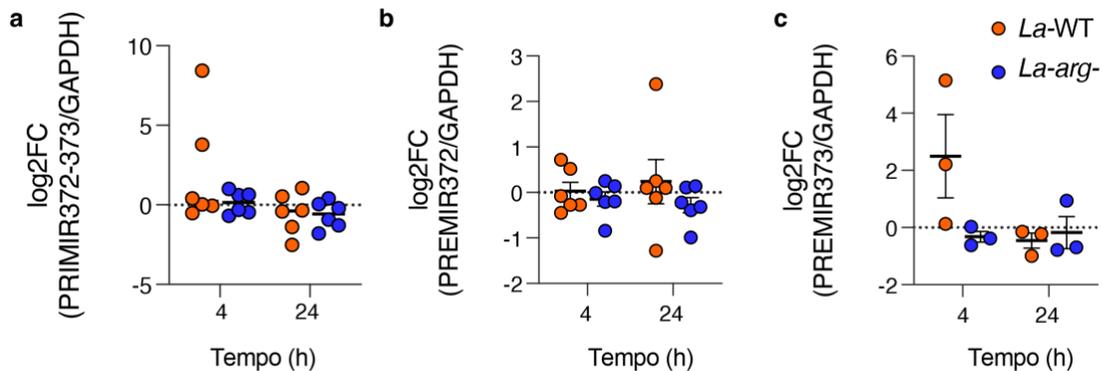


Figura 13 - Análise de transcritos intermediários da biogênese de miR-372 e miR-373. Os valores individuais de log₂FC relativos ao controle endógeno GAPDH são mostrados em círculos, sendo o vermelho ao macrófago infectado com *La-WT* e azul *La-arg-*. As barras mostram a média das replicatas \pm SEM. Significância estatística foi determinada pelo teste bicaudal de t Student de uma amostra não pareado. PRIMIR: miRNA primário e PREMIR: miRNA precursor.

4.3 Análise do estado transcricional de genes relacionados com o transporte e metabolismo de arginina e produção de NO em macrófagos THP-1 infectados com *Leishmania*

Para acessar o estado de indução transcricional dos genes relacionados ao metabolismo de arginina do macrófago, quantificamos os mRNAs de genes que codificam os transportadores de aminoácidos CAT1 (SLC7A1) e CAT2 (SLC7A2), e as enzimas NOS2, ARG1, ODC, AMD1, SRM e SMS. Não foi observado alteração no Log₂FC de genes do metabolismo de arginina nos macrófagos infectados com *La-WT* comparados a macrófagos não infectados (Figura 14a-h). A infecção por *La-arg-* modulou positivamente SLC7A2 após 4 horas de infecção (Figura 14b) e ARG1 (Figura 14d) após 24 horas de infecção. AMD1 e SMS foram modulados negativamente após 4 horas de infecção e SMS foi modulado positivamente após 24 horas de infecção por *La-arg-* (Figura 14f,h).

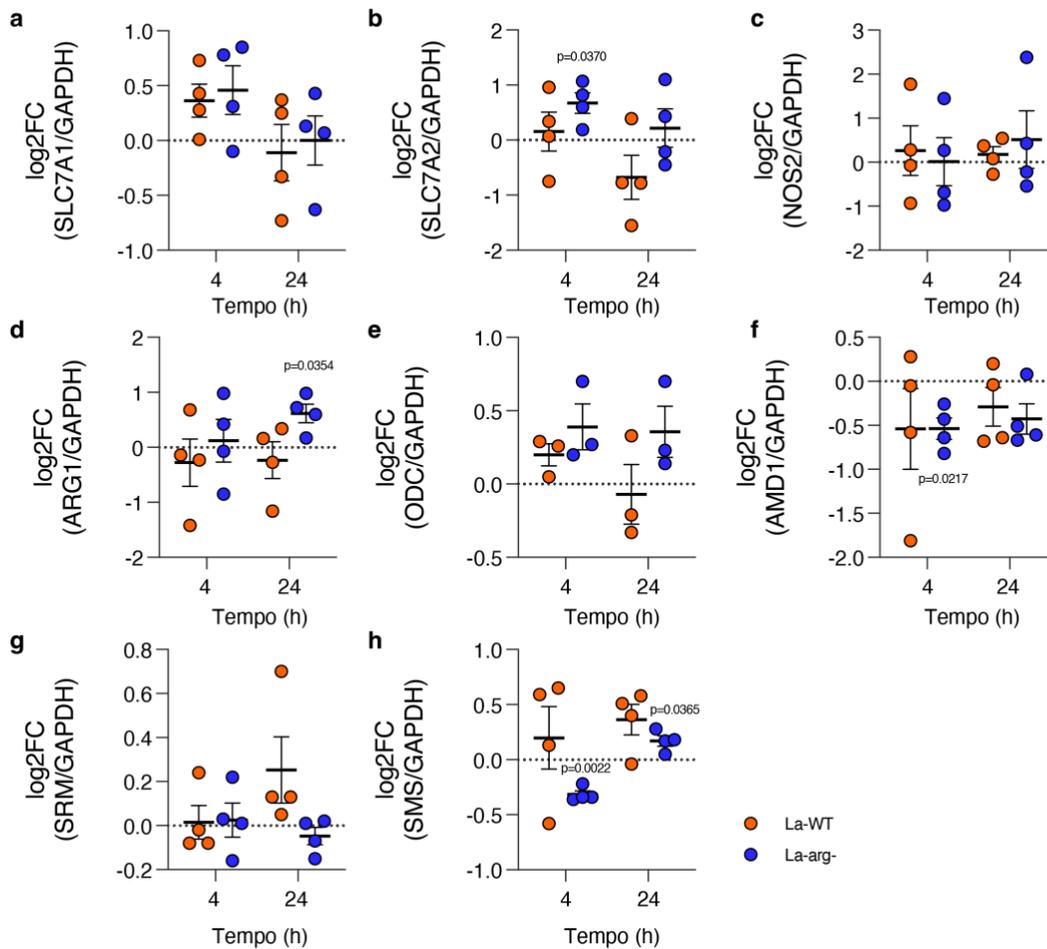


Figura 14 - Quantificação relativa dos mRNAs envolvidos no transporte e metabolismo de arginina por RT-qPCR em macrófagos THP-1 infectados com *L. amazonensis*. Os valores individuais normalizados por GAPDH são mostrados em círculos, sendo vermelho correspondente ao ao macrófago infectado com *La-WT* e azul a *La-arg-*. As linhas horizontais mostram a média das replicatas \pm SEM. Significância estatística foi determinada pelo teste bicaudal de t Student de uma amostra. SLC7A1: *solute carrier family 7 member 1* and SLC7A2: *solute carrier family 7 member 2*, NOS2: óxido nítrico sintase 2, ARG: arginase, ODC: ornitina descarboxilase, AMD1: S-adenosilmetionina descarboxilase, SRM: espermidina sintase, SMS: espermina sintase.

Uma vez que o transcrito de NOS2 não é induzido, utilizamos a técnica de Griess para quantificação de nitrito (Figura 15) e citometria de fluxo com o marcador DAF-FM (Figura 16). Em ambas as técnicas, os dados mostram que LPS não foi capaz de induzir a produção de NO. Após 4 horas observamos redução da porcentagem de células produtoras de NO após estímulo com LPS comparado com os níveis basais em células não infectadas ou estimuladas (Figura 16a). Por outro lado, a infecção por ambas, *La-WT* e *La-arg* aumentaram a concentração de nitrito após 4 horas de infecção (Figura 15),

porém utilizando o marcador DAF-FM observamos aumento da porcentagem de macrófagos produzindo NO apenas na infecção por *La-arg* (Figura 16). Vale ressaltar que as concentrações indicadas estão abaixo da curva padrão do kit de Griess e, portanto, são muito baixas.

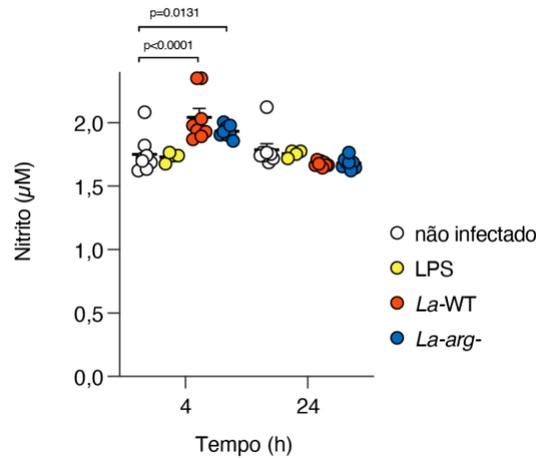


Figura 15 - Quantificação de nitrito em macrófagos THP-1 infectados com *La-WT* e *La-arg* com o método Griess. Macrófagos THP-1 (1×10^6) foram diferenciados em placas de 24 poços. Após 4 e 24 horas de infecção por *La-WT*, *La-arg* ou estímulo com 200ng/mL de LPS o sobrenadante foi recolhido para a reação de Griess. Os valores obtidos foram extrapolados abaixo da curva padrão do limite de detecção do kit comercial ($2,5 \mu\text{M}$ de NO_2^-). Valores de P obtidos com o teste de ANOVA e *post-hoc* de Šidák comparando com o macrófago não infectado no período correspondente. N= 8 para não infectado, *La-WT* e *La-arg* e N=4 para LPS.

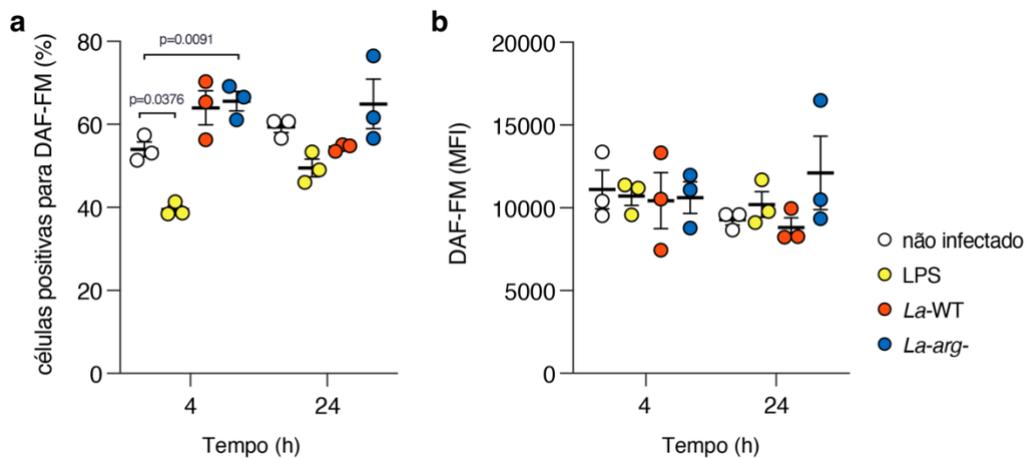


Figura 16 - Produção de NO acessada por marcação intracelular com DAF-FM por citometria de fluxo. a, porcentagem de células positivas para DAF-FM e b, média de intensidade de fluorescência (MFI) de DAF-FM. A significância estatística foi acessada utilizando-se o teste de ANOVA e *post-hoc* de Šidák comparando os diferentes tratamentos com o macrófago não infectado no período correspondente (N=3).

4.4 Análise do papel dos miRNAs miR-372, miR-373 e miR-520d e possíveis alvos moleculares

Para avaliar o papel dos miRNAs validados como modulados durante a infecção, realizamos a inibição de miRNAs utilizando 50 μ M de oligonucleotídeos antisense customizado para os miR-372-3p, miR-373-3p e miR-520d-3p. A inibição por oligonucleotídeos antisense modificados impede que os miRNAs maduros se associem ao miRISC e exerçam sua ação sobre o mRNA alvo. Quantificamos o impacto da inibição dos miRNAs, individualmente ou em conjunto, avaliando a infecção de *L. amazonensis* por citometria de fluxo após 4 e 24 horas (Figura 17).

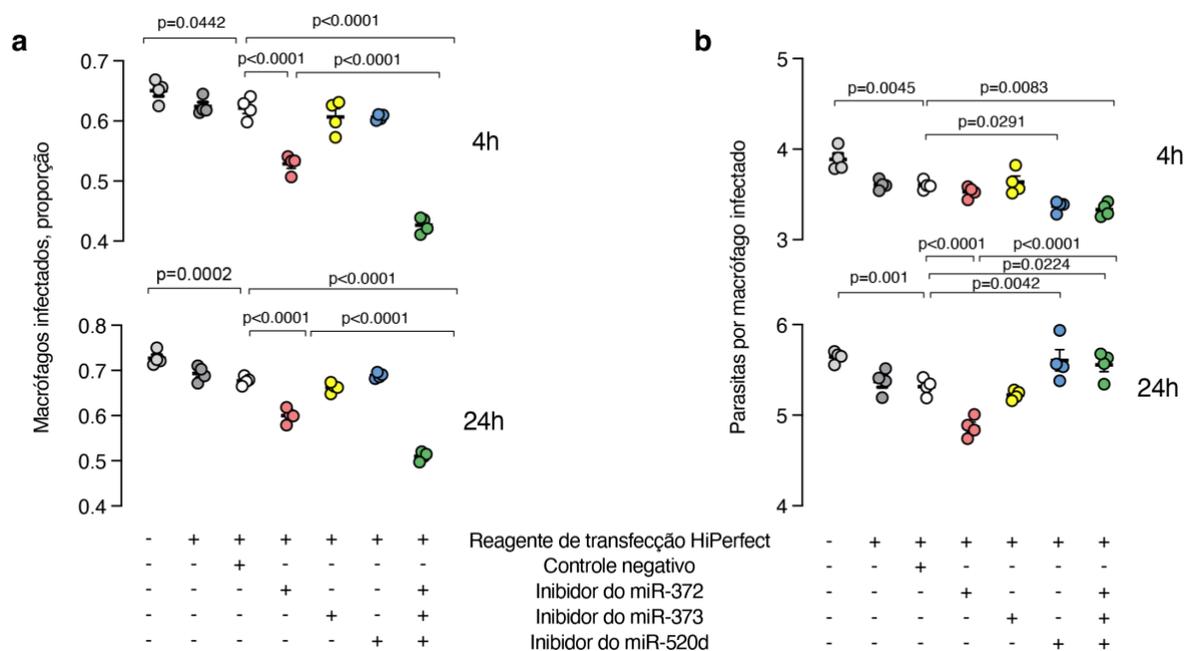


Figura 17 - Infectividade de *L. amazonensis* selvagem em macrófagos THP-1 mediante inibição de miR-372, miR-373 e/ou miR-520d. Os macrófagos foram tratados com 50 μ M de oligonucleotídeos controles com sequência aleatória ou com oligonucleotídeos antisense dos miR-372, miR-373 e miR-520d individualmente ou em conjunto. A infecção foi acessada por citometria de fluxo com imagem com o marcador CFSE. a, proporção de macrófagos infectados e b, número de parasitas internalizados por macrófago infectado. São representados os valores individuais das replicatas (N=4) \pm SEM. Valores de p foram determinados por ANOVA de uma via de múltiplas comparações post-hoc de Šidák (20 comparações) e os valores de p ajustado estão mostrados na figura.

A inibição de miR-372, mas não de miR-373 ou miR-520d sozinhos, foi capaz de diminuir em 14,5% após 4 horas e 11,4% após 24 horas a proporção de macrófagos infectados por *L. amazonensis* comparado com macrófagos tratados com um oligonucleotídeos aleatório, o controle negativo (NC). A inibição conjunta de miR-372,

miR-373 e miR-520d diminuiu a proporção de macrófagos infectados por *L. amazonensis* em 30,6% após 4 horas e a redução foi mantida após 24 horas, com 24,7% menos células infectadas em relação ao grupo de macrófagos tratados com o controle negativo.

Na análise das médias de parasitas internalizados, aqui referidos como amastigotas por macrófago infectado, houve redução após 4 horas de infecção com a inibição de miR-520d e miR-372/373/520d em conjunto, mas não de miR-372 e miR-373. No entanto, não houve efeito aditivo na inibição conjunta, e o valor foi similar à inibição de miR-520d sozinho (Figura 17b). Após 24 horas de infecção a inibição de miR-372 reduziu a média de parasitas internalizados enquanto a inibição de miR-372/373/520d em conjunto ou miR-520d sozinho levou a um pequeno aumento na média de amastigotas/macrófagos.

Por outro lado, observamos aumento da proporção de macrófagos infectados após 4 horas de infecção quando transfectados mímicos dos miR-372, miR-373 e miR-520d comparado com oligonucleotídeos *scramble* (NC), mas não observamos diferença na média de intensidade de fluorescência (Figura 18).

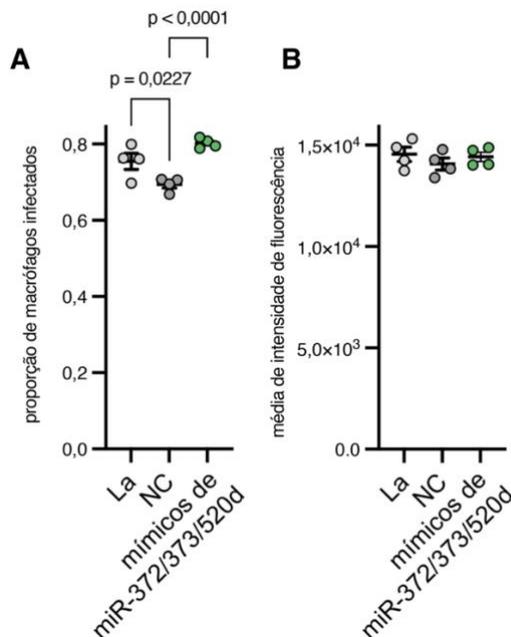


Figura 18 - Infectividade com o tratamento de mímicos dos miR-372/373/520d. a, proporção de macrófagos infectados e b, média de intensidade de fluorescência de *L. amazonensis* marcadas com CFSE. Valores de p foram determinados por ANOVA de uma via de múltiplas comparações post-hoc de Šidák (N=4).

Para avaliar se houve efeito compensatório na expressão de miRNAs, quantificamos os níveis dos 3 miRNAs maduros mediante a inibição de cada um deles, uma vez que esse efeito poderia explicar a ausência de efeito da inibição dos miRNAs sozinhos nas análises de infectividade. Observamos que a inibição de um miRNA da família não aumenta o nível de expressão de outro miRNA de forma compensatória (Figura 19). Ainda, a inibição de miRNAs por oligonucleotídeos antisense não diminui o nível de miRNA maduro, mas sim sua ação no mRNA-alvo.

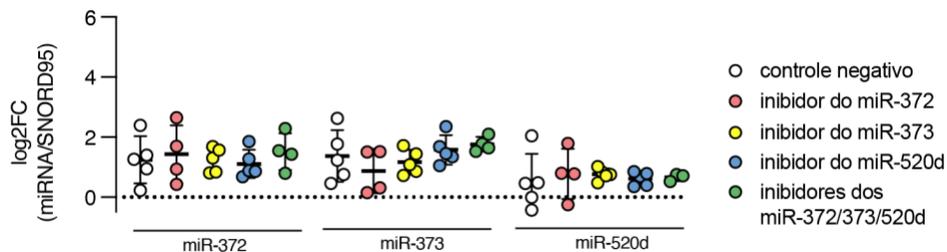


Figura 19 - Quantificação relativa dos níveis de miR-372, miR-373 e miR-520d mediante inibição de miRNAs. Significância estatística foi determinada pelo teste bicaudal de t Student de uma amostra e os valores de p não foram significativos para nenhuma comparação.

Para investigar possíveis alvos relacionados ao metabolismo de arginina acessamos a lista de alvos putativos do banco de dados TargetScan. Nessa análise, identificamos que o mRNA de CAT2 (SLC7A2) é alvo putativo predito e possui dois sítios-alvo para a família miR-372/373/520d no 3'UTR, nas posições 1327-1333 e 3947-3953 (Figura 20a). Verificamos que, semelhante aos resultados de infectividade, a inibição em conjunto de miR-372, miR-373 e miR-520d, mas não os miRNAs individuais, foi capaz de aumentar a quantidade de transcrito SLC7A2 do transportador de aminoácidos catiônicos CAT2 após 4 e 24 horas de infecção (Figura 20b).

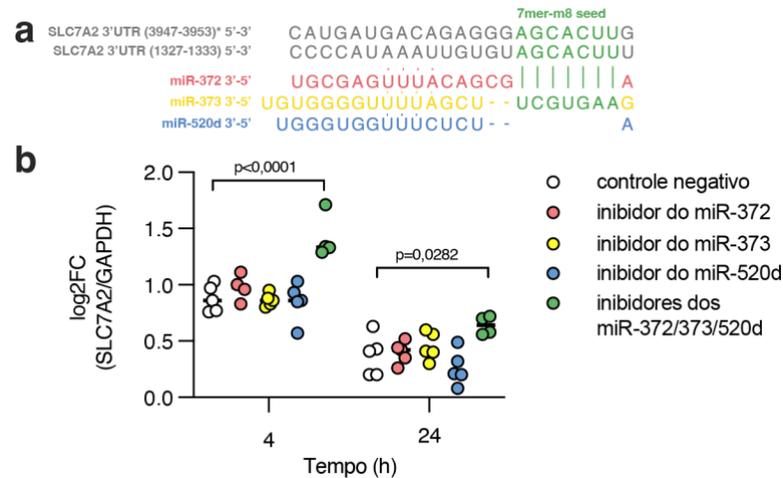


Figura 20 - Quantificação de SLC7A2 após inibição de miR-372, miR-373 e/ou miR-520d. a, sequência 3'UTR de SLC7A2, b, qPCR do mRNA SLC7A2. SLC7A2: gene do transportador de aminoácidos catiônicos CAT2. Os dados correspondem ao ddCt normalizado por GAPDH quantificado na amostra e subsequentemente normalizado com o dCt do macrófago infectado com *La*. Os valores de $p < 0.05$ estão mostrados na figura e foram determinados por ANOVA de uma via de múltiplas comparações post-hoc de Šidák. Os valores individuais de log₂FC e a média de $N=4-5 \pm \text{SEM}$ são mostrados.

