

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 17/08/2019.

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

INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA
DE RECEPTORES TIPO TOLL E CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS NO ENCÉFALO E NO BAÇO DE CÃES
COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Fernanda Grecco Grano

Médica Veterinária

Zootecnista

ARAÇATUBA – SP

2017

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

INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA
DE RECEPTORES TIPO TOLL E CITOCINAS
INFLAMATÓRIAS NO ENCÉFALO E NO BAÇO DE CÃES
COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Fernanda Grecco Grano

Orientadora: Prof.^a Adjunto Gisele Fabrino Machado

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Câmpus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2017

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Grano, Fernanda Grecco

G759i

Investigação do perfil de expressão gênica de receptores tipo toll e citocinas inflamatórias no encéfalo e no baço de cães com leishmaniose visceral / Fernanda Grecco Grano.

Araçatuba: [s.n], 2017.
76f. il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2017

Orientadora: Profa. Adj. Gisele Fabrino Machado

1. Leishmaniose visceral. 2. Caes. 3. Sistema nervoso central. 4. Leishmania infantum. 5. Inflamação. I. T.

CDD 571.961



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: Investigação do perfil de expressão gênica de receptores tipo toll e citocinas inflamatórias no
encéfalo e no baço de cães com leishmaniose visceral

AUTORA: FERNANDA GRECCO GRANO

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Dra. FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. PAULO RICARDO DELL'ARMELENA ROCHA
Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental / Universidade Paulista - Câmpus de Indianópolis/UNIP


Profa. Dra. MONICA REGINA VENDRAME AMARANTE
Departamento de Parasitologia / Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu/Unesp

Araçatuba, 17 de agosto de 2017.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FERNANDA GRECCO GRANO – Itápolis – SP, 18 de março de 1985. Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Câmpus de Dracena, São Paulo, em julho de 2008. Graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED, Garça, São Paulo, em dezembro de 2010. Bolsista de Iniciação Científica CNPq durante a primeira graduação (2004 a 2005 e 2006 a 2007). Mestra em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA) – UNESP, Câmpus de Araçatuba, São Paulo e bolsista FAPESP (2012 a 2013). Mestrado Sanduíche na *Universidad de Extremadura – Facultad de Veterinaria – Departamento de Sanidad Animal – Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias*, na cidade de Cáceres, Espanha, entre fevereiro e abril de 2013. Aluna de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da FMVA – UNESP, Câmpus de Araçatuba, São Paulo e bolsista FAPESP desde março de 2014. Doutorado Sanduíche na *University of York – Centre for Immunology and Infection – Department of Biology and Hull York Medical School*, na cidade de York, Inglaterra - UK, de novembro de 2015 a outubro de 2016.

"Alice: How long is forever?"

White Rabbit: Sometimes, just one second."

" Alice: Quanto tempo dura o eterno?"

Coelho Branco: Às vezes apenas um segundo."

(Lewis Carroll, 1832-1898)

Dedico

À minha família:

**Mamãe Rosana e papai Antonio;
Irmãs mais do que queridas Mariana e Carolina.**

À Hanny e Mel, minhas cachorrinhas.

Com amor, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Professora Adjunto Gisele Fabrino Machado pela orientação, auxílio científico e confiança ao longo de quase sete anos de curso de mestrado e de doutorado.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, pela disponibilização de todos os recursos fundamentais para o desenvolvimento dessa tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa (#2016/02384-9) que originou a presente tese, bem como pela concessão da bolsa de doutorado (#2013/25498-1) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior (#2015/10591-1), que foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa.

À equipe do laboratório de Imunologia, em especial à professora Adjunto Valéria Marçal Félix de Lima, pela introdução à técnica de ELISA de captura e pela realização dos exames sorológicos de leishmaniose visceral.

Ao *Centre for Immunology and Infection* da *University of York* de York/UK. Em especial ao professor Paul Martin Kaye e toda sua equipe pela recepção carinhosa, apoio técnico e todo o aprendizado em tecnologias de ponta durante a realização do estágio de pesquisa.

Aos membros da banca do exame geral de qualificação: prof. Adj. Valéria Marçal Felix de Lima e prof. Adj. Katia Denise Saraiva Bresciani, por todas as considerações e sugestões para melhoria do artigo científico proveniente desta tese.

Aos membros da banca da defesa de tese de doutorado: prof. Monica Regina

Vendrame Amarante, prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha, prof. Adj. Valéria Marçal Felix de Lima e prof. Flávia Lombardi Lopes por terem gentilmente aceitado o convite e por todas as sugestões para melhoria da tese de doutorado.

A todos os pós-graduandos e estagiários dos Laboratórios de Patologia Aplicada (LApap), Imunologia e Ornitopatologia, pelo convívio diário harmonioso, auxílios científicos e conversas.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração prática da pesquisa, bem como da elaboração da tese.

Aos colegas e amigos José Eduardo, Milena, Paulo Ricardo, Guilherme e Camila pela companhia, convívio diário, carinho, risadas e lágrimas. Pela amizade verdadeira e forte ao longo de todo o curso de doutorado.

A todos os amigos antigos, em especial à Susana e à Tânia, por nunca desistirem de mim, mesmo com um oceano de distância. O que hoje a distância separa, o coração irá sempre unir.

À amiga Juliana, companheira de todos os momentos nas descobertas do mundo britânico, pelas horas de alegrias e horas de desespero que compartilhamos juntas. Por sempre ser essa pessoa maravilhosa e amiga. Por me dar força e vontade de não desistir mesmo com todos os desafios de um país e cultura diferentes.