A transfecção de mímicos de miR-372, miR-373 e miR-520d em macrófagos THP-1 não infectados ou a infecção com *Leishmania*, que também induz os miR-372/373/520d, foram capazes de reduzir a proteína CAT2 em termos de porcentagem e intensidade de fluorescência (Figura 21).

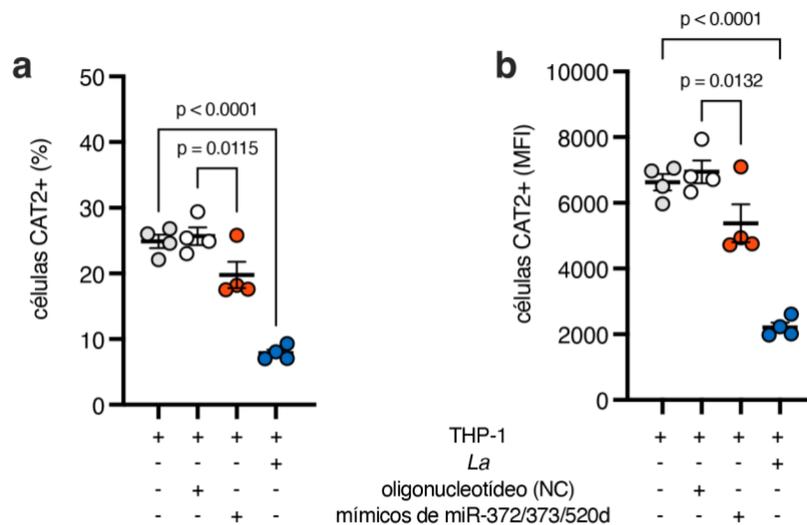


Figura 21 - Quantificação da proteína CAT2 após a transfecção de mímicos de miR-372, miR-373 e miR-520d. a, Porcentagem de células CAT2⁺ b, média de intensidade de fluorescência em células CAT2⁺. CAT2: transportador de aminoácidos catiônicos 2, MFI: Média de intensidade de fluorescência. Os valores de $p < 0.05$ estão mostrados na figura e foram determinados por ANOVA de uma via de múltiplas comparações post-hoc de Šidák. Os valores representam a média de $N=4$ replicatas $\pm \text{SEM}$.

Realizamos a transfecção de mímicos de miR-372, miR-373 e miR-520d e vetores expressando luciferase controlada pelo 3'UTR do gene SLC7A2, que codifica CAT2, em macrófagos RAW para validar a interação observada a nível de mRNA e proteína. Observamos redução da razão das luciferase Firefly e Renilla em relação ao vetor mutado no sítio 1327-1333, mas não no sítio 3947-3953 (Figura 22).



Figura 22 - Quantificação da atividade de luciferase controlada pelo 3'UTR de SLC7A2 com sítio alvo para os miR-372/373/520d. a, vetor pmirGLO com sequência do 3'UTR de SLC7A2 contendo a sequência *seed* de reconhecimento dos miR-372/373/520d e tratados com mímicos dos miR-372/373/520d, b, Razão dos valores da luciferase firefly (FL) pela luciferase renilla (RL) normalizada pelos valores obtidos pelo vetor pmirGLO vazio. Cada barra representa média \pm SEM (n = 4). Significância estatística foi determinada pelo teste bicaudal de t Student, sendo $p < 0.05$ considerado significativo.

Investigamos também o sítio putativo no 3'UTR do transcrito de NOS2, uma vez que nosso grupo demonstrou a modulação do mRNA de *Nos2* murino pelo miR-294, homólogo ao miR-372 (Muxel *et al.* 2017). Análise do alinhamento de 3'UTR de diferentes espécies na plataforma *TargetScan Human* mostrou um *mismatch* na região complementar à *seed* dos miRNAs comparando a sequência de NOS2 humano e murino. Em camundongos, a guanina na posição 6 na *seed* 7mer-m8 no 3'UTR garante sítio de ligação para miR-294, enquanto em primatas há uma mutação para citosina que impede a ação de miRNAs com a *seed* AAGUGCU (Figura 23a). Análise no TargetScan e microrna.org também mostrou que não há sequência *seed* em outro ponto do 3'UTR humano que seja complementar ao homólogo humano miR-372/373 e o miR-520d. Assim, como esperado, a inibição dos miRNAs não afetou os níveis do transcrito de NOS2 (Figura 23b).

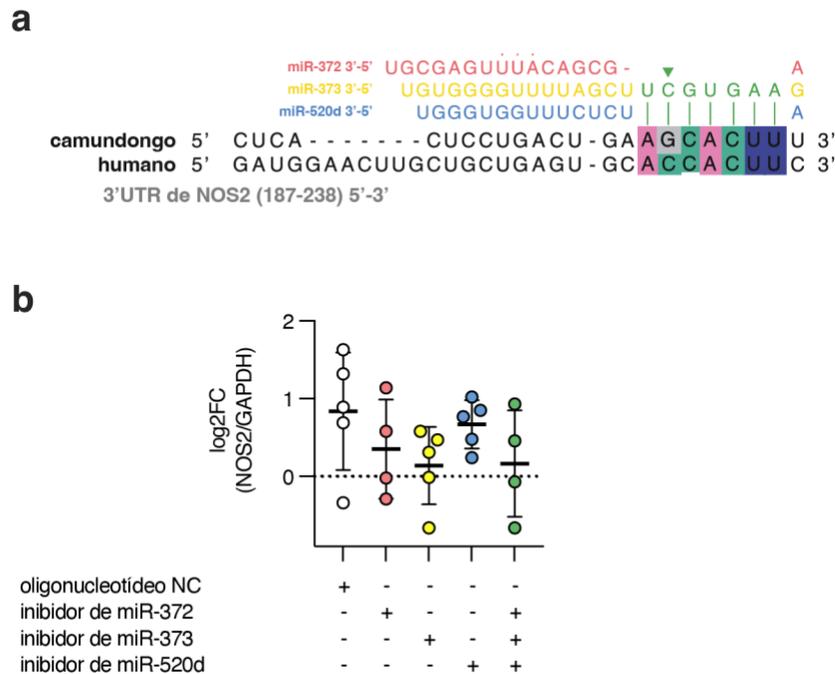


Figura 23 - Análise do alvo do sítio de ligação no 3'UTR do mRNA de NOS2 murino e humano. a, Sítio para miR-294 no 3'UTR de NOS2 de camundongos é do tipo 7mer-m8 e não está conservado na sequência de 3'UTR humano, impedindo o pareamento da *seed* dos miR-372/373/520d b, qPCR de NOS2 mediante inibição de miRNAs miR-372, miR-373 e/ou miR-520d utilizando oligonucleotídeos antisense. Os dados correspondem ao ddCt normalizado por GAPDH quantificado na amostra e subsequentemente normalizado com o dCt do macrófago infectado com *La*. Os dados foram avaliados com ANOVA de uma via de múltiplas comparações, sendo que a ANOVA não foi significativa. Os valores individuais de log2FC e a média de N=4-5 \pm SEM são mostrados.

4.5 Análises metabolômicas e a relação da família miR-372/373/520d com alterações metabólicas

Dado que os miRNAs miR-372/373/520d atuam em conjunto e têm como alvo o principal transportador de arginina em macrófagos infectados com *Leishmania*, utilizamos a técnica de metaboloma para entender as alterações que ocorrem durante a infecção a nível fenotípico e, dentre elas, quais podem ser moduladas com a inibição conjunta dos miR-372/373/520d. Desta forma, preparamos amostras de macrófagos não infectados (NI), infectados com *L. amazonensis* (*La*), e amostras de macrófagos infectados tratados com oligonucleotídeo de sequência aleatória (NC, controle negativo) ou com sequência antisense para os miR-372/373/520d (miR). O metaboloma foi determinado pelas

técnicas de CE e HILIC, em polaridade positiva e negativa, acoplados a espectrometria de massas para maior cobertura.

Os dados de CE-MS e HILIC-LC-MS/MS foram analisados com o método não supervisionado PCA-X para avaliar a distribuição dos controles de qualidade (QCs), cujas amostras foram distribuídas homogeneamente na corrida analítica. Após a normalização dos dados, o agrupamento dos QCs (destacados em amarelo na figura) demonstra que a variabilidade das demais amostras, correspondentes aos grupos experimentais NI, La, NC e miR (cinza), no espaço multivariante é devido a variações biológicas e não a flutuações analíticas (Figura 24).

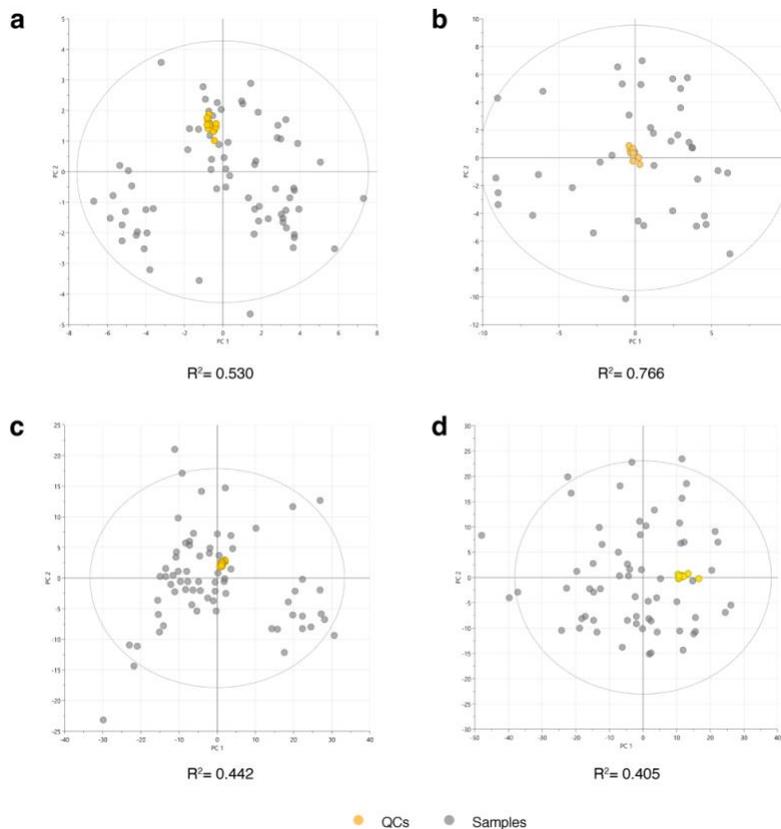


Figura 24 - Agrupamento de amostras de controle de qualidade (QCs) com método não supervisionado PCA-X. Em amarelo, amostras de QC, em cinza, amostras correspondentes aos grupos NI, La, NC e miR. a, CE-ESI(+)-TOFMS, b, CE-ESI(-)-TOFMS, c, HILIC-LC(+)-MS/MS e d, HILIC-LC(-)-MS/MS.

A análise das amostras após eliminação dos QCs mostrou que o método de PCA não supervisionado não separa claramente os grupos experimentais (Fig.25a-d).

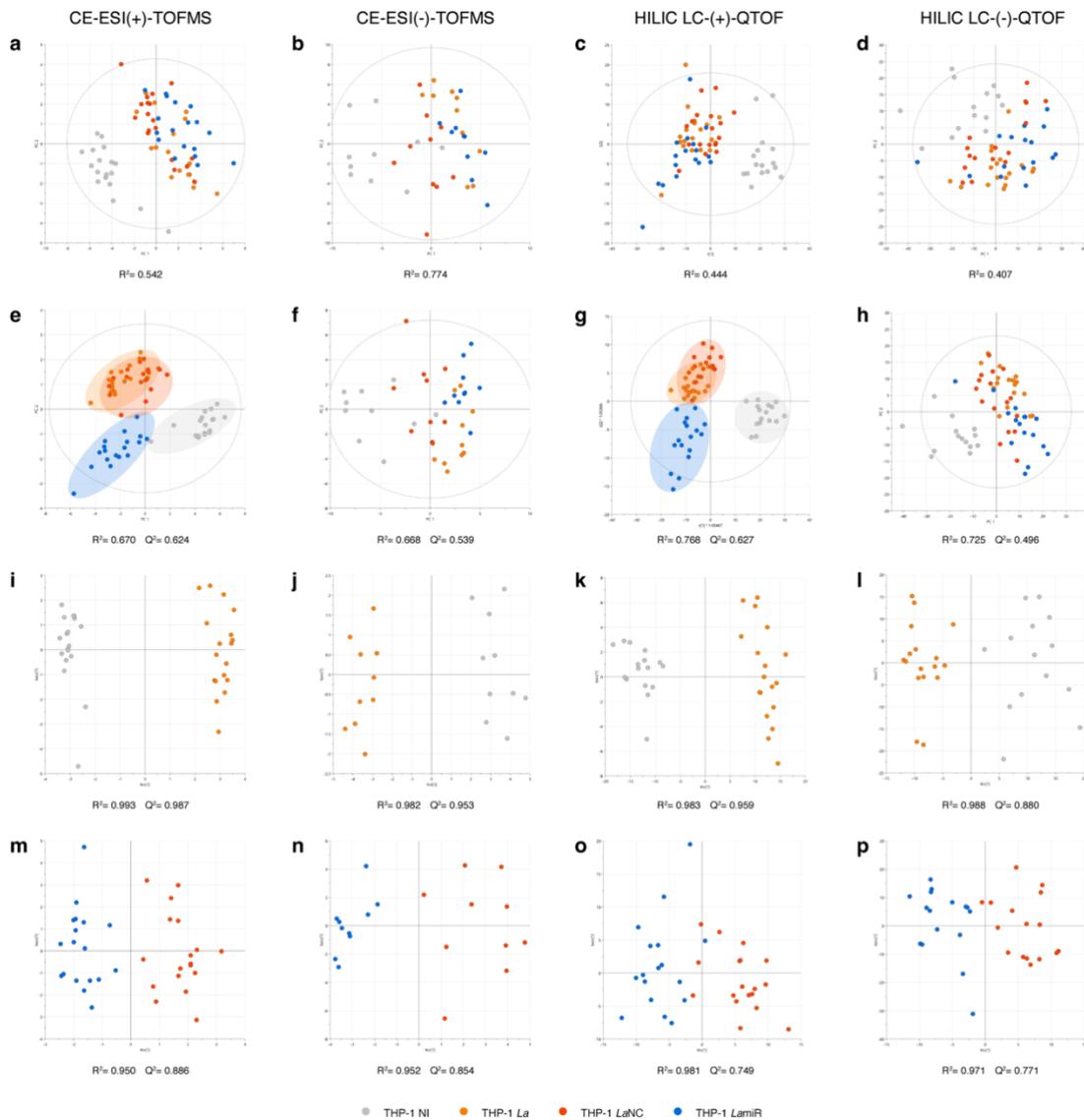


Figura 25 - Análises de dados multivariadas do metaboloma de macrófagos THP-1 não infectados ou infectados com *L. amazonensis*, com ou sem a inibição dos miR-372/373/520d. a-d PCA-X, e-h PLS-DA; i-l OPLS-DA para *La* x NI e m-p OPLS-DA para miR x NC. N= 18 para CE-ESI(+)-TOFMS, N=10 para CE-ESI(-)-TOFMS, N= 18 para HILIC-LC(+)-QTOF, N=18 para HILIC-LC(-)-QTOF. Em laranja macrófagos infectados com *L. amazonensis* (*La*), em cinza, macrófagos não infectados (NI), em azul, macrófagos infectados com *La* e tratados com inibidores de miR-372/373/520d (miR) e em vermelho controles negativos tratados com oligonucleotídeos de sequência aleatória (NC).

A análise dos grupos por método supervisionado PLS-DA demonstrou boa separação (destacados em *clusters*) para os dados obtidos em polaridade positiva, já que a sobreposição dos grupos *La* e NC era esperada, uma vez que a transfecção dos oligonucleotídeos com sequência aleatória não deveriam apresentar efeitos fenotípicos

(Fig.25e,g). Em polaridade negativa (Fig. 25f,h) somente os grupos infectados (*La*, NC e miR) separam do grupo não infectado (NI).

A partir dos modelos de multivariada OPLS-DA gerados (Figura 25i-p) foi possível obter valores relativos à importância de variáveis na projeção (VIP) e de correlação (P(corr)), que estão representados na tabelas 5 e 6 para os metabólitos considerados significativamente aumentados ou diminuídos na análise univariada.

Na análise univariada encontramos 554 *features* com alterações significativas durante a infecção (*La* x NI), das quais 78 foram anotados como metabólitos com nível de confiança 2 (Tabela 5). A maioria dos metabólitos foram diminuídos (86,6%, 75 de 86).

Tabela 5 - Anotação de metabólitos determinados como significativos (p FDR < 0.05) nos dados de macrófagos infectados com *La* (*La*) x não infectados (NI). RMT, *relative migration time*; RSD, *relative standard deviation*; FC, *fold change*; FDR, *false discovery rate*; P(corr), *partial correlation coefficient*; VIP, *variable importance in projection*.

Nome	Massa	RMT RT	RSD	Log2FC	p FDR	P(corr)	VIP
Glicina	75,0325	0,75	3,55	-0,79	$9,4 \times 10^{-5}$	-0,69	1,04
Putrescina	88,0995	0,46	7,52	3,36	$3,5 \times 10^{-11}$	0,98	2,18
Alanina	89,0479	0,81	2,91	1,71	$1,3 \times 10^{-8}$	0,91	1,54
Ácido láctico	90,0319	0,76	7,12	-0,39	$8,8 \times 10^{-3}$	-0,64	0,99
	90,0316	3,04	4,64	-0,60	$8,8 \times 10^{-7}$	-0,84	1,68
2-Ácido aminobutírico/ 3-Ácido aminobutírico/ 4-Ácido aminobutírico	103,0634	9,42	3,11	-1,39	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,76	1,58
Colina	104,1070	0,64	2,79	-1,03	$4,3 \times 10^{-6}$	-0,86	1,20
Serina	105,0424	0,87	4,17	-0,30	$1,3 \times 10^{-2}$	-0,42	0,66
Creatinina	113,0584	0,68	5,49	-1,37	$1,5 \times 10^{-5}$	-0,78	1,40
Maleamato	115,0266	9,72	5,09	-1,77	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,77	1,59
Prolina	115,0633	4,55	4,19	-0,57	$1,1 \times 10^{-2}$	-0,50	1,25
Ácido succínico	118,0266	0,77	6,13	-0,69	$2,6 \times 10^{-4}$	-0,79	1,18
Niacinamida	122,0479	1,84	3,14	-0,57	$2,3 \times 10^{-6}$	-0,75	1,27
Taurina	125,0141	1,53	28,03	-1,53	$1,5 \times 10^{-5}$	-0,81	1,36
Ácido piroglutâmico	129,0428	1,61	4,81	-0,83	$3,2 \times 10^{-4}$	-0,64	1,01
1-Pirrolina-3-hidróxi-5-carboxilato	129,0426	4,75	2,98	-0,77	$8,5 \times 10^{-4}$	-0,65	1,33
trans-4-hidróxiprolina	131,0584	1,01	3,19	-0,49	$1,1 \times 10^{-2}$	-0,39	0,80
Creatina	131,0693	0,80	3,02	-1,55	$5,5 \times 10^{-9}$	-0,90	1,47
Isoleucina	131,0943	0,89	3,05	-0,30	$2,5 \times 10^{-2}$	-0,38	0,71
Leucina	131,0946	3,15	3,74	-0,87	$1,6 \times 10^{-4}$	-0,71	1,50

Nome	Massa	RMT RT	RSD	Log2FC	p FDR	P(corr)	VIP
Asparagina	132,0532	0,90	3,68	-0,83	$5,5 \times 10^{-5}$	-0,69	1,06
Ornitina	132,0900	0,64	3,87	1,91	$5,1 \times 10^{-9}$	0,94	1,63
Ácido aspártico	133,0371	0,97	3,44	-0,49	$1,0 \times 10^{-3}$	-0,52	0,85
Ácido málico	134,0213	10,3	6,45	-1,35	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,76	1,57
Fosfato de etanolamina	141,0190	1,46	12,51	-1,85	$2,4 \times 10^{-6}$	-0,87	1,61
4-Ácido guanidinobutírico	145,0848	0,75	4,98	-1,42	$1,2 \times 10^{-8}$	-0,87	1,41
Glutamina	146,0684	0,93	5,32	0,42	$7,1 \times 10^{-3}$	0,49	0,75
Glutamato	147,0528	0,94	3,19	-0,87	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,74	1,10
Tiomorfolina 3-carboxilato	147,0350	4,58	4,06	-0,86	$2,2 \times 10^{-2}$	-0,47	1,06
Xantina	152,0333	2,68	13,95	2,03	$1,6 \times 10^{-4}$	0,67	1,40
Histidina	155,0691	0,68	4,74	0,77	$1,1 \times 10^{-5}$	0,71	1,01
2-Ácido amino adípico	161,0684	0,93	10,15	-2,09	$1,1 \times 10^{-7}$	-0,85	1,68
Carnitina	162,1122	0,77	3,49	-1,30	$3,1 \times 10^{-8}$	-0,87	1,32
Ácido aconítico	174,0158	9,32	2,60	-1,77	$2,8 \times 10^{-5}$	-0,76	1,56
Arginina	174,1115	11,57	1,91	-0,44	$8,8 \times 10^{-4}$	-0,69	1,28
Citrulina	175,0954	0,95	18,81	1,77	$9,7 \times 10^{-6}$	0,77	1,45
Fosfocolina	183,0655	1,48	5,25	-1,42	$4,6 \times 10^{-6}$	-0,86	1,42
2-Ácido fosfoglicérico/ 3-Ácido fosfoglicérico	185,9948	0,46	17,95	-0,85	$2,4 \times 10^{-4}$	-0,80	1,18
N1-Acetil espermidina	187,1677	0,60	6,15	-0,70	$1,1 \times 10^{-5}$	-0,70	0,96
N-Acetil glutamato	189,0639	9,46	2,68	-1,75	$3,6 \times 10^{-5}$	-0,68	1,44
Ácido cítrico/Ácido isocítrico	192,0277	1,63	5,51	-1,47	$4,3 \times 10^{-14}$	-0,92	1,44
N ^G , N ^G -dimetil-arginina	202,1428	10,79	3,77	-0,94	$1,6 \times 10^{-5}$	-0,82	1,42
Acetil carnitina	203,1153	0,81	6,05	-1,82	$2,3 \times 10^{-6}$	-0,93	1,61
Triptofano	204,0873	0,94	8,48	-0,51	$4,1 \times 10^{-2}$	-0,41	0,96
Quinurenina	208,0838	0,88	25,76	-2,01	$4,3 \times 10^{-5}$	-0,73	1,71
Propionilcarnitina	217,1311	0,83	4,58	-1,58	$5,9 \times 10^{-9}$	-0,80	1,49
Pantotenato	219,1101	1,55	24,42	-1,76	$5,1 \times 10^{-9}$	-0,81	1,58
Cistationina	222,0728	0,87	4,64	↑ ^a		0,05	0,41
Ribulose-5-Phosphate	230,0188	0,49	4,69	-0,66	$2,3 \times 10^{-2}$	-0,57	0,94
Citidina	243,0872	0,86	4,68	-1,13	$6,6 \times 10^{-4}$	-0,47	1,04
Isovalerilcarnitina	245,1610	1,55	3,56	-0,95	$4,6 \times 10^{-2}$	-0,43	0,96
Validamina 7-fosfato	257,0670	3,31	17,70	-1,40	$6,5 \times 10^{-4}$	-0,55	1,23
Glicerofosfocolina	257,1026	1,53	3,56	-1,60	$2,2 \times 10^{-9}$	-0,90	1,50
Inosina	268,0804	1,45	22,06	-1,59	$1,3 \times 10^{-4}$	-0,67	1,64
Derivado cíclico 1 de Ácido argininosuccinico	272,1130	0,76	3,87	3,26	$3,6 \times 10^{-8}$	0,95	2,14
Sedoheptulose 7-fosfato	290,0385	0,52	4,52	-1,44	$2,6 \times 10^{-4}$	-0,84	1,24
5'-Metiltioadenosina	297,0882	1,63	3,26	-1,30	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,82	1,67

Nome	Massa	RMT RT	RSD	Log2FC	p FDR	P(corr)	VIP
Glutationa	307,0831	0,94	15,60	-2,28	$5,3 \times 10^{-4}$	-0,83	1,23
N-Acetilneuraminato	309,1057	1,66	6,52	-2,38	$7,6 \times 10^{-6}$	-0,83	1,82
Beta-Citril-Glutamato	321,0696	21,27	2,57	-1,62	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,83	1,71
Uridina monofosfato	324,0359	11,47	2,93	-0,76	$4,9 \times 10^{-3}$	-0,58	1,30
Frutose-1,6-bisfosfato	339,9915	0,41	8,21	-0,44	$3,5 \times 10^{-2}$	-0,52	0,84
Adenosina monofosfato	347,0630	10,71	2,11	-0,68	$9,5 \times 10^{-9}$	-0,82	1,36
S-Adenosil metionina	398,1379	0,67	4,08	-1,25	$1,2 \times 10^{-3}$	-0,59	1,26
Uridina difosfato	404,0020	17,7	2,62	-1,06	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,76	1,58
S-(2,2-Dicloro-1-hidróxi) etil Glutationa	419,0371	21,26	5,16	-1,62	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,84	1,72
Adenosina difosfato	427,0267	0,54	4,80	-1,51	$6,2 \times 10^{-4}$	-0,76	1,12
Guanosina difosfato	443,0249	20,14	3,11	-1,40	$3,0 \times 10^{-5}$	-0,82	1,70
Uridina trifosfato	483,9679	21,09	4,04	-2,64	$4,1 \times 10^{-5}$	-0,84	1,73
Adenina trifosfato	506,9938	0,44	17,18	-4,18	$6,2 \times 10^{-4}$	-0,78	1,17
Guanosina trifosfato	522,9908	22,17	4,20	-3,90	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,87	1,75
8-Oxo-Guanosina trifosfato	538,9898	21,27	4,48	-1,59	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,86	1,75
UDP-Glicose	566,0534	0,43	2,76	-1,92	$5,1 \times 10^{-5}$	-0,91	1,31
UDP-Ácido glucurônico	580,0338	20,68	2,35	-2,10	$2,9 \times 10^{-5}$	-0,84	1,72
Ferrocitocromo	604,174	10,44	7,96	-3,04	$2,3 \times 10^{-6}$	-0,97	1,55
UDP-N-acetil glucosamina	607,0796	0,44	4,42	-1,85	$4,4 \times 10^{-5}$	-0,92	1,32
Glutationa dissulfeto	612,1496	0,99	4,24	-1,48	$7,8 \times 10^{-4}$	-0,87	1,24
Nicotinamida adenina dinucleotídeo	663,1087	1,58	3,29	-1,39	$7,6 \times 10^{-6}$	-0,84	1,40
Tripanotona dissulfeto	721,2892	0,84	8,03	↑ ^a		0,02	0,73

^a Metabólitos encontrados somente em macrófagos infectados nos quais não é possível calcular log2FC e estatísticas. UDP: uridina difosfato

Por outro lado, encontramos 355 *features* significativamente moduladas diante da inibição de miRNAs (miR × NC), dos quais 56 foram anotadas como metabólitos com nível 2 de confiança (Tabela 6). A maioria (90,16%, 55 de 61) foram diminuídos.

Tabela 6 - Anotação de metabólitos determinados como significativos (p FDR < 0.05) nos dados de macrófagos infectados com *La* e tratados com inibidores de miR-372/373/520d (miR) x controles negativos (NC). RMT, *relative migration time*; RSD, *relative standard deviation*; FC, *fold change*; FDR, *false discovery rate*; P(corr), *partial correlation coefficient*; VIP, *variable importance in projection*.

Nome	Massa	RMT		Log2FC	p FDR	P(corr)	VIP
		RT	RSD				
Ácido pirúvico	88,0162	0,51	2,73	0,86	$7,2 \times 10^{-3}$	0,63	1,06
Putrescina	88,0995	0,46	7,52	-0,75	$6,3 \times 10^{-7}$	-0,78	1,41
Alanina	89,0479	0,81	2,91	-0,78	$6,8 \times 10^{-5}$	-0,67	1,44
Serina	105,0424	0,87	4,17	-0,37	$7,7 \times 10^{-3}$	-0,50	0,89
Prolina	115,0633	0,95	3,75	-0,55	$2,1 \times 10^{-3}$	-0,58	1,20
Valina/Norvalina/Betaína	117,0790	0,88	3,46	-0,52	$8,0 \times 10^{-3}$	-0,50	1,02
Ácido succínico	118,0266	0,77	6,13	-0,49	$1,2 \times 10^{-2}$	-0,61	1,06
Purina	120,0430	4,57	12,91	-1,25	$7,4 \times 10^{-3}$	-0,62	1,52
1-Pirrolina-3-hidróxi-5-carboxilato	129,0426	4,75	2,98	-0,52	$2,8 \times 10^{-2}$	-0,50	1,27
trans-4-hidróxi-prolina	131,0584	1,01	3,19	-0,56	$4,1 \times 10^{-3}$	-0,52	1,23
Isoleucina	131,0946	3,42	4,72	-0,86	$3,2 \times 10^{-3}$	-0,65	1,65
Leucina	131,0946	3,15	3,74	-0,70	$5,3 \times 10^{-3}$	-0,60	1,53
Asparagina	132,0532	0,90	3,68	-0,47	$3,8 \times 10^{-3}$	-0,55	1,12
Ornitina	132,0900	0,64	3,87	-0,64	$6,8 \times 10^{-5}$	-0,72	1,28
Ácido málico	134,0215	0,73	4,89	-0,40	$2,9 \times 10^{-2}$	-0,57	1,02
Ácido urocânico	138,0425	2,28	3,88	0,98	$1,7 \times 10^{-2}$	0,51	1,27
Fosfato de etanolamina	141,0190	1,46	12,51	-0,58	$4,1 \times 10^{-3}$	-0,52	1,17
Glutamina	146,0680	7,06	3,15	-0,74	$4,4 \times 10^{-3}$	-0,57	1,50
Lisina	146,1051	0,65	4,67	-0,36	$1,4 \times 10^{-2}$	-0,46	0,97
Metionina	149,0513	0,92	12,12	-0,54	$1,3 \times 10^{-3}$	-0,57	1,18
Histidina	155,0691	0,68	4,74	-0,67	$3,2 \times 10^{-4}$	-0,71	1,33
2-Ácido amino adípico	161,0684	0,93	10,15	-0,98	$1,4 \times 10^{-2}$	-0,48	1,51
Carnitina	162,1122	0,77	3,49	-0,56	$5,9 \times 10^{-3}$	-0,52	1,17
Fenilalanina	165,0805	0,95	4,83	-0,64	$8,4 \times 10^{-4}$	-0,47	1,33
Dihidróxiacetona fosfato/ Gliceraldeído 3-fosfato	169,9979	0,46	8,09	-1,32	$6,8 \times 10^{-3}$	-0,70	1,15
Glicerol 1-fosfato	172,0131	0,47	6,10	-0,84	$2,4 \times 10^{-3}$	-0,76	1,19
Arginina	174,1110	0,67	2,76	-0,66	$3,1 \times 10^{-4}$	-0,73	1,34
Citrulina	175,0954	0,95	18,81	-0,63	$5,8 \times 10^{-3}$	-0,52	1,23
Tirosina	181,0749	0,97	5,94	-0,46	$4,1 \times 10^{-3}$	-0,53	1,07
Manitol	182,0793	4,57	3,79	-0,77	$2,4 \times 10^{-2}$	-0,48	1,32
2-Ácido fosfoglicérico/ 3-Ácido fosfoglicérico	185,9948	0,46	17,95	↑ ^a		-0,90	1,35
N1-Acetil espermidina	187,1677	0,60	6,15	1,65	$1,4 \times 10^{-7}$	0,89	2,12

Nome	Massa	RMT RT	RSD	Log2FC	p FDR	P(corr)	VIP
N ^G ,N ^G -dimetil-arginina	202,1428	10,79	3,77	-0,65	4,2×10 ⁻²	-0,41	1,15
Espermina	202,2149	0,45	3,60	-0,79	4,4×10 ⁻³	-0,46	1,29
Acetil carnitina	203,1153	0,81	6,05	-1,06	6,7×10 ⁻⁶	-0,73	1,67
Triptofano	204,0873	0,94	8,48	-0,61	4,1×10 ⁻³	-0,58	1,27
Quinurenina	208,0838	0,88	25,76	-1,97	2,5×10 ⁻⁴	-0,77	2,30
Propionilcarnitina	217,1311	0,83	4,58	-0,98	3,2×10 ⁻⁴	-0,52	1,33
Cistationina	222,0728	0,87	4,64	-1,04	3,8×10 ⁻⁴	-0,60	1,64
Ribulose 5-fosfato	230,0188	0,49	4,69	-0,82	1,6×10 ⁻³	-0,68	1,13
Citidina	243,0872	0,86	4,68	0,68	3,4×10 ⁻²	0,43	1,03
Glicero-3-Fosfocolina	257,1026	1,53	3,56	-0,61	7,4×10 ⁻⁴	-0,61	1,26
Derivado cíclico 1 de Ácido argininosuccinico	272,1130	0,76	3,87	-1,15	1,8×10 ⁻⁵	-0,76	1,73
Sedoheptulose 7-fosfato	290,0385	0,52	4,52	-0,85	2,4×10 ⁻³	-0,75	1,21
Glutationa	307,0831	0,94	15,60	-0,82	2,9×10 ⁻²	-0,59	0,98
5'-Metiltioadenosina	297,0902	1,96	2,59	-0,60	1,8×10 ⁻²	-0,45	1,20
Frutose 1,6-bisfosfato	339,9915	0,41	8,21	-1,17	5,0×10 ⁻³	-0,72	1,17
Adenosina monofosfato	347,0630	10,71	2,11	-0,58	2,6×10 ⁻³	-0,58	1,40
S-Adenosil metionina	398,1379	0,67	4,08	-0,49	3,4×10 ⁻²	-0,39	1,05
Guanosina difosfato	443,0249	20,14	3,11	-0,53	1,9×10 ⁻²	-0,39	1,16
Adenosina trifosfato	506,9938	0,44	17,18	-2,16	1,4×10 ⁻³	-0,93	1,39
Guanosina trifosfato	522,9908	22,17	4,20	-2,14	4,4×10 ⁻³	-0,52	1,37
Ferrocitocromo	604,1740	10,44	7,96	-1,30	1,8×10 ⁻³	-0,62	1,40
UDP-N-acetil glucosamina	607,0796	0,44	4,42	-0,83	1,4×10 ⁻³	-0,77	1,23
Glutationa dissulfeto	612,1496	0,99	4,24	-1,24	6,2×10 ⁻⁴	-0,85	1,27
Tripanotiona dissulfeto	721,2892	0,84	8,03	-0,99	2,1×10 ⁻⁴	-0,72	1,55

^a Metabólitos não encontrados em macrófagos com inibição de miRNAs nos quais não é possível calcular log2FC e estatísticas. UDP: uridina difosfato

As maiores mudanças ocorreram em um conjunto de metabólitos relacionados ao metabolismo de arginina (Figura 26, 27). Nós observamos aumento dos níveis de metabólitos do ciclo da ureia e síntese de poliaminas nos macrófagos infectados com *Leishmania* comparado com macrófagos não infectados (*La* × NI), como ornitina, putrescina, citrulina, arginosuccinato (aqui identificado como seu derivado cíclico), glutamina e tripanotiona dissulfeto (Figura 26). Por outro lado, a inibição dos miR-372/373/520d (comparação miR × NC) diminuiu arginina, ornitina, putrescina, espermina, citrulina, arginosuccinato, prolina, glutamina e tripanotiona dissulfeto (Figura 26).

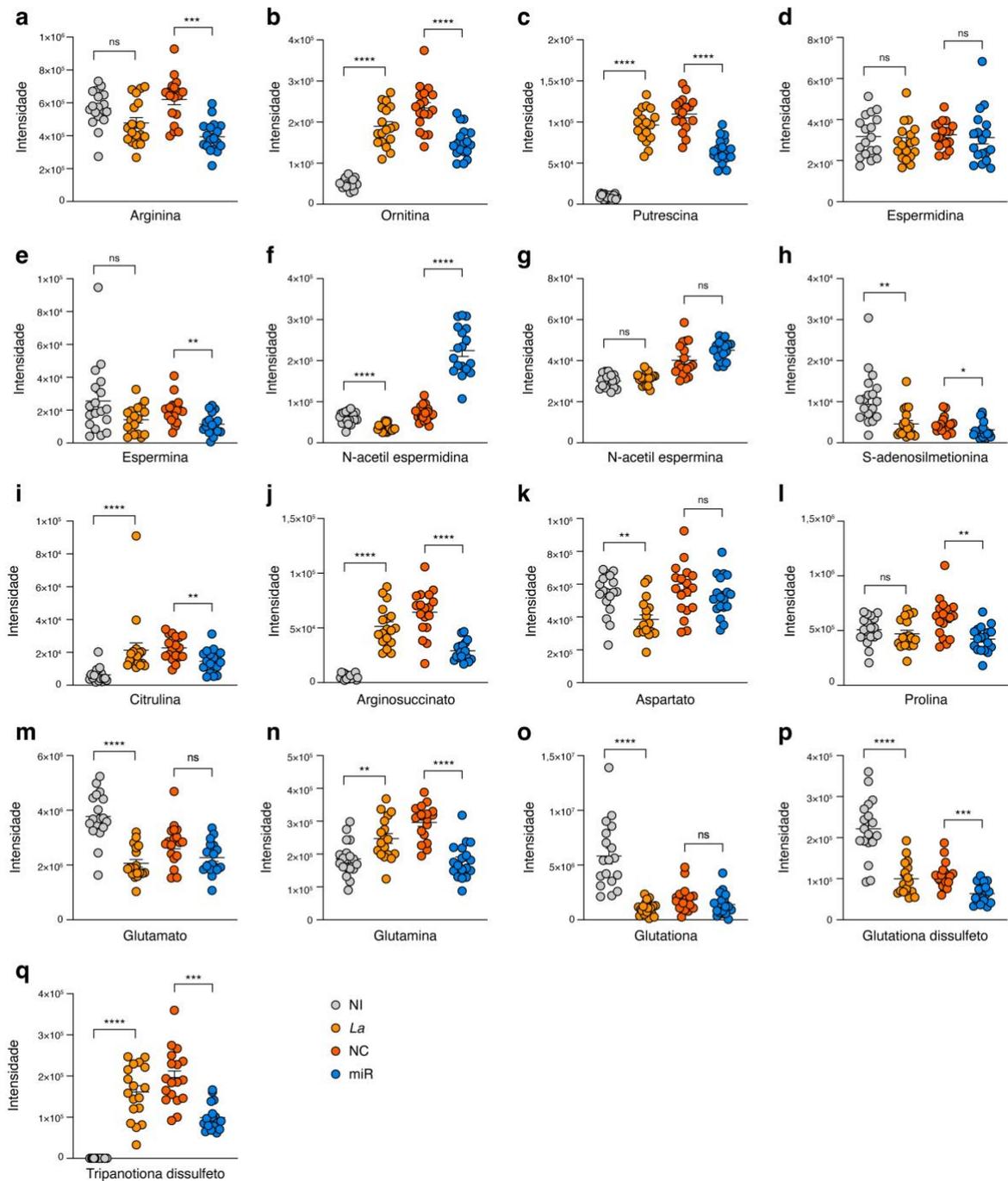


Figura 26 - Intensidade (área) de picos de metabólitos relacionados com ciclo da ureia, produção de poliaminas e derivados. Valores representam intensidade de sinal obtida para cada grupo \pm SEM (N=18). Valores de p ajustado por FDR (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$) estão mostrados na figura para as comparações La x NI e miR x NC. ns: não significativo, NI: macrófago não infectado, La: macrófago infectado com *L. amazonensis*, NC: macrófago infectado com *L. amazonensis* tratado com controle negativo e miR: macrófago infectado com *L. amazonensis* com inibição de miR-372/373/520d.

Nós também observamos alterações em poliaminas acetiladas, sendo que N-acetil espermidina foi o único metabólito da via de poliaminas acumulado durante a inibição de miRNAs (Figura 26f, 27e).

Para confirmar os achados, validamos os picos referentes a arginina, ornitina, putrescina, espermidina, N-acetil espermidina, N-acetil espermina e tripanotona dissulfeto utilizando padrões analíticos, e, portanto, atingimos o nível 1 de confiança na identificação, e quantificamos os níveis desses metabólitos com curvas padrão (Figura 27).