À toda minha família linda pelo amor fortalecedor, estímulo constante e apoio incondicional, mesmo quando eu decido fugir da nossa terrinha brasileira rumo a novas descobertas científicas e mundanas.

Ao meu namorado muito fofinho Richard pelo amor e felicidade que me proporciona a cada dia, pelo apoio sempre presente e pela paciência em escutar e em querer entender as coisas nerds e profundas que eu adoro compartilhar.

A todos os cães com leishmaniose visceral por cederem suas vidas, mesmo que involuntariamente, para a realização desta e de inúmeras outras pesquisas.

Aos meus anjos-da-guarda e a todos os espíritos de luz que sempre estiveram me dando força e coragem.

E finalmente a Deus, pela fé, esperança e amor. Acima de tudo o amor.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	19
2 RECEPTORES TIPO TOLL EM CÃES COM LV	21
3 RECEPTORES TIPO TOLL E CITOCINAS NO SNC	24
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivos Gerais	26
4.2 Objetivos Específicos	26
5 REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2 – TOLL-LIKE RECEPTORS AND CYTOKINES IN THE BRAIN AND SPLEEN OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS	39
SUMMARY	39
1 INTRODUCTION	40
2 MATERIAL AND METHODS	42
2.1 Animals.....	42
2.2 Sampling	43
2.3 Clinical Staging.....	44
2.4 <i>Leishmania</i> DNA Quantification using qPCR	44
2.5 Evaluation of Gene Expression by RT-qPCR.....	45
2.6 Cytokines Quantification by Capture ELISA.....	47
2.6.1 Brain and spleen extracts	47
2.6.2 Cytokines quantification	47
2.7 Statistical Analysis.....	48
2.8 Ethical Issues	48
3 RESULTS	49
3.1 Clinical Staging.....	49
3.2 Brain Histopathological Analysis	49
3.3 Parasite Load	51

3.4 TLR Gene Expression in the Brain and Spleen of Infected dogs	52
3.5 Cytokines Quantification.....	54
4 DISCUSSION	55
5 CONCLUSION.....	62
6 REFERENCES	62
CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÃO	74
REFERÊNCIAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C =	grau Celsius
cm ³ =	centímetro cúbico
nM =	nanomolar
mg =	miligrama
µm =	micrômetro
µl =	microlitro
pg/ml =	picrograma/mililitro
% =	porcentagem
α =	alpha
β =	beta
γ =	gama
ALRs =	AIM-like receptors
BHE =	barreira hematoencefálica
BHL =	barreira hematoliquórica
cDNA =	DNA complementar
CTLs =	C-type lectins
DNA =	ácido desoxirribonucleico
dsRNA =	RNA de dupla fita
ssRNA =	RNA de fita simples
kDNA =	DNA do cinetoplasto
DAMP =	padrões moleculares associados aos danos
ELISA =	ensaio de imunoabsorção enzimática
GIPLs =	glicoinositol-fosfolipídeos
G3PDH =	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H-E =	hematoxilina-eosina
IFN =	interferon
IL =	interleucina
LPG =	lipofosfoglicanos

LRV =	Virus de RNA de <i>Leishmania</i>
LV =	leishmaniose visceral
Min. =	minutos
MMP-9 =	matrix metalloproteinase 9
MyD88 =	molécula adaptadora fator de diferenciação mileoide 88
NFκB =	fator nuclear kappa B
NLR =	nucleotide-binding leucine-rich repeat-containing receptors
PAMP =	padrões moleculares associados aos patógenos
PBMC =	células mononucleares do sangue periférico
PRR =	receptores de reconhecimento padrão
pH =	potencial hidrogeniônico
RASGRP3 =	Ras guanine nucleotide-releasing protein 3
RNA =	ácido ribonucleico
RLRs =	RIG-like receptors
RPL32 =	ribosomal protein L32
RT =	reverse transcription
VL =	visceral leishmaniasis
SNC =	sistema nervoso central
Th1 =	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 1
Th2 =	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 2
TLR =	receptor tipo Toll
TNF =	fator de necrose tumoral

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURE 1 - Representative photomicrography of brain alterations during the canine visceral leishmaniasis. (A) Moderate inflammatory cells infiltrate (arrows) in leptomeninge (Grade 2). (B) Intense inflammatory cells infiltrate (asterisk and arrows) in the choroid plexus from the fourth ventricle (Grade 3). (C) Mild inflammatory cells infiltrate (arrow) in the subependymal area (Grade 1). Inset: mononuclear cells amplified. Hematoxylin and Eosin. Scale bar = 50µm.....**50**

FIGURE 2 - Percentage (%) of dogs according to the intensity of inflammation in the choroid plexus, subependymal area and leptomeninges. -: absence of inflammatory infiltrate; +: mild inflammatory infiltrate; ++: moderate inflammatory infiltrate; +++: intense inflammatory infiltrate.....**51**

FIGURE 3 - Individual parasite load determination in the brain and in the spleen of dogs with visceral leishmaniasis. Black lines connect the brain and the spleen values of the same dog.....**52**

FIGURE 4 - Relative gene expression of Toll-like receptors in the brain and in the spleen of dogs with visceral leishmaniasis. The values are expressed as fold changes (log 10). Positive values indicate up-regulation and negative values indicate down-regulation, when compared to the control dogs. The normalization factor was the reference gene G3PDH and RPL32. * indicates $P<0.05$; ** indicates $P<0.01$**53**

FIGURE 5 - Individual values of TLR-4 gene expression in the brain of infected

and control dogs, where it is possible to notice a subpopulation of 4 infected dogs with remarkable up-regulation (20.13-fold more). Horizontal lines represent the median and the interquartile range values.....**54**

FIGURE 6 - Individual values of cytokines in naturally infected and healthy dogs. TNF- α , IL-1 β and IFN- γ levels in brain (A, B, C) and in spleen (D, E, F). Horizontal lines represent the median and the interquartile range values.**55**

LISTA DE TABELAS

Página

Table 1 - Gene expression assay and primers and hydrolysis probe used for RT-qPCR.....	46
--	-----------

INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA DE RECEPTORES TIPO TOLL E CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NO ENCÉFALO E NO BAÇO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária que apresenta distribuição mundial e que pode afetar homens e animais, sendo que o cão é considerado o principal hospedeiro da doença. Cães infectados pelo parasito *Leishmania* podem apresentar-se assintomáticos ou com desordens generalizadas, incluindo alterações neurológicas. Existem alguns relatos do acometimento do encéfalo durante a infecção, mas a neuropatogenia da doença não foi completamente elucidada. Há evidências do comprometimento das barreiras encefálicas e da presença do DNA do parasito no encéfalo. Os receptores tipo Toll (TLRs) são sensores do sistema imune inato capazes de detectar padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), desencadeando uma resposta inflamatórias com produção de diversos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão gênica dos Tolls 1-10, assim como a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 no encéfalo e no baço de cães com leishmaniose visceral. No baço houve aumento de expressão gênica de TLR-5 e TLR-9, enquanto no encéfalo houve aumento de TLR-4 em uma pequena população de cães infectados. Em relação às citocinas, todas as citocinas foram detectadas nos dois tecidos avaliados, com excessão de IL-6. Nos cães infectados, TNF- α e IL-1 β estavam presentes em maiores concentrações no encéfalo e no baço, respectivamente. Este estudo fornece suporte para explicar o envolvimento de TLRs na LV e nossos dados confirmam o envolvimento encefálico durante a doença.

Palavras-Chave: inflamação, *Leishmania infantum*, sistema nervoso central

INVESTIGATION OF THE GENE EXPRESSION PROFILE OF TOLL-LIKE RECEPTORS AND INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE BRAIN AND IN THE SPLEEN OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY - Visceral leishmaniasis (VL) is a parasitic disease that presents world distribution, affecting humans and animals. Dogs are considered the main hosts of the disease. Infected dogs with the *Leishmania* parasite can be asymptomatic or present generalized disorders, including neurological alterations. There are some reports of brain commitment during infection. Nevertheless, neuropathogenesis of VL is not completely elucidated. There are evidences of brain barriers breakdown and of the presence of *Leishmania* DNA in the brain. Toll-like receptors (TLRs) are innate immune sensors capable of detecting pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), trigger an inflammatory response with production of several inflammatory mediators, including cytokines. Therefore, the aim of this study was to evaluate gene expression profile of TLRs1-10, along with the production of proinflammatory cytokines in both brain and spleen in dogs with VL. In spleen there was an up-regulation of TLR-5 and TLR-9 while in the brain there was up-regulation of TLR-4 in a few number of infected animals. Regarding cytokines, all cytokines were detected in both tissues, except IL-6. In the infected dogs, TNF- α and IL-1 β were present at higher concentrations in the brain and spleen, respectively. This study provides support to explain the involvement of TLRs in VL and our data confirm the brain as an affected organ in this disease.

Keywords: central nervous system, inflammation, *Leishmania infantum*

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A leishmaniose é uma doença causada por mais de 20 espécies do protozoário do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida), que são transmitidas por cerca de 30 espécies de mosquitos flebotomíneos e é classificada em duas principais formas: leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral (LV). A LV é uma antropozoonose causada pelo parasito *Leishmania donovani* na Ásia e na África e por *Leishmania infantum* (= *L. chagasi*) na região do Mediterrâneo e nas Américas, incluindo o Brasil (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; LUKEŠ et al., 2007; MAURICIO et al., 2000).

No Brasil, o cão é considerado o principal hospedeiro urbano do parasito *L. infantum*. A apresentação clínica da LV pode variar de cães assintomáticos a manifestações crônicas e sistêmicas, caracterizadas por anemia, perda progressiva de peso, anorexia, letargia, dermatopatias, hepatomegalia, esplenomegalia, lesões oculares, alterações renais e desordens do sistema cardiovascular e respiratório (BLAVIER et al., 2001; CIARAMELLA et al., 1997; GRANO et al., 2016; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ et al., 2017; REIS et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Embora haja diversos relatos de lesões sistêmicas em cães com LV (KOUTINAS; KOUTINAS, 2014), existe um número limitado de estudos descrevendo as alterações no sistema nervoso central (SNC). De fato, não é comum a presença de sinais clínicos neurológicos em cães com LV. De uma população de 215 cães de Araçatuba-SP, avaliada no período de janeiro a novembro do ano de 1999, apenas 4% apresentaram sinais clínicos neurológicos, caracterizados por paraparesia e paraplegia (FEITOSA et al., 2000). Em um estudo mais recente, casos de cães provenientes de uma área da Itália foram avaliados retrospectivamente no período de 2010 a 2015. De 54 cães

com leishmaniose, 10 cães apresentaram sinais clínicos neurológicos, como andar em círculos, *head tilt*, ausência de alguns reflexos neurológicos no exame físico, parestesia, déficits de propriocepção, dor cervical, tetraparesia, estrabismo (GIANNUZZI et al., 2017)

Além dos sinais clínicos neurológicos em cães com LV, foram descritos a deposição de antígenos e imunoglobulinas (GARCÍA-ALONSO et al., 1996) e existem relatos da detecção do parasito no SNC (OLIVEIRA et al., 2017) em meninges (VIÑUELAS et al., 2001), plexo coroide (MÁRQUEZ et al., 2013; NIETO et al., 1996), medula espinhal e parênquima cerebral (MARQUÉZ et al., 2013). Além disso, a detecção do DNA de *Leishmania* também foi relatada no encéfalo (CARDINOT et al., 2016; GRANO et al., 2014; MELO et al., 2015a; OLIVEIRA et al., 2017) e, particularmente, no líquido cefalorraquidiano (GIANNUZZI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017) e na medula espinhal (OLIVEIRA et al., 2017) de cães infectados. Por outro lado, outros autores não detectaram a presença do parasito íntegro no encéfalo (GRANO et al., 2016; IKEDA et al., 2007; MELO; MACHADO, 2009; 2011; MELO et al., 2015a).