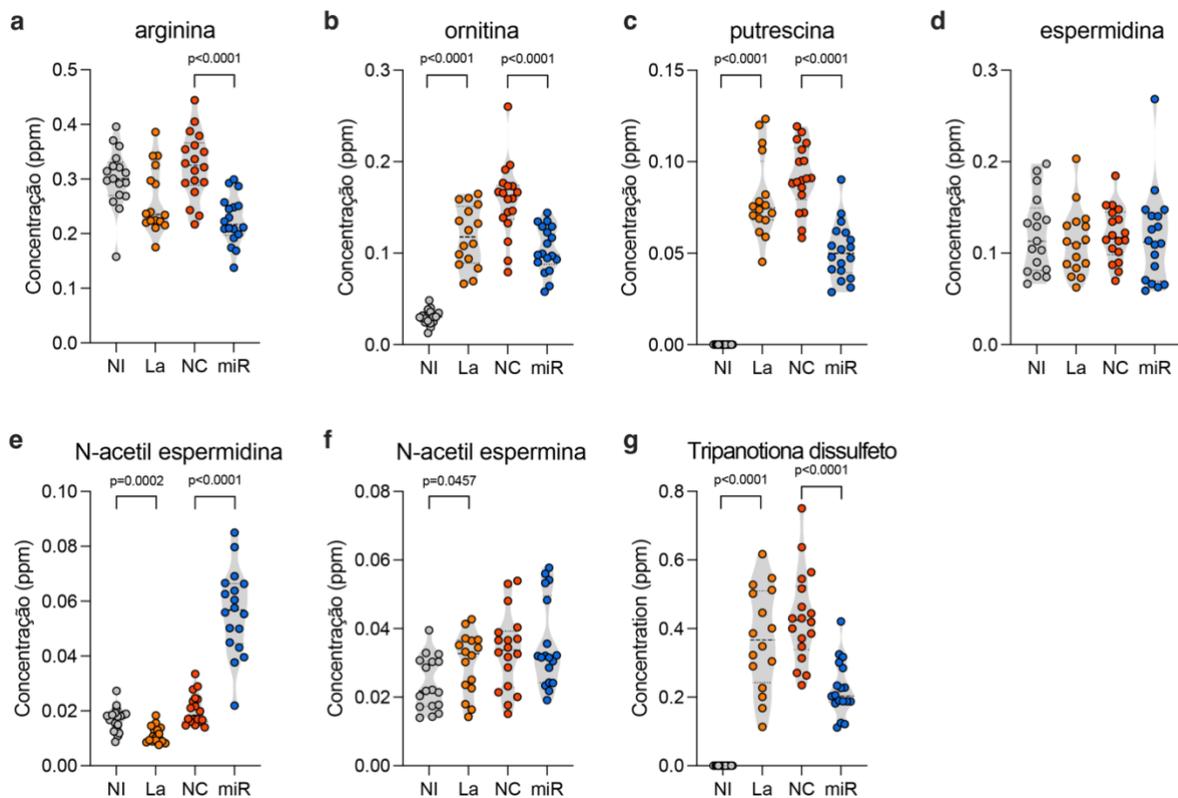


Figura 27 - Quantificação de metabólitos identificados em nível 1 e relacionados com a via de poliaminas e tripanotona. Valores representam a concentração em cada amostra obtida por meio de interpolação com a curva padrão baseada em concentrações conhecidas de padrões analíticos de cada metabólito (N=18). Valores de p obtidos a partir de teste t não pareado bicaudal estão mostrados na figura para as comparações La x NI e miR x NC. ppm: partes por milhão, NI: macrófago não infectado, La: macrófago infectado com *L. amazonensis*, NC: macrófago infectado com *L. amazonensis* tratado com controle negativo e miR: macrófago infectado com *L. amazonensis* com inibição de miR-372/373/520d.

Para entender melhor quais genes-alvo poderiam ser responsáveis pelas alterações metabólicas mediadas por miRNAs, coletamos uma lista de 5206 genes humanos contendo sítios para os miR-372/373/520 na 3'UTR do banco de dados TargetScan Human 7.2. Nós observamos enriquecimento de vias do banco de dados Reactome relacionados com o metabolismo de arginina (Tabela 7), como o ciclo da ureia (R-HSA-70635), metabolismo de poliaminas (R-HSA-351202) e transporte de cátions e ânions inorgânicos e aminoácidos/oligopeptídeos (R-HSA-425393) (Tabela 7). Com isso, foi possível estabelecer relações entre os metabólitos modulados e enzimas/transportadores alvos putativos.

Nós encontramos alvos putativos dos miR-372/373/520 relacionados ao metabolismo de arginina e ciclo da ureia, incluindo os principais transportadores SLC7A1 (CAT1) e SLC7A2 (CAT2). No ciclo da ureia, encontramos a N-acetil glutamato sintase (NAGS), a aminoacilase (ACY1), a arginosuccinato liase (ASL), o transportador de aspartato glutamato (SLC25A12), a ornitina translocase (SLC25A15), a arginase 2 mitocondrial e a ornitina transcarbamilase (OTC). Relacionados à síntese de poliaminas, encontramos a S-adenosilmetionina descarboxilase (AMD1), a N1-acetil espermina/espermidina oxidase peroxissomal (PAOX), agmatinase (AGMAT) e o inibidor de antianzima 1 (AZIN1) (Tabela 7). Para melhor visualizar alvos preditos relacionados com a via de arginina a sua relação com os metabólitos modulados mediante inibição de miRNAs agrupamos os dados em um resumo gráfico (Figura 28).

Tabela 7 - Análise de enriquecimento de vias Reactome a partir de metabólitos significativamente modulados na comparação miR x NC e respectivos genes preditos como alvos de miR-372/373/520d. Alvos preditos no banco de dados TargetScan Human 7.2 de miR-372/373/520d. FDR: *False discovery rate*.

Via enriquecida	FDR	Metabólitos (Número de moléculas;total de moléculas)	Alvos preditos (Número de genes;total de genes)
Metabolismo de aminoácidos e derivativos			
Metabolismo de Glutamato e Glutamina (R-HSA-8964539)	4,75x10 ⁻³	L-Alanina, Ácido pirúvico, Ornitina, L-Glutamina, L-Glutamato, L-Prolina, Adenosina trifosfato (7;27)	RIMKLA, PYCRL, GLUL (3;42)
Catabolismo de triptofano (R-HSA-71240)	1,46x10 ⁻⁶	L-Quinurenina, L-Valina, L-Alanina, L-Tirosina, L-Isoleucina, Ácido pirúvico, L-Triptofano, L-Fenilalanina, L-Leucina, L-Histidina (10;34)	AADAT, HAAO, SLC36A4, IDO1 (4;48)
Ciclo da ureia (R-HSA-70635)	1,4x10 ⁻²	Citrulina, Ornitina, Ácido arginosuccínico, L-Arginina, Adenosina trifosfato (5;22)	NAGS, SLC25A15, ASL, ARG2, ORC1, OTC (6;32)
Metabolismo de poliaminas (R-HSA-351202)	1,37x10 ⁻³	S-Adenosilmetionina, N1-Acetilespermidina, L-Arginina, Ornitina, Espermina, Putrescina (6;21)	RPN2, AMD1, PAOX, PSMD1, PSMB2, PSMD5, PSMB1, PSMD12, PSMA4, PSMB5, AGMAT, AZIN1, PSMB9 (13;80)
Tradução			
Aminoacilação de tRNA (R-HSA-379724)	1,8x10 ⁻¹²	L-Valina, L-Arginina, L-Alanina, L-Tirosina, L-Isoleucina, L-Triptofano, L-Asparagina, L-Glutamina, L-Prolina, Adenosina trifosfato, L-Fenilalanina, L-Leucina, L-Lisina, L-Histidina (14;26)	SARS, DARS2, KARS, SAR1A, PPA2, RARS2, LARS, AARS2, YARS2, FARSB (10;68)
Processamento de tRNA			
Modificação de tRNA no núcleo e citosol (R-HSA-6782315)	4,23x10 ⁻²	S-Adenosilmetionina, Ácido pirúvico, Ácido succínico, Adenosina trifosfato (4;29)	ADAT2, TYW3, TP53RK, TYW5, KIAA1456, THG1L, ADAT1, TRDMT1 (8;72)
Transporte transmembrana mediado por SLC			
Transporte de cátions/ânions inorgânicos, aminoácidos/oligopeptídeos (R-HSA-425393)	2,46x10 ⁻¹¹	L-Valina, L-Arginina, L-Alanina, L-Tirosina, Ácido pirúvico, S-Adenosilmetionina, L-Isoleucina, Ornitina, L-Triptofano, L-Asparagina, L-Glutamina, L-Prolina, L-Fenilalanina, L-Leucina, L-Lisina, L-Histidina (17;60)	SLC9A7, SLC6A15, CTNS, SLC38A1, SLC15A2, SLC12A6, SLC36A4, SLC17A6, SLC17A5, SLC25A10, SNX12, SLC1A5, LAT2, SLC4A8, SLC9A2 (31;167), SLC7A1 ^a , SLC7A2 ^a , SLC25A12 ^a
Transporte de sais de bile e ácidos orgânicos, íons metálicos e compostos de amina (R-HSA-425366)	1,26x10 ⁻⁰⁸	L-Valina, L-Arginina, L-Alanina, L-Tirosina, Ácido pirúvico, L-Isoleucina, L-Triptofano, Ácido succínico, L-Asparagina, L-Glutamina, L-Prolina, Espermina, L-Fenilalanina, L-Leucina, L-Lisina, L-Histidina (16;79)	RUNX1, EMB, SLC30A5, SLC6A9, SLC31A1, SLC6A15, SLC11A1, SLC14A1, SLC16A1, SLC30A6, SLC22A15, SLC14A2, SLC10A6, SLC30A7, SLC16A7, DDI2, SLC39A6, SLC5A7, SLC6A5, SLC5A3, SLC30A10, SLC40A1, SLC44A1, SLC22A1, SLC22A3, SLC47A1, SLC22A5, RHCG, SIT1, (29;165)
^a Metabólitos e alvos putativos curados manualmente relacionados com a via metabólica, porém ausentes no Reactome			

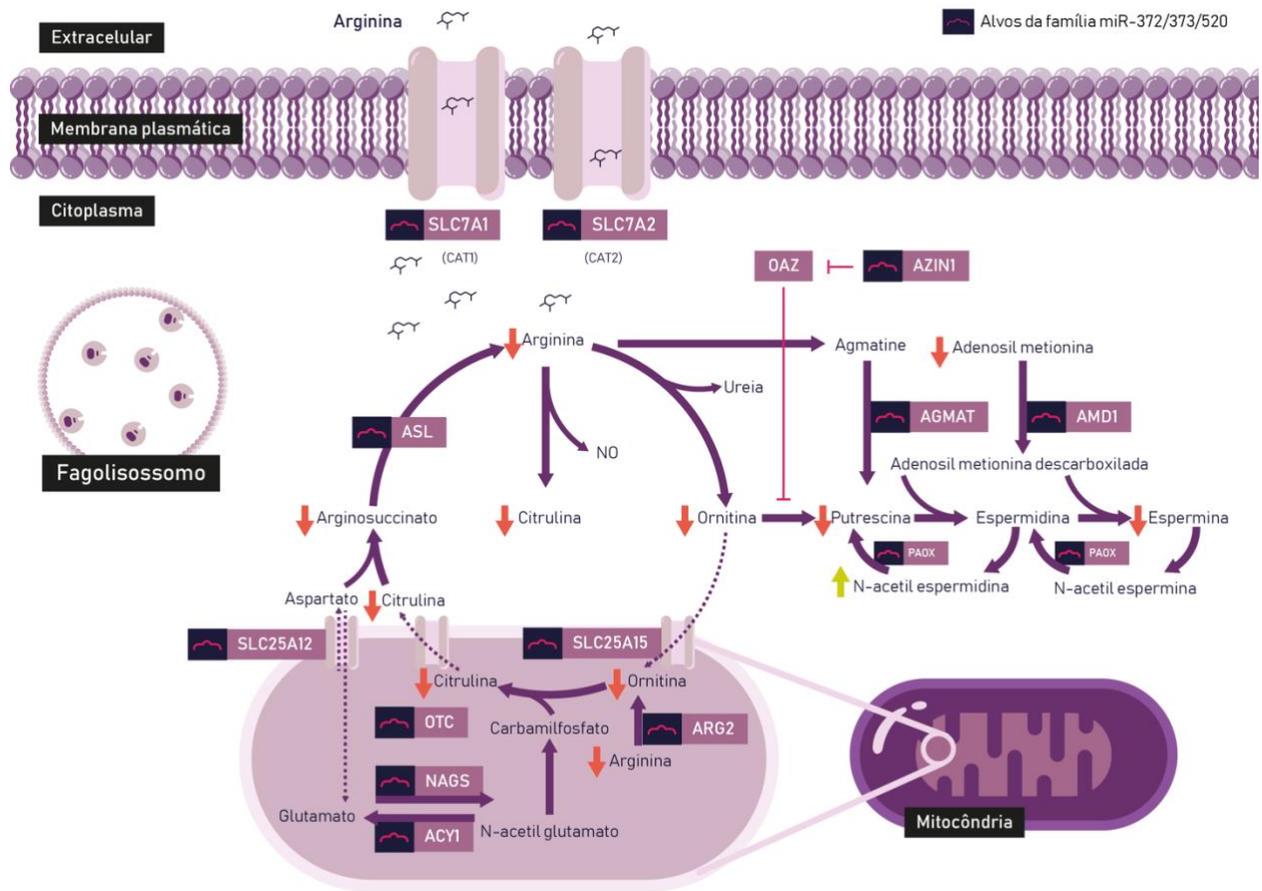


Figura 28 - Via de metabolismo de arginina tem alvos putativos de modulação pelos miR-372, miR-373 e miR-520d. ACY1: aminoacilase 1, AGMAT: agmatinase, AMD1: S-adenosilmetionina descarboxilase, ARG: arginase, ASL: arginossuccinato liase, AZIN1: inibidor de antianzima 1, NAGS: N-acetil glutamato sintase, OTC: ornitina transcarbamilase, PAOX: N1-acetil espermina/espermidina oxidase peroxissomal, SLC25A12: *solute carrier family 25 member 12*, SLC25A15: *solute carrier family 25 member 15*, SLC7A1: *solute carrier family 7 member 1* and SLC7A2: *solute carrier family 7 member 2*. Produzido pelo próprio autor.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos modelos usados

Estudos com macrófagos derivados de monócitos THP-1 utilizam diferentes protocolos de diferenciação resultando em células com marcadores fenotípicos variados (Aldo *et al.* 2013). Por esse motivo, as células THP-1 resultantes do protocolo que foi utilizado foram caracterizadas e observamos o aumento da expressão de CD11b (Figura 6b), mas não de CD14 (Figura 6a), similar ao que foi visto em painéis caracterizando a linhagem antes e após a diferenciação (Mittar *et al.* 2011). No entanto, alguns estudos reportam aumento de CD14 em macrófagos THP-1 diferenciados após tratamento com PMA em concentrações de 20 a 100ng/mL (Starr *et al.* 2018; Jimenez-Duran *et al.* 2020). Essa diferença se deve, além de diferentes protocolos de diferenciação, ao regime de cultivo das células, uma vez que culturas mantidas em baixa densidade não induzem CD14 após diferenciação com PMA (Aldo *et al.* 2013). A ausência de indução de CD14 (Figura 6a), no entanto, pode afetar a resposta dos macrófagos a LPS, uma vez que essa molécula se associa a TLR4.

Neste estudo, utilizamos *L. amazonensis* M2269 selvagem e nocaute de arginase. Dado que o crescimento da promastigota nocaute de arginase é reduzido *in vitro* (Laranjeira-Silva *et al.* 2012), nós caracterizamos o crescimento dos parasitas utilizando o protocolo de cultivo estabelecido no laboratório, com suplementação de 0,1 μ M de putrescina. Nosso grupo demonstrou anteriormente que adição de 10 μ M, 30 μ M e 50 μ M de putrescina ao cultivo igualou o crescimento de *La*-WT e *La-arg* (Laranjeira-Silva *et al.* 2012). No entanto, na concentração utilizada, observamos que *La-arg* mantém a fase estacionária com maior concentração de parasitas (Figura 7). Como esperado, *La*-ARG não é expressa nos parasitas nocautes, enquanto observamos aumento do transcrito em amastigotas selvagens infectando macrófagos por 24 horas, comparado com as 4 horas de infecção (Figura 8).

Neste estudo, utilizamos promastigotas axênicas de ambas as linhagens no dia 7 da curva de crescimento e realizamos a infecção com MOI 5 em macrófagos THP-1. Nossos dados mostram que *La*-WT tem maior índice de infecção em 24, 48 e 72 horas, após a infecção, mas é fagocitada igualmente após 4 horas de infecção (Figura 9),

indicando que o metabolismo de arginina do parasita não é importante para a entrada do parasita no macrófago, mas é importante para o estabelecimento da infecção em seus períodos iniciais. Esses resultados corroboram os achados do nosso grupo em BMDMs murinos, mostrando que *La-arg* é menos infectiva que *La-WT* após 24, 48 e 72 horas, mas é fagocita igualmente após 4 horas de infecção (Laranjeira-Silva 2012). O mesmo comportamento é observado na infecção por *L. major* nocaute de arginase (Gaur *et al.* 2007).

5.2 Modulação de miRNAs na infecção por *Leishmania*

Utilizamos o modelo de macrófagos THP-1 para investigar o perfil de miRNAs após 4 e 24 horas da infecção por *La-WT* e *La-arg*. O modelo THP-1 para este estudo é interessante uma vez que macrófagos THP-1 e hMDMs polarizados com citocinas e/ou padrões moleculares de patógenos *in vitro* modulam miRNAs de maneira semelhante (Graff *et al.* 2012).

Nossos resultados mostram que, dos 84 miRNAs investigados neste estudo, *La-WT* e *La-arg* modulam 8 miRNAs de THP1 após 4h de infecção (Tabela 4). Os miRNAs induzidos durante a infecção diferem daqueles induzidos por estímulos de polarização clássicos (Graff *et al.* 2012), indicando que os mecanismos de modulação durante a infecção por *Leishmania* são específicos.

Os miRNAs identificados diferem daqueles observados no estudo pioneiro de Lemaire *et al.* 2013, que investigou a modulação de miRNAs em macrófagos primários humanos infectados por *L. major* (Lemaire *et al.* 2013). No entanto, o uso de RNA-seq dificulta a comparação dos resultados com a técnica de RT-qPCR array no nosso estudo. Essa escolha pode ser limitante por não investigar todas as possibilidades, mas também auxilia na identificação da modulação de miRNAs relevantes e relacionados com a resposta imune.

De fato, nosso grupo e colaboradores utilizaram a técnica de RT-qPCR array para identificar a modulação de miRNAs em outros estudos, e observamos similaridades nos diferentes modelos de infecção estudados. Nosso grupo identificou o aumento da expressão de miR-294 (Muxel *et al.* 2017) em BMDM de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis*. Nas figuras 9 e 10 destacamos a modulação dos miRNAs miR-372, miR-373, miR-520d, miR-302a e miR-302c em THP-1. Esses miRNAs apresentam a

mesma sequência *seed*, responsável pelo reconhecimento dos mRNAs-alvo, dos miR-302d e miR-294 demonstrados em modelo murino. Ainda, o *cluster* miR-372-373 humano é homólogo ao cluster miR-294-295 de camundongos, e os miRNAs podem ser considerados equivalentes (Hertel *et al.* 2006). O *cluster* miR-302 é conservado em humanos e camundongos, e nós observamos anteriormente a modulação positiva de miR-302d na infecção de macrófagos murinos por *L. amazonensis* (Fernandes *et al.* 2019b).

Também demonstramos anteriormente em trabalhos em colaboração que a infecção de macrófagos THP-1 com *L. braziliensis* regula positivamente miR-372, miR-302a e miR-302b após 6h e 24h e miR-520d após 24h de infecção (Souza *et al.* 2021). O estudo também demonstrou que miR-373 e miR-302c estão regulados positivamente no plasma de pacientes com cura espontânea de leishmaniose cutânea comparado com indivíduos saudáveis (Souza *et al.* 2021). Ainda, a infecção de THP-1 com *L. infantum* modula positivamente os miR-302b, miR-372 e miR-373 após 6 e 24 horas de infecção e miR-302a é modulado positivamente após 6 horas e negativamente após 24 horas de infecção (Ramos-Sanchez *et al.* 2022). Além disso, os miR-372, miR-372, miR-520d e miR-302a/b estão aumentados no soro de pacientes com leishmaniose visceral ativa comparada com o soro de indivíduos saudáveis (Ramos-Sanchez *et al.* 2022).

Para validar a expressão dos miRNAs da família miR-302/372/373/520, realizamos RT-qPCR e observamos que apenas os miR-372, miR-373 e miR-520d foram regulados positivamente após 4 e 24 horas de infecção por *La*-WT, enquanto miR-302a e miR-302c não foram significativos (Figura 12). Por outro lado, *La-arg* é capaz de induzir os miR-372/373/520 apenas após 4 horas de infecção, mas não sustenta até as 24 horas (Figura 12). Esses resultados corroboram os dados de que o miRNA murino miR-294 é regulado positivamente de forma similar após 4 horas de infecção por ambos *La*-WT e *La-arg*, enquanto após 24 horas, *La-arg* é incapaz de sustentar a elevação de miR-294 (Muxel *et al.* 2017). Dado que a abundância de miRNAs pode ser controlada pela sua produção e degradação e que meia vida de miRNAs mais abundantes é de pouco mais de 10 horas (Reichholf *et al.* 2019), as diferenças observadas após 24 horas de infecção devem ser resultantes de uma continuidade na indução da expressão desses miRNAs.

Nosso estudo não foi capaz de desvendar os mecanismos moleculares da indução desses miRNAs, mas as diferenças observadas na infecção de *La*-WT e *La*-arg (Figura 12) indicam que o metabolismo de arginina do parasita pode estar envolvido com a modulação de miRNAs do hospedeiro. Além do metabolismo de arginina, promastigotas e amastigotas de *La*-WT e *La*-arg têm diferenças na expressão de importantes fatores de virulência, como GP63 e lipofosfoglicano (LPG) (Aoki *et al.* 2019), que poderiam ser responsáveis pela contínua sinalização de indução dos miR-372/373/520.

Por outro lado, o miR-548d, validado nos estudos em colaboração na infecção de macrófagos THP-1 com *L. braziliensis* e *L. infantum*, não foi detectado neste estudo na infecção por *L. amazonensis* (Tabela 4) (Souza *et al.* 2021; Ramos-Sanchez *et al.* 2022).