O encéfalo é considerado um órgão imunoprivilegiado, o que dificulta a entrada do parasito, de células inflamatórias e de proteínas neste tecido. Em condições normais, ele é protegido da corrente sanguínea por meio de algumas barreiras. A barreira hemato-encefálica (BHE), localizada no endotélio dos vasos sanguíneos cerebrais é composta por células endoteliais que apresentam junções intercelulares do tipo oclusivas (“tight junctions”), com ausência de fenestrações intercelulares (PERSIDSKY et al., 2006; SAUNDERS et al., 2008; WOLBURG; LIPPOLDT, 2002). Os pericitos, a membrana basal, os pedículos dos astrócitos e alguns terminais axônicos são outros componentes que formam a BHE (SAUNDERS et al., 2012). Outra barreira presente no SNC é a barreira hemato-liquórica (BHL), que está presente no epitélio do plexo coroide (DZIEGIELEWSKA et al., 2001).

O comprometimento da BHE já foi relatada em cães com LV (MELO et al., 2015b), o que possibilitaria a entrada de algumas substâncias e células no SNC. A presença de enzimas do grupo das metaloproteinases da matriz, a deposição

de antígenos e imunoglobulinas, assim como a presença de infiltrado de células inflamatórias no plexo coroide, área periventricular e leptomeninges e a ativação de células da glia já foram relatados em cães infectados. Além disso, meningite, coroidite, ativação das células gliais e alterações degenerativas de neurônios também já foram descritas em cães com VL (GARCÍA-ALONSO et al., 1996; GRANO et al., 2016; IKEDA et al., 2007; MACHADO et al., 2010; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2009, 2013, 2015a).

Em estudo anterior nós propusemos duas hipóteses para explicar a neuroinflamação em cães com LV. A primeira seria diretamente relacionada à entrada do parasito no encéfalo, o que estimularia o desenvolvimento da inflamação local. Posteriormente, o parasito poderia ser destruído, por mecanismos ainda desconhecidos, o que dificultaria sua detecção nesse tecido. A segunda hipótese estaria relacionada aos estímulos periféricos, como mediadores inflamatórios, que poderiam chegar ao SNC, desencadeando a inflamação (MELO et al., 2015a)

2 RECEPTORES TIPO TOLL EM CÃES COM LV

O sistema imune inato apresenta um mecanismo de detecção específico para microorganismos por meio de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (MEDZHITOV, 2007). Esses receptores podem ser expressos na superfície celular, em compartimentos intracelulares, ou secretados no sangue e fluidos teciduais (MEDZHITOV et al., 1997). As principais funções dos PRRs incluem opsonização, ativação do complemento e coagulação, fagocitose, ativação de mecanismo de sinalização pró-inflamação e indução da apoptose (JANEWAY; MEDZITHOV, 2002).

Os receptores tipo Toll (TLRs) são PRRs que atuam no reconhecimento de estruturas microbianas e induzem resposta adaptativa e inflamatória (TUON

et al., 2008). Cada um dos TLRs detectam moléculas distintas de vírus, bactérias, fungos e parasitos (KAWAI; AKIRA, 2011). Até hoje, foram identificados 13 TLRs distintos nos mamíferos em geral, que apresentam especificidade para diferentes patógenos e que estimulam a produção de diferentes citocinas (JANSSENS; BEYAERT, 2003). Como revisado por Faria et al. (2012), os TLRs podem ser divididos em extracelulares (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 e 11) ou intracelulares (TLRs 3, 7, 8, 9 e 13), reconhecendo grupos específicos de ligantes na superfície celular ou no compartimento endossomal, respectivamente.

O parasito *L. infantum* é um patógeno intracelular capaz de estimular o sistema imune inato por meio de diferentes PAMPs, dependendo de seu estágio no ciclo de vida. Glicoinositol-fosfolipídeos (GIPLs), lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteína gp63 e o DNA do protozoário são potenciais moléculas de *Leishmania* que se ligam em alguns TLRs de hospedeiros vertebrados (TUON et al., 2008). Além disso, TLRs também podem ser estimulados por proteínas derivadas do hospedeiro, como proteínas do choque térmico (“heat shock proteins”) e fragmentos de fibronectina (AKIRA et al., 2001).

Após o reconhecimento dos PAMPs, TLRs sinalizam ativando cascata que leva à fosforilação de I κ B, liberando NF- κ B (DIDONATO et al., 1996; GHOSH; KARIN, 2002). A ativação de NF κ B é mediada por moléculas adaptadoras, sendo a mais comum denominada de MyD88. Um outro mecanismo seria o recrutamento de TRIF, que transmite sinalização levando à ativação de IRF3 ou pode também induzir à ativação de NF κ B. TLR-3 é o único TLR que atua exclusivamente pelo mecanismo de ativação de TRIF, enquanto os TLRs 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 são restritos à via de ativação de MyD88 e o TLR-4 atua por ambos mecanismos (OSPELT; GAY, 2010; SHASTRI et al., 2013).

A ativação do fator de transcrição NF- κ B induz a produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , interferon tipo 1, interleucina 12 (IL-12), quimiocinas, moléculas de adesão e moléculas co-estimulatórias (GALLEGO et al., 2011; MEDZHITOV, 2001). A produção de citocinas e quimiocinas já foi descrita na LV canina em diversos órgãos, incluindo o SNC (BARBOSA et al.,

2011; MELO et al., 2013; 2015a; PANARO et al., 2009; SANTOS-GOMES et al., 2002).

Até o presente, há poucos estudos na literatura direcionados à investigação dos TLRs na LV canina, sendo que a maioria dos estudos focam os TLRs 2, 4 e 9, especialmente em células mononucleares do sangue periférico (MELO et al., 2014a), jejuno e cólon (FIGUEIREDO et al., 2013), pele, fígado (HOSEIN et al., 2015), baço, linfonodos (HOSEIN et al., 2015; MELO et al., 2014b) e encéfalo (MELO et al., 2014b). Outros estudos também foram realizados com *L. donovani* e *L. major* (FLANDIN et al., 2006; KROPF et al., 2004; KUMAR et al., 2017), sendo que Flandin et al. (2006) verificaram que o TLR-3 também apresenta uma papel no reconhecimento do parasito.

Os TLRs são descritos por existirem e atuarem em dímeros no reconhecimento de PAMPs, conforme revisão feita por Ospelt e Gay (2010). Por exemplo, a sinalização do TLR-2 ocorre por meio da formação de heterodímeros com o TLR-1, TLR-6 ou TLR-10. O TLR-5 pode atuar como homodímero ou pode formar heterodímero com o TLR-4. Não está esclarecido se os TLR-3 e TLR7-9 também requerem multimerização para ativar a cadeia de transdução. Para TLR-9, existem evidências de efeito alostérico (LATZ et al., 2007). Deste modo, o estudo do perfil dos receptores tipo Toll é necessário, já que a resposta imune contra o parasito *Leishmania* pode envolver a cooperação entre múltiplos receptores.

O TLR-2 é um dos receptores com maior número de ligantes. Na formação do heterodímero de TLR-1/2, os dois TLRs atuam em conjunto no reconhecimento de lipopeptídeos triacetilados, presentes principalmente em bactérias como *Mycobacterium tuberculosis* or *Borrelia burgdorferi* (ALEXOPOULOU et al., 2002; TAKEUCHI et al., 2002;). O complexo TLR6/2 reconhece lipopeptídeos diacetilados (OZINSKY et al., 2000). Além disso, outras substâncias como ácido lipoteicoico e peptidoglicanos, assim como o zimosan, presentes em bactérias e micobactérias, respectivamente, foram relatados por também induzir a ativação de TLR-2 (OZINSKY et al., 2000; SCHWANDNER et al., 1999; UNDERHILL et al., 1999). A ativação de TLR-2 já foi relatada em

infecções parasitárias como *Trypanosoma cruzi* or *Schistosoma mansoni* por meio do reconhecimento de proteínas dos parasitos (CAMPOS et al., 2001; OUAISSI et al., 2002; VAN DER KLEIJ et al., 2002).

3 RECEPTORES TIPO TOLL E CITOCINAS NO SNC

No SNC de humanos e camundongos, a microglia expressa mRNA para os TLR 1-9 (OLSON; MILLER, 2004), enquanto oligodendrócitos expressam mRNA para TLRs 2 e 3 (BSIBSI et al., 2002). Os neurônios têm sido relatados por expressarem TLRs intracelulares, como o TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9 (WADACHI; HARGREAVES, 2006; TANG et al., 2007). Já os astrócitos expressam um perfil de TLR limitado, considerando que não são células clássicas do sistema imune, baseado em sua origem ectodérmica, mas se necessário, contribuem para a inflamação (RAJAGOPAL et al., 2007).

Em projeto recente nós avaliamos a expressão gênica dos TLRs 2, 4 e 9 no SNC (encéfalo e plexo coroide) e também no sistema periférico (linfonodos e baço) de cães com LV. Neste trabalho observamos que a expressão gênica desses receptores variou de acordo com o tipo de tecido avaliado, mostrando que a resposta imune na LV é compartimentalizada. Particularmente no encéfalo, foi detectada tendência de aumento de TLR-2 e, no plexo coroide, houve aumento de TLR-2 e TLR-9 em cães infectados, indicando um papel desses TLRs na neuropatogenia da doença (MELO et al., 2014b).

As vias de sinalização por meio de TLRs resultam na produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e moléculas co-estimulatórias (OSPELT; GAY, 2010). As células da micróglia são o centro da regulação inata da resposta inflamatória do SNC e os TLRs controlam a geração da maioria dos mediadores inflamatórios produzidos pela ativação da micróglia (STREIT et al., 2005). Após ativação induzida pelos PAMPs, a microglia tem capacidade de estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e

TNF- α (LEHNARDT, 2010; SUH et al., 2009). Mesmo se a BHE não for comprometida, a microglia pode ser ativada em infecções sistêmicas, o que sugere que PAMPs são capazes de cruzar a BHE ou de ativar a microglia em órgãos circunventriculares. Além disso, macrófagos e citocinas do sistema imune periférico também são capazes de cruzar a BHE, interceptando patógenos invasores e também microglias ativadas (BAKER et al., 2010).

A estimulação de microglia de camundongos com TLRs agonistas levaram à secreção de citocinas incluindo IFN- α , IFN- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α e óxido nítrico (OLSON; MILLER, 2004). Jack et al. (2005) em estudo com ativação da microglia verificaram que TLR-3 induziu intensa resposta pró-inflamatória, com a secreção de citocinas como IL-12, TNF- α , IL-6, IL-10 e IFN- β , enquanto em resposta mediada por TLR-2 houve secreção de IL-6 e IL-1 β , sugerindo que a resposta imune inata pode variar no SNC de acordo com os receptores envolvidos.