Essas evidências corroboram a tese de que, mesmo com a regulação de distintos miRNAs, a regulação positiva de miRNAs contendo a sequência *seed* AAGUGCU é um mecanismo conservado na interação de diferentes espécies de hospedeiro e *Leishmania*, incluindo na infecção por espécies viscerotrópicas, e é consistente *in vitro* e *in vivo*.

Dado que miR-372 e miR-373 pertencem a um mesmo *cluster*, também nos interessou investigar se a razão da diferença dos níveis dos miRNAs maduros (Figura 11) pode ser observada nos transcritos intermediários da biogênese. É sabido que miRNAs de um mesmo *cluster* podem ter regulações transcricionais, utilizando promotores distintos (Rose *et al.* 2021), ou pós-transcricionais que permitem que, apesar de sua transcrição policistrônica, apenas alguns de seus membros sejam expressos a nível de miRNA maduro (Yu *et al.* 2006). A análise de precursores não mostrou modulação diferencial dos pri-miR-372/373 ou pre-miR-372/373 (Figura 13). Ainda, o lncRNA C19MC-HG, que abriga o miR-520d, não foi diferencialmente expresso no transcriptoma de THP-1 infectada com *L. amazonensis* (Fernandes *et al.* 2023). A ausência de modulação dos pri- e pre-miRNAs quantificados pode ter ocorrido devido ao fato de que o processo de biogênese dos miRNAs é completado rapidamente (Reichholf *et al.* 2019). Ainda, o processamento de miRNAs pode ocorrer de forma cotranscricional (Louloupi *et al.* 2017), sendo, nesse caso, possível detectar diferenças apenas nos miRNAs maduros (Figura 12).

5.3 A família de miRNAs miR-372/373/520d

A *seed* AAGUGCU está presente em 28 miRNAs humanos (Zhou *et al.* 2017b). Essa sequência foi denominada oncomotivo em um estudo que avaliou bibliotecas de expressão de miRNAs e identificou que miRNAs contendo essa sequência em sua *seed*, dentre eles miR-372, miR-373, miR-519c e miR-520c, foram capazes de aumentar a proliferação de uma linhagem de câncer de pulmão (*non-small-cell lung carcinoma*, NSCLC) interferindo com reguladores do ciclo celular (Zhou *et al.* 2017b). Outros estudos também demonstraram a alta expressão da família de miRNAs em outros tipos de câncer, como hepatoblastoma (Cairo *et al.* 2010) e câncer gástrico (Zhang *et al.* 2013a). Por outro lado, miR-520c e miR-373 atuam como supressores de tumor em câncer de mama, inibindo RELA, TGFBR2 e as citocinas IL-6 e IL-8 (Keklikoglou *et al.* 2012). Em realidade, a ação do miR-373 em estudos de câncer deixa claro que a consequência da ativação de determinados miRNAs depende de contexto (Wei *et al.* 2015).

A *seed* AAGUGCU também é associada a pluripotência, sendo descrita inicialmente em células germinativas e embrionárias, referentes ao *cluster* humano hsa-miR-371-373 e o homólogo murino mmu-miR-290-295 (Wu *et al.* 2014). Este estudo demonstrou que a sequência *seed* é suficiente, ao regular alvos mesmo com diferenças em outras porções dos miRNAs, demonstrando que a transfecção de miR-372-373 em camundongos nocautes para miR-290-295 foi capaz de retomar sua função (Wu *et al.* 2014). Outros estudos demonstraram que os miRNAs humanos miR-302b e miR-372 e murino miR-294 induzem pluripotência em fibroblastos (Subramanyam *et al.* 2011) e os miR-294 e miR-302a murinos estão envolvidos no comprometimento da diferenciação para células tronco epiteliais (Gu *et al.* 2016).

Os miRNAs de interesse também estão implicados na resposta imune. Os miR-302b e miR-372 regulam o transporte de aspartato, glutamato e piruvato na mitocôndria, a produção de IFN- β , CCL5 e TNF- α e fosforilação de IRF-3 durante a resposta imune antiviral em células HEK293 (Yasukawa *et al.* 2020). O miR-302b também é ativado via TLR na infecção de macrófagos alveolares por *P. aeruginosa in vitro* e *in vivo* e foi demonstrado como importante regulador da resposta inflamatória modulando negativamente NF- κ B, IL-1 β , IL-6 e TNF- α , via regulação direta de IRAK4 (Zhou *et al.* 2014). miR-302b também regula negativamente IL-1 β em macrófagos THP-1 durante

inflamação induzida por urato monossódico (MSU) via modulação de IRAK4 (Ma *et al.* 2018).

A sequência do miR-520d está localizada no íntron 20 do maior cluster de miRNAs, encontrado apenas em primatas, chamado C19MC ou *cluster* miR-519/520 (miR-519a-e, 520a-h), que contém aproximadamente 100kb e 49 genes para microRNAs (Bortolin-Cavaille *et al.* 2009; Nguyen *et al.* 2017). Os miRNAs desse cluster são processados a partir dos íntrons de um transcrito não codificante via RNAPol II chamado C19MC-HG (do inglês, *chromosome 19 mega cluster - host gene*) (Bortolin-Cavaille *et al.* 2009). Esse transcrito tem uma regulação complexa envolvendo, em alguns casos, transcrição via RNA polimerase III em sequências Alu que podem funcionar como promotores (Bortolin-Cavaille *et al.* 2009). As análises de expressão desse *cluster* relacionam uma ativação generalizada em células tronco embrionárias e células tronco pluripotentes induzidas (Nguyen *et al.* 2017). Em adultos, o C19MC é expresso somente do alelo paterno pela metilação do promotor do cromossomo materno (Noguer-Dance *et al.* 2010). Dentro do cluster C19MC, aproximadamente 33% dos miRNAs possuem a sequência *seed* AAGUGC, porém somente o miR-520d foi detectado modulado no nosso estudo (Tabela 4).

O C19MC é seguido pelo *cluster* miR-371/372/373 no mesmo cromossomo (Bortolin-Cavaille *et al.* 2009; Keklikoglou *et al.* 2012). A coexpressão de miR-372/373 e miR-520d (Figura 12) vai ao encontro dos estudos que mostram que miRNAs com genes próximos, mesmo quando apresentam promotores independentes, são frequentemente coexpressos (Baskerville e Bartel 2005). Os miR-372 e miR-373 pertencem a um mesmo *cluster* (Yu *et al.* 2006) e são cotranscritos com a ligação de NF- κ B ou Myc em seu promotor (Cairo *et al.* 2010; Zhou *et al.* 2017a). Também foi demonstrado que HIF-1 α é capaz de induzir a expressão dos miRNAs 372-373 indiretamente, via TWIST1 (Loayza-Puch *et al.* 2010).

O *cluster* miR-302/367 (miR-367, miR-302d, miR-302a, miR-302c e miR-302b) está localizado em uma porção intragênica do gene *La-related protein 7* (LARP7) no cromossomo 4 (Barroso-delJesus *et al.* 2008; Gao *et al.* 2015). Mesmo que a indução de miR-302a/c não foi significativa em nossa validação, esse dado é interessante pois

corresponde a um miRNA com *seed* idêntica, validado na infecção por outras espécies de *Leishmania*, em um cromossomo distinto.

Cabe mencionar que o miR-373 foi descrito como um ativador da transcrição de genes com sequências complementares em algumas linhagens celulares tumorais. Porém, como o mecanismo foi específico e não reproduziu em diferentes linhagens (Place *et al.* 2008), neste trabalho investigamos apenas as possíveis funções canônicas de miR-373 na regulação pós-transcricional de genes alvo.

5.4 Estado transcricional de genes relacionados com o metabolismo de arginina em macrófagos THP-1 infectados por *Leishmania* e produção de NO

Não observamos indução, a nível transcricional, de CAT1, CAT2, NOS2, ARG1, ODC, AMD1, SRM e SMS na infecção por *La*-WT (Figura 14). Esses resultados diferem do que foi observado na infecção de macrófagos murinos, em que ambos *La*-WT e *La-arg* induzem o mRNA *Arg1* após 4 horas de infecção e *Cat2* após 4 e 24 horas de infecção, enquanto os mRNAs *Cat1* e *Nos2* são induzidos apenas após 4 horas de infecção por *La*-WT (Muxel *et al.* 2017; Fernandes *et al.* 2019b). Em macrófagos humanos THP-1 e hMDM infectados por 48 horas com *L. donovani*, o transcrito de CAT2 aumenta comparado ao macrófago não infectado (Mandal *et al.* 2017).

Observamos uma pequena indução de nitrito e na porcentagem de células positivas para DAF-FM após 4 horas de infecção, mas não na média de intensidade de fluorescência (Figuras 15 e 16). Da mesma forma, LPS foi incapaz de induzir a produção de NO em THP-1, corroborando estudos anteriores (Ozleyen *et al.* 2021). Em macrófagos murinos, a produção de NO aumenta na infecção por ambos *La*-WT e *La-arg* e permanece aumentada comparado ao macrófago não infectado após 4, 24 ou 48 horas de infecção (Muxel *et al.* 2017). De fato, sabe-se que NOS2 e NO não são induzidos em macrófagos humanos e ocorre intensa repressão epigenética do gene (Gross *et al.* 2014). Por este motivo, questionamos se os mecanismos observados pela ação de miR-294 em macrófagos murinos seriam relevantes na infecção de macrófagos humanos, uma vez que o alvo *Nos2* validado anteriormente (Muxel *et al.* 2017) não é induzido.

5.5 Ação dos miR-372/373/520d na infecção por *Leishmania*

Dado que *La-WT* e *La-arg* induzem os miR-372 e miR-373 de forma similar após 4 horas de infecção (Figura 12) e que esses parasitas são capazes de infectar os macrófagos igualmente nesse período (Figura 9), nossa hipótese é que, como observado em macrófagos murinos (Muxel *et al.* 2017), os miRNAs estejam relacionados com as diferenças na infectividade observadas após 24 horas de infecção (Figura 9).

Para entender se os miRNAs da família miR-372/373/520d podem estar relacionados com a infectividade de *Leishmania* alteramos os níveis de miRNAs maduros livres utilizando oligonucleotídeos complementares inibidores ou mímicos.

Para avaliar o efeito da transfecção de oligonucleotídeos, avaliamos a infecção em macrófagos previamente tratados com o reagente de transfecção e um oligonucleotídeo de sequência aleatória. É esperado que esse oligonucleotídeo não tenha efeito, mas observamos uma pequena redução da infecção em todas as condições testadas (Figura 17). Assim, o controle utilizado na comparação da inibição de miRNAs foi o grupo transfectado com o oligonucleotídeo aleatório (controle negativo). Observamos que a inibição de miR-372 sozinho, mas não miR-373 ou miR-520d, foi capaz de reduzir a infecção. De forma interessante, a inibição conjunta dos 3 miRNAs apresentou um aumento sinérgico dos efeitos observados (Figura 17).

Os efeitos distintos na inibição de um único miRNA podem ocorrer pois miRNAs de uma mesma família podem ter alvos distintos devido a complementariedade adicional de nucleotídeos em sua porção 3' (Broughton *et al.* 2016). Foi demonstrado experimentalmente e matematicamente, baseando-se na termodinâmica do pareamento entre as bases, que os miRNAs da família miR-372/373/520 têm afinidades diferentes por seus alvos por outros determinantes além da *seed* (Hibio *et al.* 2012).

Dado que a inibição conjunta dos miRNAs aproximadamente duplicou os efeitos observados na inibição de apenas miR-372, podemos inferir a existência de um mecanismo cooperativo entre os miRNAs de uma mesma família no desfecho da infecção, e que a ausência de efeito na inibição única de miR-373 e miR-520d poderia ser explicada por um efeito compensatório exercido pelos miRNAs da mesma família que não foram inibidos.

Para avaliar se a inibição de um miRNA pode compensar com a indução do aumento de outro miRNA da mesma família, quantificamos os níveis dos miRNAs e observamos que esse efeito não ocorre (Figura 19).

Por outro lado, quando transfectamos os macrófagos com mímicos dos miRNAs em conjunto, observamos aumento da proporção de macrófagos infectados (Figura 18), indicando que os miRNAs da família miR-372/373/520d são benéficos para a infecção. A ausência de efeito na média de intensidade de fluorescência, por outro lado, pode ocorrer devido a saturação da quantidade de miRNAs em seus alvos, uma vez que a infecção por si só aumenta os níveis desses miRNAs. Outros estudos utilizam mímicos de miRNAs para compensar miRNAs reduzidos durante a infecção. Mesmo miRNAs não pertencentes a uma mesma família podem ter funções complementares na subversão da resposta do macrófago, como demonstrado que a transfecção de mímicos para miR-340 e miR-27a reduz a infectividade de *L. major* (Hamidi *et al.* 2021).

Diferentes modelos de leishmaniose podem apresentar respostas diferentes a miRNAs. Um exemplo é o miR-155, que auxilia na progressão da infecção por *L. major* (Varikuti *et al.* 2021), modelo de leishmaniose cutânea, mas limita a infecção por *L. donovani* em modelo visceral. A família de miRNAs mmu-294 (Muxel *et al.* 2017) ou hsa-373 (Souza *et al.* 2021; Ramos-Sanchez *et al.* 2022), no entanto, como demonstrado por nosso grupo e colaboradores, é um elo comum na infecção de diferentes espécies de parasitas e hospedeiro.

Dado que miRNAs atuam na regulação pós transcricional de mRNAs-alvo, a inibição de miRNAs pode resultar em regulação positiva de mRNAs-alvo, caso o mecanismo seja de degradação do mRNA, ou na regulação positiva somente da proteína. A inibição de apenas 1 miRNA não apresentou regulação a nível de mRNA, mas a inibição em conjunto dos miR-372, miR-373 e miR-520d levou à regulação positiva do mRNA SLC7A2 (que codifica CAT2), tendo duas porções do 3'UTR complementares à *seed* em um pareamento do tipo 7mer-m8 (Figura 20).

Sabe-se que miRNAs podem ter ação direta no nível de proteínas sem afetar a quantidade de mRNAs (Baek *et al.* 2008) ou o efeito a nível proteico pode ser precedido temporalmente do efeito a nível de mRNA (Djuranovic *et al.* 2012). Tipicamente miRNAs que apresentam ação no nível de mRNA alvo também interferem no nível de proteínas

(Baek *et al.* 2008) e alvos com alta expressão podem ter efeito a nível de mRNA (Wang *et al.* 2019).

Para isso, investigamos os níveis de CAT2 a nível proteico por citometria de fluxo. A transfecção de mímicos dos miR-372/373/520 em macrófagos não infectados ou a infecção por *Leishmania* reduziram a expressão proteica de CAT2, indicando que os miRNAs induzidos por *Leishmania* podem atuar na regulação de CAT2 (Figura 21). Estudos em macrófagos THP-1 mostram que a redução do importe de arginina via CAT2 reduz a infecção de *L. donovani* (Mandal *et al.* 2017), porém nossos dados mostram que mesmo com a redução de CAT2 mediada pelos miRNAs mímicos ou induzidos após 4 horas de infecção, a infecção por *L. amazonensis* aumenta, enquanto a inibição de miRNAs aumenta CAT2 e reduz a infecção.

A validação é importante no contexto do 3'UTR pois diferentes miRNAs podem ter sua afinidade modulada dependendo de sequências adjacentes ao sítio da *seed* (Brennecke *et al.* 2005). Por esse motivo, no ensaio de luciferase, observamos que a presença do sítio da posição 1327-1333 do 3'UTR de SLC7A2 no vetor reduz a atividade de luciferase quando transfectado com mímicos dos miR-372/373/520, mas não o sítio da posição 3947-3953 (Figura 22).

Diversos estudos mostraram modulação de miRNAs regulando a produção de NO. O miR-520b tem como alvo direto o mRNA RELA (p65) controlando a resposta inflamatória na arteriosclerose e afetando também a expressão de NOS3 (Yang *et al.* 2021). O miR-146a é induzido por *M. tuberculosis* e impede a produção de NO tendo como alvo TRAF6 (Li *et al.* 2016). Na infecção por *L. amazonensis*, nosso grupo demonstrou que miR-294, miR-721 (Muxel *et al.* 2017), miR-30e e miR-302d (Fernandes *et al.* 2019b) têm como alvo direto a enzima NOS2.

Para entender se NOS2 humana é regulada por miR-372 assim como seu homólogo miR-294 em macrófagos murinos regula *Nos2*, investigamos a sequência 3'UTR no banco de dados TargetScan. Nós identificamos que uma mutação na região de complementariedade da sequência *seed* impede o reconhecimento pelos miRNAs da família miR-372/373/520 e, de fato, não há regulação do mRNA de NOS2 mediante inibição dos miRNAs sozinhos ou em conjunto (Figura 23).

Cerca de 60% dos genes humanos podem ser controlados por miRNAs e, assim como as regiões de fase aberta de leitura, as sequências 3'UTR apresentam pressão seletiva para manutenção desses sítios (Friedman *et al.* 2009). Por exemplo, cerca de 40% dos 3'UTRs alvos dos miR-1 e miR-124 em células humanas são conservados no genoma de camundongo (Lim *et al.* 2005). Dessa forma, miRNAs idênticos em diferentes espécies ou que compartilham sequência *seed* podem ter funções distintas devido a conservação de seu sítio de reconhecimento em mRNAs alvo.

É interessante observar que a expressão simultânea de miRNA e mRNA-alvo são importantes na pressão seletiva e na manutenção do sítio. Um exemplo é o miR-939, específico de primatas, que regula NOS2 humana em hepatócitos (Guo *et al.* 2012), uma vez que o sítio para miR-939 observado no 3'UTR da NOS2 de humanos não é conservado no gene de camundongos, provavelmente por ausência de pressão seletiva.

5.6 Metaboloma de macrófagos infectados com *Leishmania* e a relação com miRNAs e seus mRNAs-alvo

A metabolômica é uma área pouco explorada no estudo das leishmanioses, apesar de ser uma técnica importante para entender o *status* fisiológico do parasita ou do macrófago infectado, uma vez que importantes mecanismos pós transcricionais e pós traducionais controlam o metabolismo (Kloehn *et al.* 2015; Tounta *et al.* 2021). Ainda, apesar de comumente usada na descoberta de biomarcadores, a metabolômica é uma ferramenta para a descoberta de mecanismos biológicos (Johnson *et al.* 2016).

Neste estudo, utilizamos metabolômica baseada em espectrometria de massas para estimar a média e significância das mudanças nos níveis de metabólitos em macrófagos não infectados e infectados, com ou sem a inibição de miRNAs. A abordagem da metabolômica é importante para entender o fenótipo das células, uma vez que o nível dos mRNAs e proteínas quantificadas podem não refletir o nível de atividade enzimática.

Após confirmar a estabilidade instrumental pelo agrupamento das amostras de controle de qualidade (Figura 24), realizamos diferentes análises estatísticas multivariantes (Figura 25). De forma geral, os modelos PCA e PLS-DA para as diferentes técnicas utilizadas foram capazes de separar amostras de macrófagos não infectados e macrófagos infectados, mas não os grupos tratados com oligonucleotídeos (NC ou miR), que agruparam com o grupo apenas infectado. Isso ocorre pois PCA é uma técnica não

supervisionada, e a magnitude das alterações detectadas nas diferentes técnicas utilizadas não foi suficiente para a diferenciação dos grupos. Observamos melhor separação nos modelos supervisionados PLS-DA de CE e HILIC em polaridade positiva, indicando que metabólitos catiônicos foram modulados significativamente de forma a permitir a separação entre grupos (Figura 25), enquanto os modelos PLS-DA dos dados obtidos em polaridade negativa não separa os grupos devido ao baixo número de analitos aniônicos diferencialmente expressos.

Os modelos de OPLS-DA avaliados aos pares forneceram dados complementares aos obtidos na estatística univariante. Dessa forma, os metabólitos significativos também foram avaliados quanto ao poder discriminatório nos modelos multivariantes. Neste estudo, identificamos aproximadamente 550 analitos diferencialmente expressos (dados não mostrados), ou seja, apresentam $p < 0,05$ após a correção de FDR, dos quais aproximadamente 100 metabólitos putativos foram identificados (Tabela 5 e 6).

Poucos estudos avaliaram alterações no metaboloma após interferência em moduladores pós-transcricionais, são exemplos os estudos avaliando as funções dos miR-155, miR-124 e miR-125b (Tili *et al.* 2012; Kim *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2017). No nosso estudo, observamos modulação de centenas de metabólitos a partir da inibição de miRNAs, mostrando que essas moléculas, ao interferirem no nível de mRNAs ou sua tradução, podem alterar a ativação de vias metabólicas (Tabela 6).

Nosso objetivo foi investigar sistematicamente se a inibição combinatória de miRNAs leva a alterações metabólicas que podem explicar como a infectividade é afetada pela ação de miRNAs. Mudanças mais significativas ocorreram no metabolismo de arginina (Figura 26). Enquanto a infecção promoveu a produção de poliaminas, a inibição de miRNAs reduziu arginina e diversos metabólitos que participam da via de produção de poliaminas. Nossos resultados demonstram redução da produção de poliaminas e vias relacionadas à proteção ao estresse oxidativo mediante a inibição de miR-372/373/520, indicando que os miRNAs são importantes mediadores nessas vias metabólicas.

Sendo assim, nossos dados de metabolômica são consistentes com a literatura, apontando que as poliaminas são essenciais para a infectividade de *Leishmania* (Muxel *et al.* 2018b), uma vez que a interferência na produção de poliaminas do parasita ou macrófago reduzem o crescimento do mesmo (Muxel *et al.* 2018b). Ainda, já que

espermidina é o substrato para a produção de tripanotiona, também observamos redução desse metabólito, fator que pode contribuir para a infectividade reduzida, já que a tripanotiona é um importante fator protetor para o parasita e sua redução facilita a eliminação da infecção (Ali *et al.* 2022).