Na leishmaniose, as células do sistema fagocitário mononuclear infectadas pelo parasito agem como células apresentadoras de antígeno, ativando linfócitos T CD4+, o que resulta em resposta imune do tipo Th1 ("T helper 1") ou Th2 ("T helper 2"). Cães infectados pelo parasito e clinicamente saudáveis apresentam predomínio de resposta imune do tipo Th1. Esta resposta é mediada pelas citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α , ao contrário do observado em cães infectados sintomáticos, em que há resposta do tipo Th2, principalmente pela produção de IL-4, IL-10 e TGF- β (BARBIÉRI, 2006; REIS et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; STRAUSS-AYALI et al., 2005).

Em estudo anterior foram avaliadas algumas citocinas com atividade pró e anti-inflamatórias no encéfalo de cães com LV por meio de RT-qPCR. Os resultados mostraram maior expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α (MELO et al., 2013), o que sugere que a produção dessas citocinas no SNC poderia contribuir para explicar as lesões inflamatórias previamente relatadas na literatura.

Frente à necessidade de investigar os mecanismos envolvidos na ocorrência do processo inflamatório encefálico observado previamente em cães

com leishmaniose visceral, bem como de esclarecer a patogenia da doença no SNC, propomos avaliar os sensores do sistema imune inato relacionados ao reconhecimento de antígenos do parasito, por meio da investigação do perfil de TLRs, bem como avaliar a produção de citocinas pró-inflamatórias no encéfalo de cães infectados naturalmente por *L. infantum*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Investigar o perfil gênico de receptores tipo Toll e produção de citocinas no SNC (representado pelo encéfalo) e na periferia (representada aqui pelo baço) em cães com leishmaniose visceral.

4.2 Objetivos Específicos

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a expressão gênica dos TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 no encéfalo e no baço de cães com LV.
- Detectar e quantificar as citocinas: IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no encéfalo e no baço de cães com LV.
- Avaliar a carga parasitária de *Leishmania spp.* no encéfalo e no baço de cães com LV.
- Correlacionar o perfil de receptores tipo Toll com a carga parasitária de *Leishmania* no encéfalo e no baço.
- Correlacionar o perfil de receptores tipo Toll com o estagiamento clínico dos animais.

- Correlacionar os receptores tipo Toll e a produção de citocinas no encéfalo e no baço.
- Caracterizar as lesões inflamatórias encefálicas em cães com LV.
- Correlacionar a intensidade das lesões inflamatórias encefálicas com a expressão dos receptores tipo Toll, com a produção de citocinas e com o estagiamento clínico dos animais.

5 REFERÊNCIAS

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nat. Immunol.**, v.2, p.675 – 680, 2001.

ALEXOPOULOU, L.; THOMAS, V.; SCHNARE, M.; LOBET, Y.; ANGUITA, J.; SCHOEN, R.T.; MEDZHITOV, R.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R.A. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2- deficient mice. **Nat. Med.**, v.8, p.878–884, 2002.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v.57, p.1-88, 2004.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v.24, p.324-330, 2008.

BAKER, B.J.; PARK, K.W.; QIN, H.; MA, X.; BENVENISTE, E.N. IL-27 inhibits OSM-mediated TNF-alpha and iNOS gene expression in microglia. **Glia.**, v.58, p.1082–1093, 2010.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.28, p.329–377, 2006.

BARBOSA, M.A.G.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SOARES-CLEMENTE, M.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O.R.; DE BRITO, T.V.; DA FONSECA, I.P.; ALVES, L.C.; SANTOS-GOMES, G.M. Cytokine gene expression in the tissues

of dogs infected by *Leishmania infantum*. **J. Comp. Pathol.**, v.145, p.336-344, 2011.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORE, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Vet. J.**, v.162, p.108–120, 2001.

BSIBSI, M.; RAVID, R.; GVERIC, D.; VAN NOORT, J.M. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.61, p.1013–1021, 2002.

CAMPOS, M.A.; ALMEIDA, I.C.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; VALENTE, E.P.; PROCÓPIO, D.O.; TRAVASSOS, L.R.; SMITH, J.A.; GOLENBOCK, D.T.; GAZZINELLI, R.T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J. Immunol.**, v.167, p.416-423, 2001.

CARDINOT, C.B.; SILVA, J.E.; YAMATOGLI, R.S.; NUNES, C.M.; BIONDO, A.W.; VIEIRA, R.F.; JUNIOR, J.P.; MARCONDES, M. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* DNA in the brain of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **J. Parasitol.**, v. 102, p.275-9, 2016.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONE, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.141, p.539-543, 1997.

DIDONATO, J.; MERCURIO, F.; ROSETTE, C.; WU-LI, J.; SUYANG, H.; GHOSH, S.; KARIN, M. Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation, **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, p.1295–1304, 1996.

DZIEGIELEWSKA, K.M.; EK, J.; HABGOOD, M.D.; SAUNDERS, N.R. Development of the choroid plexus. **Microsc. Res. Tech.**, v.52, p.5–20, 2001.

FARIA, M.S.; REIS, F.C.G.; LIMA, A.P.C.A. Toll-Like receptors in *Leishmania* Infections: guardians or promoters? **J. Parasitol. Res.**, v.2012, p.930257, 2012.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Rev. Clín. Vet.**, v. 28, p. 36-44, 2000.