Nosso estudo corrobora outros estudos que investigam esses metabólitos. Um estudo recente identificou aumento dos níveis de ornitina e citrulina, mas não arginina, em pacientes com leishmaniose cutânea difusa (Malta-Santos *et al.* 2020). O aumento de ornitina, citrulina e putrescina também foi mostrado na infecção por *L. amazonensis* em BMDMs de BALB/c e C57BL/6 (Muxel *et al.* 2019; Mamani-Huanca *et al.* 2021b). No entanto, não detectamos aumento de arginina intracelular, prolina e s-adenosil metionina na infecção de macrófagos humanos (Figura 3).

Na infecção de *L. donovani* em macrófagos THP-1 ocorre aumento de putrescina e espermidina (Mandal *et al.* 2017), enquanto nossos dados apontam que *L. amazonensis* aumenta putrescina e espermina (Figura 26). Outro fator de atenção ao comparar os dois modelos, é que este estudo demonstra que siRNA ou inibição química de CAT2 reduzem a tomada de arginina, produção de poliaminas e sobrevivência de *L. donovani* em macrófagos THP-1 (Mandal *et al.* 2017). Por outro lado, no nosso estudo, os miRNAs induzidos por *L. amazonensis* têm como alvo CAT2 (Figura 21) ao mesmo tempo em que ocorre aumento da produção de poliaminas (Figura 26). Além da diferença das espécies estudadas e da fisiopatologia da doença induzida por ambas, o estudo com *L. donovani* trabalhou com 48 horas após a infecção *in vitro*, enquanto nosso estudo focou nas 4 e 24 horas após a infecção.

O aumento de ornitina, arginosuccinato e citrulina na infecção está em consonância com o perfil metabólico de macrófagos humanos polarizados M2 (Sowers *et al.* 2022). Uma vez que NOS2 não é ativa em macrófagos humanos (Denis 1994; Albina 1995), nos macrófagos M2, o aumento do nível de citrulina pode ser explicado pela atividade de OTC (Sowers *et al.* 2022). OTC faz parte do ciclo da ureia e é um alvo putativo da família miR-372/373/520d (Tabela 7). Por outro lado, nós observamos redução dos níveis de citrulina mediante inibição dos miR-372/373/520d (Figura 26). Foi recentemente demonstrado que macrófagos M1, de humanos e camundongos, diminuem os níveis de citrulina para

ativação pró-inflamatória (Mao *et al.* 2022). Ainda, a citrulina pode levar à produção de ornitina via enzima LACC1 em macrófagos murinos (Wei *et al.* 2022).

De forma interessante, observamos aumento nos níveis de espermidina acetilada (Figura 26 e 27), que pode ser assumida como derivada do hospedeiro já que *Leishmania* não possui a enzima espermidina/espermina-N1-acetiltransferase (SSAT) (Phillips 2018). Acetil espermidina é destinada à degradação ou à exportação (Pegg 2008; Stewart *et al.* 2018) e é um componente importante que controla os níveis de poliaminas nas células. Em infecções virais, interferons do tipo I induzem a atividade de SSAT levando à acetilação de poliaminas e diminuindo a replicação das partículas virais (Mounce *et al.* 2016).

As poliaminas desempenham papéis contraditórios na manutenção da homeostase oxidativa celular, por protegerem contra danos mediados por radicais livres na produção de glutatona e, por outro lado, na produção de ROS via PAOX, que catalisa a oxidação de n-acetil espermidina à putrescina (Stewart *et al.* 2018). A produção de ROS via PAOX é regulada pelo miR-134 e leva ao desenvolvimento de câncer gástrico associado à infecção de *Helicobacter pylori* (Murray-Stewart *et al.* 2016). O acúmulo de acetil espermidina não era esperado, uma vez que PAOX é alvo putativo dos miR-372/373/520 (Tabela 7), e a inibição de miRNAs poderia levar ao aumento dessa enzima e consumo da acetil espermidina como substrato.

Outra possível consequência do consumo de grupos acetil na produção de poliaminas acetiladas é uma regulação metabólico-epigenética que pode alterar o fenótipo dos macrófagos, uma vez que o aumento da acetilação de ácido aspártico, glutamina e ornitina em macrófagos humanos, leva a modulações epigenéticas favoráveis à polarização em perfil M1 devido à redução da acetilação de histonas (Sowers *et al.* 2022).

Como cada miRNA apresenta múltiplos alvos interferindo em diversos mRNAs participantes de uma via, entende-se que essas moléculas são moduladoras importantes do fenótipo (Lim *et al.* 2005). Dado que miRNAs de uma mesma família podem inibir os mesmos alvos, investigamos o enriquecimento de genes alvo da família miR-372/373/520 a partir do banco de dados TargetScan em conjunto com os metabólitos alterados na inibição destes miRNAs em macrófagos infectados (Tabela 7, Figura 28). Os dados de

metabolômica corroboram estudos de transcriptoma de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 que mostrou, entre outras vias, o enriquecimento do metabolismo de arginina após 4 horas de infecção com *L. major* (Dillon *et al.* 2015).

Ainda, a inibição de miRNAs leva à redução de moléculas antioxidantes importantes durante a infecção por *Leishmania*. Observamos que a infecção induziu a produção de cistationina nos macrófagos, enquanto a inibição da família miR-372/373/520d reduziu seus níveis (Tabela 5 e 6). Cistationina pode ser produzida pelo parasita e foi demonstrado como um fator protetor contra o estresse oxidativo na infecção por *L. braziliensis* em macrófagos THP-1 (Romero *et al.* 2015). Além disso, nos macrófagos, cistationina pode inibir a ativação pró-inflamatória por interferência em NF-κB (Zhu *et al.* 2015).

O metabolismo de glutamato e glutamina também foram enriquecidos na nossa análise metabolômica (Tabela 7). Enquanto a infecção aumenta glutamina, a inibição da família miR-372/373/520 diminui seus níveis (Figura 26). Glutamina foi associada com respostas pró-inflamatórias (Bordbar *et al.* 2012). Mecanicamente, metabolômica utilizando ¹³C-glutamina mostrou que a produção de succinato a partir de glutamina promove reprogramação metabólica de macrófagos pela estabilização de HIF-1α (Tannahill *et al.* 2013). Estudos prévios demonstraram que a suplementação de glutamina aumenta a eficácia do tratamento para leishmaniose visceral (Ferreira *et al.* 2020). Ainda, inibição da enzima glutaminase (GLS), que converte glutamina para glutamato, leva ao aumento da susceptibilidade à infecção por *Leishmania* (Ferreira *et al.* 2020). Outros estudos demonstraram que GLS é alvo dos miR-23a/b, mostrando que miRNAs podem controlar o metabolismo de glutamina (Gao *et al.* 2009). Neste estudo, encontramos que a família miR-372/373/520d tem como alvo putativo o gene da glutamina sintetase (GLUL), que realiza a reação na direção contrária (Tabela 7, Figura 28), e está aumentada em macrófagos M1 (Sowers *et al.* 2022).

No entanto, glutamato, que participa na síntese de glutathione em conjunto com cisteína e glicina, foi reduzido durante a infecção, mas não foi alterado com a inibição de miRNAs. Os níveis de glutathione e glutathione dissulfeto foram diminuídos na infecção (Tabela 25).

O alvo predito SLC25A12 (Tabela 7) codifica a lançadeira aspartato-glutamato e é um importante módulo na polarização de macrófagos M1 e produção de NO, ao conectar o TCA ao ciclo da ureia (Jha *et al.* 2015).

Todas essas alterações no metaboloma devem ser levadas em consideração para entender o fenótipo que leva a uma infecção reduzida. Além disso, além de interferir nessas vias relacionadas à sobrevivência de *Leishmania* e já descritas na literatura, nós mostramos alteração na abundância de metabólitos de vias relacionadas com a resposta imune descrita para outros organismos, como o metabolismo de triptofano (Costantini *et al.* 2020) (Tabela 7). Esses resultados podem levar a novos caminhos para entender a implicação dessas vias na patofisiologia das leishmanioses.

5.7 Limitações do estudo, perspectivas e considerações finais

5.7.1 Implicações dos achados de miRNAs

A consistente presença de miR-372, miR-373 e miR-520d neste estudo e no soro de pacientes (Souza *et al.* 2021; Ramos-Sanchez *et al.* 2022) deve chamar a atenção para possíveis mecanismos de ação desse miRNA em outros tecidos, para além da reprogramação direta de macrófagos ou da célula pela qual é produzido. Ainda, o estudo de amostras de pacientes pode evidenciar miRNAs como potenciais biomarcadores. Nesse sentido, miR-361 foi identificado como um marcador de falha ao tratamento com antimônio pentavalente em leishmaniose cutânea e com atraso na cura (Lago *et al.* 2018). No entanto, estudos nesse sentido ainda devem ser validados em novas coortes.

A identificação de uma família específica de miRNAs abre caminhos para a investigação de novas terapias. Diversos tratamentos com oligonucleotídeos antisense estão sendo testados como terapias, principalmente no câncer. No caso específico de miRNAs, é importante que as terapias sejam capazes de suprimir múltiplos miRNAs com sequências e alvos similares, uma vez que existe atividade redundante e que poderia ser facilmente compensada por outros miRNAs caso um deles seja inibido, uma preocupação já discutida na terapia anticâncer (Hamilton *et al.* 2013).

Terapias voltadas ao hospedeiro baseada em miRNAs já foram sugeridas no tratamento de leishmanioses. Estudos em fase inicial de validação *in vitro*, mostraram que a transfecção de mímicos de miR-340 e miR-27a, antes ou após a infecção, é capaz

de reduzir a infectividade de *L. major* via modulação de IL-10 e TGF- β (Hamidi *et al.* 2021). Em modelo visceral, a transfecção *in vivo* do oligonucleotídeo antisense ao miR-146a em camundongos após 28 dias de infecção por *L. donovani* foi capaz de reduzir a carga parasitária no fígado e baço dos animais (Das *et al.* 2021).

No entanto, como as leishmanioses são doenças negligenciadas que afetam principalmente países pobres, abordagens mais caras como o uso de oligonucleotídeos antisense dificilmente seriam viáveis. Para isso, um importante processo seria avaliar a capacidade de moléculas que podem interferir na biogênese de miRNAs, de maneira específica, pela interação com estruturas tridimensionais assumidas pelos pre-miRNAs.

Estudos demonstraram que poliaminas funcionalizadas são capazes de interagir especificamente com pre-miR-372 e pre-miR-373 (Staedel *et al.* 2018), impedindo sua maturação. O composto mais ativo é um conjugado de espermina-amidina capaz de impedir o processamento de miR-372 e miR-373 via DICER por ligação na estrutura de grampo do miRNA precursor (Staedel *et al.* 2018). Esse achado abre espaço para a investigação também de poliaminas endógenas, uma vez que essas moléculas são capazes de se ligar e determinar a estrutura terciária de RNAs (Lightfoot e Hall 2014). O tratamento de células de adenocarcinoma gástrico (AGS) com os compostos foi efetivo em inibir sua proliferação via inibição da maturação de miR-372, que atua como um oncogene regulando o gene LATS2 (Becquart *et al.* 2018).

Um potencial avanço para este trabalho de tese, portanto, seria o uso de análogos de poliaminas, que poderiam ser organizadas em vesículas de nanopartículas autoestruturantes. Em câncer já se usa a entrega de análogos de poliaminas antitumorais por essa via em conjunto com o mímico miR-34a (Xie *et al.* 2017).

5.7.2 Limitações da abordagem de metabolômica utilizada

Na área das ômicas, são crescentes os estudos com metodologia “célula única”. O campo está em fases iniciais na área das leishmanioses, mas deve ser considerado uma vez que são encontrados transcritos de *L. major* em 20 tipos celulares (Venugopal *et al.* 2021). A combinação de estudos *in vivo* em modelo murino experimental e amostras de pacientes com técnicas ômicas, incluindo potencialmente a metabolômica de célula única, podem trazer informações sobre a complexa rede de interação parasita-

hospedeiro. Alguns autores denominaram o metaboloma de células infectadas como cometaboloma (Fernández-García *et al.* 2020), uma vez que, atualmente, os estudos são incapazes de distinguir a contribuição de metabólitos do parasita e do hospedeiro (Tounta *et al.* 2021), problema devido à constante troca de metabólito entre as células e compartimentos celulares.

O uso de multiômicas pode ajudar a entender a regulação metabólica diferencial do parasita e hospedeiro, uma vez que a técnica de *dual-transcriptomics* permite o alinhamento e anotação de transcritos de ambos (Fernandes *et al.* 2016).

No nosso estudo, para entender o metabolismo de arginina, que ocorre no citoplasma e na mitocôndria (Haskins *et al.* 2021), seria interessante o uso de ¹³C-arginina e sua localização nos compartimentos intracelulares, como realizado para o metabolismo de glicose em BMDM (Puchalska *et al.* 2018). Ainda, estudos anteriores demonstraram que o tempo após o estímulo é importante para a determinação da resposta metabólicas (Zhu *et al.* 2019) e nossos resultados se beneficiariam de mais pontos temporais para entender melhor os processos estudados.

6 CONCLUSÕES

A infecção inicial por *L. amazonensis* altera o perfil de miRNAs de macrófagos humanos THP-1, regulando positivamente os miR-372, miR-373 e miR-520d no período de entrada e estabelecimento da infecção. A cepa nocaute de arginase (*La-arg*) é menos infectiva e não sustenta a modulação desses miRNAs no período de estabelecimento da infecção. Confirmamos que a família miR-372/373/520d atua em conjunto como um importante fator para a infectividade de *L. amazonensis*. Por corroborar dados publicados anteriormente, este estudo apresenta, portanto, mais uma evidência da importância de miRNAs contendo a sequência *seed* AAGUGCU.

Os miR-372/373/520d não têm o mRNA de NOS2 como alvo devido a uma mutação no 3'UTR observado no gene humano comparado com a sequência do mRNA *Nos2* murino complementar à *seed*. Na infecção de macrófagos humanos, NOS2 e NO não são induzidos em níveis significativos como ocorre em camundongos. Validamos o transportador de aminoácidos catiônicos CAT2 como alvo dos miR-372/373/520d por conter, no 3'UTR do mRNA, sequências complementares à *seed*.

A infecção por *L. amazonensis* aumenta a produção de poliaminas em macrófagos THP-1, mas essa modulação não é evidente a nível transcricional. Por outro lado, quando a infecção ocorre na ausência de miR-372/373/520d funcionais, a reprogramação metabólica é afetada e impede a produção de poliaminas e tripanotona. De modo geral, nossos resultados apontam para um cenário no qual a família miR-372/373/520d pode interagir com múltiplos alvos moleculares promovendo, dentre outras vias, a modulação do ciclo da ureia e produção de poliaminas.

REFERÊNCIAS

- Åbrink M, Gobl AE, Huang R, Nilsson K, Hellman L. Human cell lines U-937, THP-1 and Mono Mac 6 represent relatively immature cells of the monocyte-macrophage cell lineage. *Leukemia*. 1994.
- Acuña SM, Aoki JI, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Fernandes JCR, Muxel SM, et al. Arginase expression modulates Nitric Oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS One*. 2017;
- Acuña SM, Zanatta JM, Bento C de A, Floeter-Winter LM, Muxel SM. miR-294 and miR-410 Negatively Regulate Tnfa, Arginine Transporter Cat1/2, and Nos2 mRNAs in Murine Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*. *Noncoding RNA*. 2022;
- Adati N, Huang MC, Suzuki T, Suzuki H, Kojima T. High-resolution analysis of aberrant regions in autosomal chromosomes in human leukemia THP-1 cell line. *BMC Res Notes*. 2009;
- Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife*. 2015;
- Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. Bañuls AL, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;
- Akpunarlieva S, Weidt S, Lamasudin D, Naula C, Henderson D, Barrett M, et al. Integration of proteomics and metabolomics to elucidate metabolic adaptation in *Leishmania*. *J Proteomics*. 2017;
- Albina JE. On the expression of nitric oxide synthase by human macrophages. Why no NO? *J Leukoc Biol*. 1995;
- Aldo PB, Craveiro V, Guller S, Mor G. Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2013 Jul;
- Ali V, Behera S, Nawaz A, Equbal A, Pandey K. Unique thiol metabolism in trypanosomatids: Redox homeostasis and drug resistance. *Adv Parasitol*. 2022;
- Aoki JI, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, Floeter-Winter LM. The impact of arginase activity on virulence factors of *Leishmania amazonensis*. *Curr Opin Microbiol*. 2019;

- Aoki JI, Muxel S, Zampieri R, Acuña S, Fernandes J, Vanderlinde R, et al. L-arginine availability and arginase activity: characterization of amino acid permease 3 in *Leishmania amazonensis*. PLoS Negl Trop Dis. 2017a;.
- Aoki JI, Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Müller KE, Nerland AH, et al. Dual transcriptome analysis reveals differential gene expression modulation influenced by *Leishmania* arginase and host genetic background. Microb Genom. 2020;
- Aoki JI, Muxel SM, Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Müller KE, Nerland AH, et al. RNA-seq transcriptional profiling of *Leishmania amazonensis* reveals an arginase-dependent gene expression regulation. PLoS Negl Trop Dis. 2017b;.
- Atan NAD, Koushki M, Ahmadi NA, Rezaei-Tavirani M. Metabolomics-based studies in the field of *Leishmania*/leishmaniasis. Alexandria Journal of Medicine. 2018;
- Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. Experientia. 1991;
- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. Nature. 2008;
- Barilli A, Rotoli BM, Visigalli R, Bussolati O, Gazzola GC, Dall'Asta V. Arginine transport in human monocytic leukemia THP-1 cells during macrophage differentiation. J Leukoc Biol. 2011;
- Barroso-delJesus A, Romero-López C, Lucena-Aguilar G, Melen GJ, Sanchez L, Ligeró G, et al. Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. Mol Cell Biol. 2008;
- Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. RNA. 2005;
- Basselin M, Coombs GH, Barrett MP. Putrescine and spermidine transport in *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 2000;
- Basu NK, Kole L, Ghosh A, Das PK. Isolation of a nitric oxide synthase from the protozoan parasite, *Leishmania donovani*. FEMS Microbiol Lett. 1997 Nov 1;156(1):43–7.
- Bates PA. Revising *Leishmania*'s life cycle. Nat Microbiol. 2018;
- Becquart C, le Roch M, Azoulay S, Uriac P, di Giorgio A, Duca M. Exploring Heterocycle-Spermine Conjugates as Modulators of Oncogenic microRNAs Biogenesis. ACS Omega. 2018;

- Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 2010;
- Bofill-De Ros X, Yang A, Gu S. IsomiRs: Expanding the miRNA repression toolbox beyond the seed. *Biochim Biophys Acta.* 2020;
- Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* 2004;
- Boitz JM, Gilroy CA, Olenyik TD, Paradis D, Perdeh J, Dearman K, et al. Arginase is essential for survival of *Leishmania donovani* promastigotes but not intracellular amastigotes. *Infect Immun.* 2017;
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;
- Bordbar A, Mo ML, Nakayasu ES, Schrimpe-Rutledge AC, Kim YM, Metz TO, et al. Model-driven multi-omic data analysis elucidates metabolic immunomodulators of macrophage activation. *Mol Syst Biol.* 2012;
- Bortolin-Cavaille ML, Dance M, Weber M, Cavaille J. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res.* 2009;
- Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann Transl Med.* 2016;
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLoS Biol.* 2005;
- Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Mol Cell.* 2016;
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet.* 2018;
- Cairo S, Wang Y, de Reyniès A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, et al. Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;
- Camargo EP, Coelho JA, Moraes G, Figueiredo EN. *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp. and *Leptomonas* spp.: Enzymes of ornithine-arginine metabolism. *Exp Parasitol.* 1978;

- Carneiro MB, Lopes ME, Hohman LS, Romano A, David BA, Kratofil R, et al. Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early *Leishmania* Infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. *Cell Host Microbe*. 2020;
- Carneiro MB, Peters NC. The Paradox of a Phagosomal Lifestyle: How Innate Host Cell-*Leishmania amazonensis* Interactions Lead to a Progressive Chronic Disease. *Front Immunol*. 2021;
- Castilho-Martins EA, Canuto GAB, Muxel SM, daSilva MFL, Floeter-Winter LM, del Aguila C, et al. Capillary electrophoresis reveals polyamine metabolism modulation in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* wild-type and arginase-knockout mutants under arginine starvation. *Electrophoresis*. 2015;
- Castilho-Martins EA, da Silva MFL, dos Santos MG, Muxel SM, Floeter-Winter LM. Axenic *Leishmania amazonensis* promastigotes sense both the external and internal arginine pool distinctly regulating the two transporter-coding genes. *PLoS One*. 2011.
- Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;
- Colineau L, Lambert U, Fornes O, Wasserman WW, Reiner NE. c-Myc is a novel *Leishmania* virulence factor by proxy that targets the host miRNA system and is essential for survival in human macrophages. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;
- Colotti G, Ilari A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids*. 2010;
- Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M. Arginase Induction by Suppressors of Nitric Oxide Synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in Murine Bone-Marrow-Derived Macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995.
- Costantini C, Bellet MM, Renga G, Stincardini C, Borghi M, Pariano M, et al. Tryptophan Co-Metabolism at the Host-Pathogen Interface. *Front Immunol*. 2020;
- Crepaldi F, de Toledo JS, do Carmo AO, Ferreira Marques Machado L, de Brito DDV, Serufo AV, et al. Mapping Alterations Induced by Long-Term Axenic Cultivation of *Leishmania amazonensis* Promastigotes With a Multiplatform Metabolomic Fingerprint Approach. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;
- Das S, Mukherjee S, Ali N. Super enhancer-mediated transcription of miR146a-5p drives M2 polarization during *Leishmania donovani* infection. *PLoS Pathog*. 2021;