FIGUEIREDO, M.M.; AMORIM, I.F.G.; PINTO, A.J.W.; BARBOSA, V.S.; PINHEIRO, L.J.; DEOTI, B.; FARIA, A.M.C.; TAFURI, W.L. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC Immunol.**, v.14, p.22, 2013.

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v.36, p. 411–420, 2006.

GALLEGO, C.; GOLENBOCK, D.; GOMEZ, M.A.; SARAVIA, N.G. Toll-like receptors participate in macrophage activation and intracellular control of *Leishmania (Viannia) panamensis*. **Infect. Immun.**, v.79, p. 2871-2879, 2011.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, A.G.; BLANCO, A.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunol.**, v.18, p.539-546, 1996.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. **Cell**, v.109, p 81–96, 2002.

GIANUZZI, A.P.; RICCIARDI, M.; DE SIMONE, A.; GERNONE, F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. **J. Small Anim. Pract.**, v.58, p.125-138, 2017.

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

MACHADO, G.F. First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 204, p.376-380, 2014.

GRANO, F.G.; SILVA J.E.S.; MELO G.D.; PEROSSO J.; LIMA V.M.F.; MACHADO G.F. T lymphocyte immunophenotypes in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet. Parasitol.**, v.232, p.12-20, 2016.

HOSEIN, S.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; BLAKE, D.P.; ALLENSPACH, K.; ALBEROLA, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Transcription of Toll-Like Receptors 2, 3, 4 and 9, FoxP3 and Th17 Cytokines in a Susceptible Experimental Model of Canine *Leishmania infantum* Infection. **PLoS One**, v.10, n.10, p.e0140325, 2015.

IKEDA, F.A.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; FEITOSA, M.M.; MACHADO, G.F.; PERRY, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.44, p.5-11, 2007.

JACK, C.S.; ARBOUR, N.; MANUSOW, J.; MONTGRAIN, V.; BLAIN, M.; MCCREA, E.; SHAPIRO, A.; ANTEL, J.P. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. **J. Immunol**, v.175, p.4320-4330, 2005.

JANEWAY JUNIOR, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, p.197-216, 2002.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. **Clin. Microbiol.**, v.16, p.637–646, 2003.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v.34, n.5, p.637-50, 2011.

KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Vet. Pathol.**, v.51, p. 313-314, 2014.

KROPF, P.; FREUDENBERG, M.A.; MODOLLER, M.; PRICE, H.P.; HERATH, S.; ANTONIAZI, S.; GALANO, C.; SMITH, D.F.; MULLER, I. Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 1920–1928, 2004.

KUMAR, V.; TIWARI, N.; GEDDA, M.R.; HAQUE, R.; SINGH, R.K. *Leishmania donovani* infection activates TLR 2, 4 expressions and TGF- β mediated apoptosis in renal tissues. **Braz. J. Infect. Dis.**, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.04.007>. Acesso em: 15 jul. 2017.

LATZ, E.; VERMA, A.; VISINTIN, A.; GONG, M.; SIROIS, C.M.; KLEIN, D.C.; MONKS, B.G.; MCKNIGHT, C.J.; LAMPHIER, M.S.; DUPREX, W.P.; ESPEVIK, T.; GOLENBOCK, D.T. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. **Nat. Immunol.**, v. 8, p.772–779, 2007.

LEHNARDT S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. **Glia**, v.58, p.253-263, 2010.

LUKEŠ, J.; MAURICIO, I.L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J.C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.P.; KUHL, K.; TINTAYA, K.W.Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVA, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M.; HORAK, A.; AYALA, F.J.; MILES, M.A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.104, p.9375–9380, 2007.

MACHADO, G.F.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; MARCONDES, M.; PERRI, S.H.V.; VASCONCELOS, R.O. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.136, p. 340–345, 2010.

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J.R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.25, p.142–146, 2013.

MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, L.; CASAMIAN-SORROSAL, D.; BARRERA-CHACÓN, R.; CUESTA-GERVENO, J.M.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; GÓMEZ-NIETO, L.C.; DUQUE-CARRASCO, F.J. Comparison of myocardial damage among dogs at different stages of clinical leishmaniasis and dogs with idiopathic chronic kidney disease. **Vet. J.**, v.221, p.1-7, 2017.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v.16, p.188–189, 2000.

MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v.449, p.819–826, 2007.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v.1, 2001.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C.A.JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v.388, p.394–397, 1997.

MELO, G.D.; MACHADO, G.F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral leishmaniasis: a histopathological investigation. **Braz. J. Vet. Pathol.**, v.2, p. 69-74, 2009.

MELO, G.D.; MACHADO, G.F. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. **Cell Tissue Res.**, v.346, p.293-304, 2011.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v.162, p.248-256, 2009.

MELO, G.D.; SILVA, J.E.S.; GRANO, F.G.; HOMEM, C.G.; MACHADO, G.F. Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.36, p.726-731, 2014b.

MELO, G.D.; SILVA, J.E.; GRANO, F.G.; SOUZA, M.S.; MACHADO, G.F. Leishmania infection and neuroinflammation: Specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally-infected dogs. **J. Neuroimmunol.**, v.289, p.21-29, 2015a.

MELO, G.D.; GRANO, F.G.; SILVA, J.E.S.; KREMER, B.E.; LIMA, V.M.F.; MACHADO, G.F. Blood-brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.37, p.635-645, 2015b.

MELO, G.D.; SERAGUCI, T.F.; SCHWEIGERT, A.; SILVA, J.E.S.; GRANO, F.G.; PEIRÓ, J.R.; LIMA, V.M.F.; MACHADO, G.F. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Vet. Parasitol.**, v.192, p.57– 66, 2013.