- Denis M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? *J Leukoc Biol.* 1994;
- Dillon LAL, Suresh R, Okrah K, Bravo HC, Mosser DM, El-Sayed NM. Simultaneous transcriptional profiling of *Leishmania major* and its murine macrophage host cell reveals insights into host-pathogen interactions. *BMC Genomics.* 2015;
- Diotallevi A, de Santi M, Buffi G, Ceccarelli M, Vitale F, Galluzzi L, et al. *Leishmania* infection induces MicroRNA hsa-miR-346 in human cell line-derived macrophages. *Front Microbiol.* 2018;
- Djuranovic S, Nahvi A, Green R. miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science.* 2012;
- Dowling JK, Afzal R, Gearing LJ, Cervantes-Silva MP, Annett S, Davis GM, et al. Mitochondrial arginase-2 is essential for IL-10 metabolic reprogramming of inflammatory macrophages. *Nat Commun.* 2021;
- Erdely A, Kepka-Lenhart D, Clark M, Zeidler-Erdely P, Poljakovic M, Calhoun WJ, et al. Inhibition of phosphodiesterase 4 amplifies cytokine-dependent induction of arginase in macrophages. *American Journal of Physiology.* 2006;
- Eren RO, Reverte M, Rossi M, Hartley MA, Castiglioni P, Prevel F, et al. Mammalian Innate Immune Response to a *Leishmania*-Resident RNA Virus Increases Macrophage Survival to Promote Parasite Persistence. *Cell Host Microbe.* 2016;
- Fernandes JCR, Acuña SM, Aoki JI, Floeter-Winter LM, Muxel SM. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Noncoding RNA.* 2019a;.
- Fernandes JCR, Aoki JI, Maia Acuña S, Zampieri RA, Markus RP, Floeter-Winter LM, et al. Melatonin and *Leishmania amazonensis* Infection Altered miR-294, miR-30e, and miR-302d Impacting on Tnf, Mcp-1, and Nos2 Expression. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019b;.
- Fernandes JCR, Gonçalves ANA, Floeter-Winter LM, Nakaya HI, Muxel SM. Comparative transcriptomic analysis of long noncoding RNAs in *Leishmania*-infected human macrophages. *Front Genet.* 2023;
- Fernandes MC, Dillon LAL, Belew AT, Bravo HC, Mosser DM, El-Sayed NM. Dual transcriptome profiling of *Leishmania*-infected human macrophages reveals distinct reprogramming signatures. *mBio.* 2016;

- Fernández-García M, Rey-Stolle F, Boccard J, Reddy VP, García A, Cumming BM, et al. Comprehensive Examination of the Mouse Lung Metabolome following *Mycobacterium tuberculosis* Infection Using a Multiplatform Mass Spectrometry Approach. *J Proteome Res.* 2020;
- Ferreira C, Mesquita I, Barbosa AM, Osório NS, Torrado E, Beauparlant CJ, et al. Glutamine supplementation improves the efficacy of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020;
- FJ van K, JT van der L, AF A, MJ van Z, WG Q, HG N, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1992.
- Formaglio P, Alabdullah M, Siokis A, Handschuh J, Sauerland I, Fu Y, et al. Nitric oxide controls proliferation of *Leishmania major* by inhibiting the recruitment of permissive host cells. *Immunity.* 2021;
- Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;
- Furtado RR, Soares DC, Prado AF, Farias LHS, da Silva BJM, Rodrigues APD, et al. Constitutive nitric oxide synthase-like enzyme in two species involved in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasitol Int.* 2021;
- Ganguly S, Ghoshal B, Banerji I, Bhattacharjee S, Chakraborty S, Goswami A, et al. *Leishmania* Hijacks microRNA Import-Export Machinery of Infected Macrophage and Survives by Cross-Communicating Host miR-146a to Subjugate HuR and miR-122 in Neighbouring cells. *bioRxiv.* 2021;
- Gannavaram S, Bhattacharya P, Siddiqui A, Ismail N, Madhavan S, Nakhasi HL. miR-21 Expression Determines the Early Vaccine Immunity Induced by LdCen-/- Immunization. *Front Immunol.* 2019;
- Gao P, Tchernyshyov I, Chang TC, Lee YS, Kita K, Ochi T, et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature.* 2009;
- Gao Z, Zhu X, Dou Y. The miR-302/367 cluster: a comprehensive update on its evolution and functions. *Open Biol.* 2015;

- Gatto M, Borim PA, Wolf IR, da Cruz TF, Mota GAF, Braz AMM, et al. Transcriptional analysis of THP-1 cells infected with *Leishmania infantum* indicates no activation of the inflammasome platform. PLoS Negl Trop Dis. 2020;
- Gaur U, Roberts SC, Dalvi RP, Corraliza I, Ullman B, Wilson ME. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. Journal of immunology. 2007;
- Genestra M, Guedes-Silva D, Souza WJS, Cysne-Finkelstein L, Soares-Bezerra RJ, Monteiro FP, et al. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. Arch Med Res. 2006a;
- Genestra M, Souza WJS, Guedes-Silva D, Machado GMC, Cysne-Finkelstein L, Soares Bezerra RJ, et al. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. Arch Microbiol. 2006b;.
- Geraci NS, Tan JC, Mcdowell MA. Characterization of microRNA expression profiles in *Leishmania*-infected human phagocytes. Parasite Immunol. 2015;
- Ghosh J, Bose M, Roy S, Bhattacharyya SN. *Leishmania donovani* targets dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. Cell Host Microbe. 2013;
- Gil de la Fuente A, Godzien J, Fernández López M, Rupérez FJ, Barbas C, Otero A. Knowledge-based metabolite annotation tool: CEU Mass Mediator. J Pharm Biomed Anal. 2018;
- Godzien J, Gil de la Fuente A, Otero A, Barbas C. Metabolite Annotation and Identification. Comprehensive Analytical Chemistry. 2018;
- Goldman-Pinkovich A, Balno C, Strasser R, Zeituni-Molad M, Bendelak K, Rentsch D, et al. An Arginine Deprivation Response Pathway Is Induced in *Leishmania* during Macrophage Invasion. PLoS Pathog. 2016;
- Goldman-Pinkovich A, Kannan S, Nitzan-Koren R, Puri M, Pawar H, Bar-Avraham Y, et al. Sensing host arginine is essential for *Leishmania* parasites' intracellular development. mBio. 2020;

- Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* 2004;
- Goswami A, Mukherjee K, Mazumder A, Ganguly S, Mukherjee I, Chakrabarti S, et al. MicroRNA exporter HuR clears the internalized pathogens by promoting pro-inflammatory response in infected macrophages. *EMBO Mol Med.* 2020;
- Graff JW, Dickson AM, Clay G, McCaffrey AP, Wilson ME. Identifying functional microRNAs in macrophages with polarized phenotypes. *Journal of Biological Chemistry.* 2012;
- Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol Cell.* 2007;
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* 2001;
- Gross TJ, Kremens K, Powers LS, Brink B, Knutson T, Domann FE, et al. Epigenetic Silencing of the Human NOS2 Gene: Rethinking the Role of Nitric Oxide in Human Macrophage Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology.* 2014;
- Gu KL, Zhang Q, Yan Y, Li TT, Duan FF, Hao J, et al. Pluripotency-associated miR-290/302 family of microRNAs promote the dismantling of naive pluripotency. *Cell Res.* 2016.
- Guo Z, Shao L, Zheng L, Du Q, Li P, John B, et al. miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;
- Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Jul 16;
- Hamidi F, Mohammadi-Yeganeh S, Haji Molla Hoseini M, Seyyed Tabaei SJ, Taghipour N, Lasjerdi Z, et al. Inhibition of anti-inflammatory cytokines, IL-10 and TGF- β , in *Leishmania major* infected macrophage by miRNAs: A new therapeutic modality against leishmaniasis. *Microb Pathog.* 2021;

- Hamilton MP, Rajapakshe K, Hartig SM, Reva B, McLellan MD, Kandath C, et al. Identification of a pan-cancer oncogenic microRNA superfamily anchored by a central core seed motif. *Nat Commun.* 2013;
- Hardbower DM, Asim M, Murray-Stewart T, Casero RA, Verriere T, Lewis ND, et al. Arginase 2 deletion leads to enhanced M1 macrophage activation and upregulated polyamine metabolism in response to *Helicobacter pylori* infection. *Amino Acids.* 2016;
- Haskins N, Bhuvanendran S, Anselmi C, Gams A, Kanholm T, Kocher KM, et al. Mitochondrial Enzymes of the Urea Cycle Cluster at the Inner Mitochondrial Membrane. *Front Physiol.* 2021.
- Hasne MP, Ullman B. Identification and Characterization of a Polyamine Permease from the Protozoan Parasite *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry.* 2005;
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine.* 1989.
- Herrera G, Barragán N, Luna N, Martínez D, de Martino F, Medina J, et al. An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. *Sci Data.* 2020;
- Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Fried C, Tanzer A, Flamm C, et al. The expansion of the metazoan microRNA repertoire. *BMC Genomics.* 2006;
- Hibio N, Hino K, Shimizu E, Nagata Y, Ui-Tei K. Stability of miRNA 5'terminal and seed regions is correlated with experimentally observed miRNA-mediated silencing efficacy. *Sci Rep.* 2012;
- Humphreys DT, Westman BJ, Martin DIK, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science.* 2001.

- Iniesta V, Carcelén J, Molano I, Peixoto PMV, Redondo E, Parra P, et al. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. *Infect Immun*. 2005;
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med*. 2001;
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol*. 2002;
- Jafarzadeh A, Nemati M, Aminizadeh N, Bodhale N, Sarkar A, Jafarzadeh S, et al. Bidirectional cytokine-microRNA control: A novel immunoregulatory framework in leishmaniasis. Chitnis CE, editor. *PLoS Pathog*. 2022;
- Jha AK, Huang SCC, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, et al. Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity*. 2015;
- Jimenez-Duran G, Luque-Martin R, Patel M, Koppe E, Bernard S, Sharp C, et al. Pharmacological validation of targets regulating CD14 during macrophage differentiation. *EBioMedicine*. 2020;
- Johnson CH, Ivanisevic J, Siuzdak G. Metabolomics: beyond biomarkers and towards mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;
- Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE, Christianson DW. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature* 1996.
- el Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henao-Tamayo M, et al. Toll-like receptor–induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol*. 2008;
- Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011;
- Kehl T, Backes C, Kern F, Fehlmann T, Ludwig N, Meese E, et al. About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget*. 2017;
- Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, et al. MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor

- negative breast cancer by targeting NF- κ B and TGF- β signaling pathways. *Oncogene*. 2012.
- Kim K, Baek SC, Lee YY, Bastiaanssen C, Kim J, Kim H, et al. A quantitative map of human primary microRNA processing sites. *Mol Cell*. 2021 Jul 27;
- Kim S, Rhee J keun, Yoo HJ, Lee HJ, Lee EJ, Lee JW, et al. Bioinformatic and metabolomic analysis reveals miR-155 regulates thiamine level in breast cancer. *Cancer Lett*. 2015;
- Kloehn J, Blume M, Cobbold SA, Saunders EC, Dagley MJ, McConville MJ. Using metabolomics to dissect host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol*. 2016;
- Kloehn J, Saunders EC, O'Callaghan S, Dagley MJ, McConville MJ. Characterization of metabolically quiescent *Leishmania* parasites in murine lesions using heavy water labeling. *PLoS Pathog*. 2015;
- Knight SW, Bass BL. A Role for the RNase III Enzyme DCR-1 in RNA Interference and Germ Line Development in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;
- Kobayashi H, Tomari Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016;
- Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, et al. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb*. 2004;
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019;
- Kropf P, Fuentes JM, Fähnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *The FASEB Journal*. 2005;
- Kuligowski J, Sánchez-Illana Á, Sanjuán-Herráez D, Vento M, Quintás G. Intra-batch effect correction in liquid chromatography-mass spectrometry using quality control samples and support vector regression (QC-SVRC). *Analyst*. 2015;
- Kumar A, Vijaykumar S, Dikhit MR, Abhishek K, Mukherjee R, Sen A, et al. Differential Regulation of miRNA Profiles of Human Cells Experimentally Infected by *Leishmania*

- donovani* Isolated From Indian Visceral Leishmaniasis and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *Front Microbiol.* 2020a;
- Kumar V, Das S, Kumar A, Tiwari N, Kumar A, Abhishek K, et al. *Leishmania donovani* infection induce differential miRNA expression in CD4+ T cells. *Sci Rep.* 2020b;
- Kumar V, Kumar A, Das S, Kumar A, Abhishek K, Verma S, et al. *Leishmania donovani* activates hypoxia inducible factor-1 α and miR-210 for survival in macrophages by downregulation of NF- κ B mediated pro-inflammatory immune respons. *Front Microbiol.* 2018;
- Lago TS, Silva JA, Lago EL, Carvalho EM, Zanette DL, Castellucci LC. The miRNA 361-3p, a Regulator of GZMB and TNF Is Associated With Therapeutic Failure and Longer Time Healing of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *L. (Viannia) braziliensis*. *Front Immunol.* 2018;
- Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature.* 1978;
- Lamour SD, Choi BS, Keun HC, Müller I, Saric J. Metabolic Characterization of *Leishmania major* Infection in Activated and Nonactivated Macrophages. *J Proteome Res.* 2012;
- Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Muxel SM, Beverley SM, Floeter-Winter LM. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. *PLoS One.* 2012;
- Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Muxel SM, Floeter-Winter LM, Markus RP. Melatonin attenuates *Leishmania (L.) amazonensis* infection by modulating arginine metabolism. *J Pineal Res.* 2015;
- Latour YL, Gobert AP, Wilson KT. The Role of Polyamines in the Regulation of Macrophage Polarization and Function. *Amino Acids.* 2020;
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 2003;
- Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* 2002;

- Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM, et al. MicroRNA Expression Profile in Human Macrophages in Response to *Leishmania major* Infection. PLoS Negl Trop Dis. 2013;
- Lesani M, Gosmanov C, Paun A, Lewis MD, McCall LI. Impact of Visceral Leishmaniasis on Local Organ Metabolism in Hamsters. Metabolites. 2022;
- Li H, Jiang T, Li MQ, Zheng XL, Zhao GJ. Transcriptional regulation of macrophages polarization by microRNAs. Front Immunol. 2018;
- Li M, Wang J, Fang Y, Gong S, Li M, Wu M, et al. MicroRNA-146a promotes mycobacterial survival in macrophages through suppressing nitric oxide production. Sci Rep. 2016;
- Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. Journal of immunology. 1990;
- Lightfoot HL, Hall J. Endogenous polyamine function - The RNA perspective. Nucleic Acids Res. 2014;
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature. 2005;
- Linhares-Lacerda L, Temerozo JR, Ribeiro-Alves M, Azevedo EP, Mojoli A, Nascimento MTC, et al. Neutrophil extracellular trap-enriched supernatants carry microRNAs able to modulate TNF- α production by macrophages. Sci Rep. 2020;
- Lioupi A, Marinaki M, Virgiliou C, Gika H, Wilson I, Theodoridis G. State-of-the-art in LC-MS Approaches for Probing the Polar Metabolome. New Developments in Mass Spectrometry. 2021;
- Loayza-Puch F, Yoshida Y, Matsuzaki T, Takahashi C, Kitayama H, Noda M. Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs. Oncogene. 2010;
- López-López Á, Ciborowski M, Niklinski J, Barbas C, López-González Á. Optimization of capillary electrophoresis coupled to negative mode electrospray ionization-mass spectrometry using polyvinyl alcohol coated capillaries. Application to a study on non-small cell lung cancer. Anal Chim Acta. 2022;

- Louloupi A, Ntini E, Liz J, Ørom UA. Microprocessor dynamics shows co- and post-transcriptional processing of pri-miRNAs. *RNA*. 2017;
- Lu L, McCurdy S, Huang S, Zhu X, Peplowska K, Tiirikainen M, et al. Time Series miRNA-mRNA integrated analysis reveals critical miRNAs and targets in macrophage polarization. *Sci Rep*. 2016;
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*. 2004;
- Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods*. 2016;
- Lye LF, Owens K, Shi H, Murta SMF, Vieira AC, Turco SJ, et al. Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans. Ullman B, editor. *PLoS Pathog*. 2010;
- Ma T, Liu X, Cen Z, Xin C, Guo M, Zou C, et al. MicroRNA-302b negatively regulates IL-1 β production in response to MSU crystals by targeting IRAK4 and EphA2. *Arthritis Res Ther*. 2018;
- Maeß MB, Wittig B, Cignarella A, Lorkowski S. Reduced PMA enhances the responsiveness of transfected THP-1 macrophages to polarizing stimuli. *J Immunol Methods*. 2014;
- Malta-Santos H, França-Costa J, Macedo A, Queiroz ATL, Fukutani KF, Muxel SM, et al. Differential expression of polyamine biosynthetic pathways in skin lesions and in plasma reveals distinct profiles in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Sci Rep*. 2020;
- Mamani-Huanca M, de la Fuente AG, Otero A, Gradillas A, Godzien J, Barbas C, et al. Enhancing confidence of metabolite annotation in Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry untargeted metabolomics with relative migration time and in-source fragmentation. *J Chromatogr A*. 2021a;
- Mamani-Huanca M, Muxel SM, Acuña SM, Floeter-Winter LM, Barbas C, López-González Á. Metabolomic Reprogramming of C57BL/6-Macrophages during Early Infection with *L. amazonensis*. *Int J Mol Sci*. 2021b;
- Mandal A, Das S, Kumar A, Roy S, Verma S, Ghosh AK, et al. I-Arginine Uptake by Cationic Amino Acid Transporter Promotes Intra-Macrophage Survival of *Leishmania*

- donovani* by Enhancing Arginase-Mediated Polyamine Synthesis. *Front Immunol.* 2017;
- Mao Y, Shi D, Li G, Jiang P. Citrulline depletion by ASS1 is required for proinflammatory macrophage activation and immune responses. *Mol Cell.* 2022;
- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage Oxidation of L-Arginine to Nitrite and Nitrate: Nitric Oxide Is an Intermediate. *Biochemistry.* 1988;
- Maruyama SR, Fuzo CA, Oliveira AER, Rogerio LA, Takamiya NT, Pessenda G, et al. Insight Into the Long Noncoding RNA and mRNA Coexpression Profile in the Human Blood Transcriptome Upon *Leishmania infantum* Infection. *Front Immunol.* 2022;
- Mauel J, Ransijn A, Buchmuller-Rouiller Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *J Leukoc Biol.* 1991;
- Mazumder A, Bose M, Chakraborty A, Chakrabarti S, Bhattacharyya SN. A transient reversal of miRNA-mediated repression controls macrophage activation. *EMBO Rep.* 2013;
- Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology.* 2004;
- Ming X, Rajapakse AG, Yepuri G, Xiong Y, Carvas JM, Ruffieux J, et al. Arginase II Promotes Macrophage Inflammatory Responses Through Mitochondrial Reactive Oxygen Species, Contributing to Insulin Resistance and Atherogenesis. *J Am Heart Assoc.* 2012;
- Mittar D, Paramban R, Mcintyre C. Application Note: Flow Cytometry and High-Content Imaging to Identify Markers of Monocyte-Macrophage Differentiation. *BD Biosciences.* 2011;
- Modolell M, Corraliza IM, Link F, Soler G, Eichmann K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH 1 and TH 2 cytokines. *Eur J Immunol.* 1995;
- Mounce BC, Poirier EZ, Passoni G, Simon-Loriere E, Cesaro T, Prot M, et al. Interferon-Induced Spermidine-Spermine Acetyltransferase and Polyamine Depletion Restrict Zika and Chikungunya Viruses. *Cell Host Microbe.* 2016;

- Muleme HM, Reguera RM, Berard A, Azinwi R, Jia P, Okwor IB, et al. Infection with arginase-deficient *Leishmania major* reveals a parasite number-dependent and cytokine-independent regulation of host cellular arginase activity and disease pathogenesis. *Journal of Immunology*. 2009;
- Munder M, Choi BS, Rogers M, Kropf P. L-Arginine deprivation impairs *Leishmania major*-specific T-cell responses. *Eur J Immunol*. 2009;
- Munder M, Mollinedo F, Calafat J, Canchado J, Gil-Lamaignere C, Fuentes JM, et al. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*. 2005;
- Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 2014;
- Murray-Stewart T, Sierra JC, Piazuolo MB, Mera RM, Chaturvedi R, Bravo LE, et al. Epigenetic silencing of miR-124 prevents spermine oxidase regulation: implications for *Helicobacter pylori*-induced gastric cancer. *Oncogene*. 2016;
- Muxel SM, Acuña SM, Aoki JI, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. Toll-like receptor and miRNA-let-7e expression alter the inflammatory response in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages. *Front Immunol*. 2018a;
- Muxel SM, Aoki JI, Fernandes JCR, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Acuña SM, et al. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. *Front Microbiol*. 2018b;
- Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Sci Rep*. 2017;
- Muxel SM, Mamani-Huanca M, Aoki JI, Zampieri RA, Floeter-Winter LM, López-González Á, et al. Metabolomic Profile of BALB/c Macrophages Infected with *Leishmania amazonensis*: Deciphering L-Arginine Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2019;
- Nguyen PNN, Huang CJ, Sugii S, Cheong SK, Choo KB. Selective activation of miRNAs of the primate-specific chromosome 19 miRNA cluster (C19MC) in cancer and stem cells and possible contribution to regulation of apoptosis. *J Biomed Sci*. 2017;

- Nicholson B, Manner CK, Kleeman J, MacLeod CL. Sustained Nitric Oxide Production in Macrophages Requires the Arginine Transporter CAT2. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;
- Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al-Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, et al. The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet*. 2010;
- Noronha N, Ehx G, Meunier M, Laverdure J, Thériault C, Perreault C. Major multilevel molecular divergence between THP-1 cells from different biorepositories. *Int J Cancer*. 2020;
- Nunes S, Silva IB, Ampuero MR, de Noronha ALL, de Souza LCL, Correia TC, et al. Integrated analysis reveals that miR-193b, miR-671, and TREM-1 correlate with a good response to treatment of human Localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Front Immunol*. 2018;
- Nussler AK, Billiar TR, Liu ZZ, Morris SM. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;
- Ogunkolade BW, Colomb-Valet I, Monjour L, Rhodes-Feuillette A, Abita JP, Frommel D. Interactions between the human monocytic leukaemia THP-1 cell line and Old and New World species of *Leishmania*. *Acta Trop*. 1990;
- Osorio EY, Travi BL, da Cruz AM, Saldarriaga OA, Medina AA, Melby PC. Growth Factor and Th2 Cytokine Signaling Pathways Converge at STAT6 to Promote Arginase Expression in Progressive Experimental Visceral Leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 2014;
- Ozleyen A, Yilmaz YB, Tumer TB. Dataset on the differentiation of THP-1 monocytes to LPS inducible adherent macrophages and their capacity for NO/iNOS signaling. *Data Brief*. 2021;
- Paduch K, Debus A, Rai B, Schleicher U, Bogdan C. Resolution of Cutaneous Leishmaniasis and Persistence of *Leishmania major* in the Absence of Arginase 1. *The Journal of Immunology*. 2019;
- Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflammation Research*. 2007;

- Parker R, Sheth U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol Cell*; 2007;
- Pegg AE. Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *American Journal of Physiology*. 2008;
- Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*. 2009;
- Pereira TC. Introdução ao mundo dos microRNAs. Editora CUBO/Sociedade Brasileira de Genética; 2015.
- Phillips MA. Polyamines in protozoan pathogens. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;
- Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, et al. Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. *Science*. 2005;
- Pinto S, Kim H, Subbannayya Y, Giambelluca M, Bösl K, Kandasamy R. Dose-dependent phorbol 12-myristate-13-acetate-mediated monocyte-to-macrophage differentiation induces unique proteomic signatures in THP-1 cells. *bioRxiv*. 2020;
- Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;
- Puchalska P, Huang X, Martin SE, Han X, Patti GJ, Crawford PA. Isotope Tracing Untargeted Metabolomics Reveals Macrophage Polarization-State-Specific Metabolic Coordination across Intracellular Compartments. *iScience*. 2018;
- Qadoumi M, Becker I. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 2002;
- Rabhi I, Rabhi S, Ben-Othman R, Rasche A, Consortium S, Daskalaki A, et al. Transcriptomic Signature of *Leishmania* Infected Mice Macrophages: A Metabolic Point of View. Traub-Csekö YM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;
- Raes G, van den Bergh R, de Baetselier P, Ghassabeh GH. Arginase-1 and Ym1 Are Markers for Murine, but Not Human, Alternatively Activated Myeloid Cells. *The Journal of Immunology*. 2005;
- Ramos-Sanchez EM, Reis LC, Souza M de A, Muxel SM, Santos KR, Lagos D, et al. miR-548d-3p Is Up-Regulated in Human Visceral Leishmaniasis and Suppresses Parasite Growth in Macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;

- Rashidi S, Mansouri R, Ali-Hassanzadeh M, Ghani E, Barazesh A, Karimazar M, et al. Highlighting the interplay of microRNAs from *Leishmania* parasites and infected-host cells. *Parasitology*. 2021;
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology*. 2014.
- Reichholf B, Herzog VA, Fasching N, Manzenreither RA, Sowemimo I, Ameres SL. Time-Resolved Small RNA Sequencing Unravels the Molecular Principles of MicroRNA Homeostasis. *Mol Cell*. 2019;
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases*. 2007;
- Richter E, Ventz K, Harms M, Mostertz J, Hochgräfe F. Induction of macrophage function in human THP-1 cells is associated with rewiring of MAPK signaling and activation of MAP3K7 (TAK1) protein kinase. *Front Cell Dev Biol*. 2016;
- Riddy DM, Goy E, Delerive P, Summers RJ, Sexton PM, Langmead CJ. Comparative genotypic and phenotypic analysis of human peripheral blood monocytes and surrogate monocyte-like cell lines commonly used in metabolic disease research. Zissel G, editor. *PLoS One*. 2018;
- Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. Arginase Plays a Pivotal Role in Polyamine Precursor Metabolism in *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;
- Romero I, Téllez J, Romanha AJ, Steindel M, Grisard EC. Upregulation of Cysteine Synthase and Cystathionine β -Synthase Contributes to *Leishmania braziliensis* Survival under Oxidative Stress. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;
- Rose SA, Wroblewska A, Dhainaut M, Yoshida H, Shaffer JM, Bektesevic A, et al. A microRNA expression and regulatory element activity atlas of the mouse immune system. *Nat Immunol*. 2021;
- Rosenzweig D, Smith D, Opperdoes F, Stern S, Olafson RW, Zilberstein D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *FASEB journal*. 2008;
- Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *BMJ*. 1903;

- Sans-Fons MG, Yeramian A, Pereira-Lopes S, Santamaría-Babi LF, Modolell M, Lloberas J, et al. Arginine Transport Is Impaired in C57Bl/6 Mouse Macrophages as a Result of a Deletion in the Promoter of *Slc7a2* (CAT2), and Susceptibility to *Leishmania* Infection Is Reduced. *J Infect Dis.* 2013;
- dos Santos JC, Heinhuis B, Gomes RS, Damen MSMA, Real F, Mortara RA, et al. Cytokines and microbicidal molecules regulated by IL-32 in THP-1-derived human macrophages infected with New World *Leishmania* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;
- Sarkar A, Saha P, Mandal G, Mukhopadhyay D, Roy S, Singh SK, et al. Monitoring of intracellular nitric oxide in leishmaniasis: Its applicability in patients with visceral leishmaniasis. *Cytometry Part A.* 2011;
- Saunders EC, Ng WW, Kloehn J, Chambers JM, Ng M, McConville MJ. Induction of a Stringent Metabolic Response in Intracellular Stages of *Leishmania mexicana* Leads to Increased Dependence on Mitochondrial Metabolism. Wilson ME, editor. *PLoS Pathog.* 2014;
- Schaffner A, Schneemann M, Schoedon G, Hofer S, Blau N, Guerrero L. Nitric Oxide Synthase Is Not a Constituent of the Antimicrobial Armature of Human Mononuclear Phagocytes. *Journal of Infectious Diseases.* 1993;
- Scheltema RA, Decuyper S, T'Kindt R, Dujardin JC, Coombs GH, Breitling R. The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. *Parasitology.* 2010;
- Schildberger A, Rossmannith E, Eichhorn T, Strassl K, Weber V. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Mediators Inflamm.* 2013;
- Schleicher U, Paduch K, Debus A, Obermeyer S, König T, Kling JC, et al. TNF-Mediated Restriction of Arginase 1 Expression in Myeloid Cells Triggers Type 2 NO Synthase Activity at the Site of Infection. *Cell Rep.* 2016;
- Schlein Y, Jacobson RL, Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;

- Schmittgen TD, Jiang J, Liu Q, Yang L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucleic Acids Res.* 2004;
- Schroder K, Irvine KM, Taylor MS, Bokil NJ, le Cao KA, Masterman KA, et al. Conservation and divergence in Toll-like receptor 4-regulated gene expression in primary human versus mouse macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;
- Schwende H, Fitzke E, Ambs P, Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Leukoc Biol.* 1996;
- Shiratori H, Feinweber C, Luckhardt S, Linke B, Resch E, Geisslinger G, et al. THP-1 and human peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages differ in their capacity to polarize in vitro. *Mol Immunol.* 2017;
- da Silva ER, Castilho TM, Pioker FC, Tomich De Paula Silva CH, Floeter-Winter LM. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *Int J Parasitol.* 2002;
- da Silva ER, da Silva MFL, Fischer H, Mortara RA, Mayer MG, Framesqui K, et al. Biochemical and biophysical properties of a highly active recombinant arginase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and subcellular localization of native enzyme. *Mol Biochem Parasitol.* 2008;
- Singh AK, Pandey RK, Siqueira-Neto JL, Kwon YJ, Freitas-Junior LH, Shaha C, et al. Proteomic-based approach to gain insight into reprogramming of THP-1 cells exposed to *Leishmania donovani* over an early temporal window. *Infect Immun.* 2015;
- Somasundaram V, Gilmore AC, Basudhar D, Palmieri EM, Scheiblin DA, Heinz WF, et al. Inducible nitric oxide synthase-derived extracellular nitric oxide flux regulates proinflammatory responses at the single cell level. *Redox Biol.* 2020;
- Soong L. Subversion and Utilization of Host Innate Defense by *Leishmania amazonensis*. *Front Immunol.* 2012;
- Souza M de A, Ramos-Sanchez EM, Muxel SM, Lagos D, Reis LC, Pereira VRA, et al. miR-548d-3p Alters Parasite Growth and Inflammation in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;

- Sowers ML, Tang H, Singh VK, Khan A, Mishra A, Restrepo BI, et al. Multi-OMICs analysis reveals metabolic and epigenetic changes associated with macrophage polarization. *Journal of Biological Chemistry*. 2022;
- Staedel C, Tran TPA, Giraud J, Darfeuille F, Giorgio A di, Tourasse NJ, et al. Modulation of oncogenic miRNA biogenesis using functionalized polyamines. *Sci Rep*. 2018;
- Starr T, Bauler TJ, Malik-Kale P, Steele-Mortimer O. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella Typhimurium*. *PLoS One*. 2018;
- Steiger RF, Steiger E. Cultivation of *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis* in Defined Media: Nutritional Requirements. *J Protozool*. 1977;
- Stewart TM, Dunston TT, Woster PM, Casero RA. Polyamine catabolism and oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;
- Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011;
- Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-Mcdermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature*. 2013;
- Temporal RM, Cysne-Finkelstein L, Echevarria A, Silva-Gonçalves AJ, Leon LL, Genestra MS. Amidine Derivatives and *Leishmania amazonensis*: an Evaluation of the Effect of Nitric Oxide (NO) Production on the Parasite-macrophage Interaction. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2008;
- Thomas AC, Mattila JT. 'Of mice and men': Arginine metabolism in macrophages. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. 2014.
- Tili E, Michaille JJ, Luo Z, Volinia S, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. The down-regulation of miR-125b in chronic lymphocytic leukemias leads to metabolic adaptation of cells to a transformed state. *Blood*. 2012;
- Tiwari N, Kumar V, Gedda MR, Singh AK, Singh VK, Gannavaram S, et al. Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection: Delineation of their roles in macrophage dysfunction. *Front Microbiol*. 2017;

- Tominaga T, Suzuki M, Saeki H, Matsuno S, Tachibana T, Kudo T. Establishment of an activated macrophage cell line, A-THP-1, and its properties. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 1998;
- Tounta V, Liu Y, Cheyne A, Larrouy-Maumus G. Metabolomics in infectious diseases and drug discovery. *Mol Omics*. 2021;
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 1980;
- Turunen TA, Roberts TC, Laitinen P, Väänänen MA, Korhonen P, Malm T, et al. Changes in nuclear and cytoplasmic microRNA distribution in response to hypoxic stress. *Sci Rep*. 2019;
- Varikuti S, Verma C, Natarajan G, Oghumu S, Satoskar AR. MicroRNA155 Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Cutaneous *Leishmania major* Infection by Promoting a Th2 Response and Attenuating Dendritic Cell Activity. *Am J Pathol*. 2021;
- Venugopal G, Bird JT, Washam CL, Roys H, Bowlin A, Byrum SD, et al. In vivo reprogramming of murine host immune response genes following *Leishmania major* infection. *bioRxiv*. 2021;
- Veras PST, Ramos PIP, de Menezes JPB. In search of biomarkers for pathogenesis and control of leishmaniasis by global analyses of *Leishmania*-infected macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;
- Volpedo G, Oljuskin T, Azodi N, Hamano S, Matlashewski G, Gannavaram S, et al. *Leishmania mexicana* Centrin Knock out Parasites Promote M1-polarizing Metabolic Changes. *bioRxiv*. 2022a;.
- Volpedo G, Oljuskin T, Cox B, Mercado Y, Askwith C, Azodi N, et al. *Leishmania mexicana* Promotes Pain-reducing Metabolomic Reprogramming In Cutaneous Lesions. *bioRxiv*. 2022b;.
- Wanasen N, MacLeod CL, Ellies LG, Soong L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. *Infect Immun*. 2007;

- Wang N, Zheng J, Chen Z, Liu Y, Dura B, Kwak M, et al. Single-cell microRNA-mRNA co-sequencing reveals non-genetic heterogeneity and mechanisms of microRNA regulation. *Nat Commun.* 2019;
- Wang X. Composition of seed sequence is a major determinant of microRNA targeting patterns. *Bioinformatics.* 2014;
- Wang Y, Luo J, Zhang H, Lu J. MicroRNAs in the Same Clusters Evolve to Coordinately Regulate Functionally Related Genes. *Mol Biol Evol.* 2016;
- Wee LM, Flores-Jasso CF, Salomon WE, Zamore PD. Argonaute divides Its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell.* 2012;
- Wei F, Cao C, Xu X, Wang J. Diverse functions of miR-373 in cancer. *J Transl Med.* 2015;
- Wei Z, Oh J, Flavell RA, Crawford JM. LACC1 bridges NOS2 and polyamine metabolism in inflammatory macrophages. *Nature.* 2022;
- Weinberg J, Misukonis M, Shami P, Mason S, Sauls D, Dittman W, et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood.* 1995;
- Westrop GD, Williams RAM, Wang L, Zhang T, Watson DG, Silva AM, et al. Metabolomic Analyses of *Leishmania* Reveal Multiple Species Differences and Large Differences in Amino Acid Metabolism. *PLoS One.* 2015;
- Wu S, Aksoy M, Shi J, Houbaviv HB. Evolution of the miR-290–295/miR-371–373 Cluster Family Seed Repertoire. Mari B, editor. *PLoS One.* 2014;
- Xie Y, Murray-Stewart T, Wang Y, Yu F, Li J, Marton LJ, et al. Self-immolative nanoparticles for simultaneous delivery of microRNA and targeting of polyamine metabolism in combination cancer therapy. *Journal of Controlled Release.* 2017;
- Xue J, Schmidt S v., Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, et al. Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation. *Immunity.* 2014;
- Yang B, Yang H, Lu X, Wang L, Li H, Chen S, et al. MiR-520b inhibits endothelial activation by targeting NF- κ B p65-VCAM1 axis. *Biochem Pharmacol.* 2021;
- Yasukawa K, Kinoshita D, Yaku K, Nakagawa T, Koshiba T. The microRNAs miR-302b and miR-372 regulate mitochondrial metabolism via the SLC25A12 transporter, which

- controls MAVS-mediated antiviral innate immunity. *Journal of Biological Chemistry*. 2020;
- Yeramian A, Martin L, Arpa L, Bertran J, Soler C, McLeod C, et al. Macrophages require distinct arginine catabolism and transport systems for proliferation and for activation. *Eur J Immunol*. 2006a;
- Yeramian A, Martin L, Serrat N, Arpa L, Soler C, Bertran J, et al. Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages. *The Journal of Immunology*. 2006b;
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;
- Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW, et al. Human microRNA clusters: Genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;
- Zhang H, Wang D, Li M, Plecítá-Hlavatá L, D'Alessandro A, Tauber J, et al. Metabolic and Proliferative State of Vascular Adventitial Fibroblasts in Pulmonary Hypertension Is Regulated Through a MicroRNA-124/PTBP1 (Polypyrimidine Tract Binding Protein 1)/Pyruvate Kinase Muscle Axis. *Circulation*. 2017;
- Zhang J, Pham VVH, Liu L, Xu T, Truong B, Li J, et al. Identifying miRNA synergism using multiple-intervention causal inference. *BMC Bioinformatics*. 2019;
- Zhang M, Caragine T, Wang H, Cohen PS, Botchkina G, Soda K, et al. Spermine Inhibits Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Mononuclear Cells: A Counterregulatory Mechanism that Restrains the Immune Response. *Journal of Experimental Medicine*. 1997;
- Zhang X, Li X, Tan Z, Liu X, Yang C, Ding X, et al. MicroRNA-373 is upregulated and targets TNFAIP1 in human gastric cancer, contributing to tumorigenesis. *Oncol Lett*. 2013a;
- Zhang Y, Zhang M, Zhong M, Suo Q, Lv K. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *Int J Mol Med*. 2013b;
- Zhou W, Yuan T, Gao Y, Yin P, Liu W, Pan C, et al. IL-1 β -induces NF- κ B and upregulates microRNA-372 to inhibit spinal cord injury recovery. *J Neurophysiol*. 2017a;

- Zhou X, Li X, Ye Y, Zhao K, Zhuang Y, Li Y, et al. MicroRNA-302b augments host defense to bacteria by regulating inflammatory responses via feedback to TLR/IRAK4 circuits. *Nat Commun.* 2014;
- Zhou Y, Frings O, Branca RM, Boekel J, le Sage C, Fredlund E, et al. microRNAs with AAGUGC seed motif constitute an integral part of an oncogenic signaling network. *Oncogene.* 2017b;
- Zhu M, Du J, Liu AD, Holmberg L, Chen SY, Bu D, et al. L-cystathionine inhibits oxidized low density lipoprotein-induced THP-1-derived macrophage inflammatory cytokine monocyte chemoattractant protein-1 generation via the NF- κ B pathway. *Sci Rep.* 2015;
- Zhu X, Meyers A, Long D, Ingram B, Liu T, Yoza BK, et al. Frontline Science: Monocytes sequentially rewire metabolism and bioenergetics during an acute inflammatory response. *J Leukoc Biol.* 2019;

ANEXO A



APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Aprovou em 17/01/2018, o Protocolo de Pesquisa nº 0023/18 intitulado: “Papel das miRNAs na regulação da via de produção de poliaminas/NO em macrófagos derivados de THP-1 infectados com Leishmania amazonenses” apresentado pelo Departamento Instituto de Medicina Tropical.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Lucile Maria Floeter-Winter

Pesquisador (a) Executante: Juliane Cristina Ribeiro Fernandes

CEP-FMUSP, 17 de Janeiro de 2018.

Profª Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B

Trabalhos de primeira autoria

Fernandes, J. C. R., Acuña, S. M., Aoki, J. I., Floeter-Winter, L. M., & Muxel, S. M. (2019). Long non-coding RNAs in the regulation of gene expression: physiology and disease. *Non-coding RNA*.

Fernandes, J. C. R., Aoki, J. I., Maia Acuña, S., Zampieri, R. A., Markus, R. P., Floeter-Winter, L. M., & Muxel, S. M. (2019). Melatonin and *Leishmania amazonensis* infection altered miR-294, miR-30e, and miR-302d impacting on *Tnf*, *Mcp-1*, and *Nos2* expression. *Frontiers in cellular and infection microbiology*.

Fernandes, J. C. R., Loss, C. M., Lôbo, K., Hajdu, R. C. P. L., & Tan, P. B. (2022). NBS Hack Week: Pilot study on ARRIVE guidelines E10 compliance. *BioHackrXiv Preprints*.

Fernandes, J.C.R., Gonçalves, A.N.A., Floeter-Winter, L.M., Nakaya, H.I., Muxel, S.M. (2023). Comparative transcriptomic analysis of long noncoding RNAs in *Leishmania*-infected human macrophages. *Frontiers in Genetics*.

Trabalhos de coautoria

Muxel, S. M., Aoki, J. I., **Fernandes, J. C. R.**, Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., Acuña, S. M., ... & Floeter-Winter, L. M. (2018). Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. *Frontiers in Microbiology*.

Acuña, S. M., Aoki, J. I., Laranjeira-Silva, M. F., Zampieri, R. A., **Fernandes, J. C. R.**, Muxel, S. M., & Floeter-Winter, L. M. (2017). Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *PLoS One*.

Aoki, J. I., Muxel, S. M., Zampieri, R. A., Acuña, S. M., **Fernandes, J. C. R.**, Vanderlinde, R. H., ... & Floeter-Winter, L. M. (2017). L-arginine availability and arginase activity: characterization of amino acid permease 3 in *Leishmania amazonensis*. *PLoS neglected tropical diseases*.

Aoki, J. I., Muxel, S. M., **Fernandes, J. C. R.**, & Floeter-Winter, L. M. (2018). The Polyamine Pathway as a Potential Target for Leishmaniasis Chemotherapy. *Leishmaniasis as Re-emerging Diseases*.