MELO, L.M.; PEROSSO, J.; ALMEIDA, B.F.M.; SILVA, K.L.O.; SOMENZARI, M.A.; LIMA, V.M.F. Effects of P-MAPA immunomodulator on Toll-like receptor 2, ROS, nitric oxide, MAPKp38 and IKK in PBMC and macrophages from dogs with visceral leishmaniasis. **Int. Immunopharmacol.**, v.18, p.373-378, 2014a.

NIETO, C.G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCIA-ALONSO, M.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Vet. Rec.**, v.139, p.346-347, 1996.

OLIVEIRA, V.D.C.; BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C.; FIGUEIREDO, F.B.; CAMPOS, M.P.; DE CARVALHO RODRIGUES, F.D.C.; CARVALHAES DE OLIVEIRA, R.V.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MENEZES, R.C. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: parasite load, viability, co-infections

and histological alterations. **PLoS One**, v.12, n.4, p.e0175588, 2017.

OLSON, J.K.; MILLER, S.D. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. **J. Immunol.**, v.173, p.3916–3924, 2004.

OSPELT, C.; GAY, S. TLRs and chronic inflammation. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.42, p.495–505, 2010.

OUAISSI, A.; GUILVARD, E.; DELNESTE, Y.; CARON, G.; MAGISTRELLI, G.; HERBAULT, N.; THIEBLEMONT, N.; JEANNIN, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. **J. Immunol.**, v.168, p.6366-6374, 2002.

OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; FONTENOT, J.D.; HAJJAR, A.M.; SMITH, K.D.; WILSON, C.B.; SCHOEDER, L.; ADEREM, A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.13766-13771, 2000.

PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; CIANCIULLI, A.; CAVALLO, P.; LACASELLA, V.; PARADIES, P.; TESTINI, G.; CAPRARIIS, D.D.; MITOLO, V.; OTRANTO, D. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**, v.136, p.823-831, 2009.

PERSIDSKY, Y.; RAMIREZ, S.H.; HAORAH, J.; KANMOGNE, G.D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions, **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v.1, p.223–236, 2006.

RAJAGOPAL, N.A.; PETERSON, P.K.; LOKENSGARD, J.R. Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v.2, p.297-312, 2007.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.128, p.87–95, 2009.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.88, p.21-30, 2002.

SAUNDERS, N.R.; EK, C.J.; HABGOOD, M.D.; DZIEGIELEWSKA, K.M. Barriers in the brain: a renaissance? **Trends Neurosci.**, v.31, p.279–86, 2008.

SAUNDERS, N.R.; LIDDELOW, S.A.; DZIEGIELEWSKA, K.M. Barrier mechanisms in the developing brain. **Front. Pharmacol.**, v. 3, p.46, 2012.

SCHWANDNER, R.; DZIARSKI, R.; WESCHE, H.; ROTHE, M.; KIRSCHNING, C.J. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.25, p.17406-9, 1999.

SHASTRI, A.; BONIFATI, D.M.; KISHORE, U. Innate immunity and neuroinflammation. **Mediators Inflamm.**, v.2013, p.342931, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRO, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit. Vectors**, v.4, p.86, 2011.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S.; OKANO, F.; JAFFE, C.L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **Int. J. Parasitol.**, v.35, p.63–73, 2005.

STREIT, W.J.; CONDE, J.R.; FENDRICK, S.E.; FLANARY, B.E.; MARIANI, C. L. Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurol. Res.**, v. 27, p.685–691, 2005.

SUH, H.S.; BROSNAN, C.F.; LEE, S.C. Toll-like receptors in CNS viral infections. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.336, p.63–81, 2009.

TAKEUCHI, O.; SATO, S.; HORIUCHI, T.; HOSHINO, K.; TAKEDA, K.; DONG, Z.; MODLIN, R.L.; AKIRA, S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. **J. Immunol.**, v.169, p.10-14, 2002.

TANG, S.C.; ARUMUGAM, T.V.; XU, X.; CHENG, A.; MUGHAL, M.R.; JO, D.G.; LATHIA, J.D.; SILER, D.A.; CHIGURUPATI, S.; OUYANG, X.; MAGNUS, T.; CAMANDOLA, S.; MATTSON, M.P. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. **Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.**, v.104, p.13798–13803, 2007.

TUON, F.F.; AMATO, V.S.; BACHA, H.A.; ALMUSAWI, T.; DUARTE, M.I.; NETO, V.A. Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v.76, p.866–872, 2008.

UNDERHILL, D.M.; OZINSKY, A.; SMITH, K.D.; ADEREM, A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.14459-14463, 1999.

VAN DER KLEIJ, D.; LATZ, E.; BROUWERS, J.F.; KRUIZE, Y.C.; SCHMITZ, M.; KURT-JONES, E.A.; ESPEVIK, T.; DE JONG, E.C.; KAPSENBERG, M.L.; GOLENBOCK, D.T.; TIELENS, A.G.; YAZDANBAKHSH, M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.48122-48129, 2002.

VIÑUELAS, J.; GARCIA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Meningeal leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Vet.**

Parasitol., v.101, n.1, p.23-27, 2001.

WADACHI, R.; HARGREAVES, K.M. Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection. **J. Dent. Res.**, v.85, p.49–53, 2006.

WEN, X.; HE, L.; CHI, Y.; ZHOU, S.; HOELLWARTH, J.; ZHANG, C.; ZHU, J.; WU, C.; DHESI, S.; WANG, X.; LIU, F.; SU, C. Dynamics of Th17 Cells and Their Role in *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 Mice. **PloS Negl. Trop. Dis.**, v.5, p.e1399, 2011.

WOLBURG, H.; LIPPOLDT, A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. **Vascul. Pharmacol.**, v.38, p.323–337, 2002.