

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 DE FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS
NO PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

José Eduardo dos Santos Silva
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2017

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

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS
NO PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

**José Eduardo dos Santos Silva
Orientadora: Prof.^a Adjunto Gisele Fabrino Machado**

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

ARAÇATUBA – SP
2017

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

Silva, José Eduardo dos Santos

S729o

Investigação de fatores pró-inflamatórios no plexo coroide de cães com leishmaniose visceral / José Eduardo dos Santos Silva.

Araçatuba: [s.n], 2017.

72f. il.

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

Orientadora: Profa. Adj. Gisele Fabrino Machado

1. Barreira hematoencefálica. 2. CCL-5. 3. Inflamação. 4. Leishmania. 5 Quimiocinas I. T.

CDD 616.9364



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: Investigação de fatores pró-inflamatórios no plexo coroide de cães com leishmaniose visceral


AUTOR: JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS SILVA
ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor 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


Profa. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução 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 Indaiatuba/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 DO AUTOR

JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS SILVA – Araçatuba – SP, 23 de outubro de 1985. Graduou-se como bolsista integral em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, São Paulo em dezembro de 2010. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC de 2008 a 2009. Mestre em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo em julho de 2013. Durante o mestrado realizou estágio de pesquisa no Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, cidade de Lisboa, Portugal, entre março e maio de 2013, com bolsa BEPE da FAPESP. Ingressou no programa de doutorado da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo, em Março de 2014, sob orientação da Professora Adjunto Gisele Fabrino Machado. Durante o doutorado realizou estágio de pesquisa na Universidad Autònoma de Barcelona, cidade de Bellaterra, Espanha, entre novembro de 2015 e novembro de 2016 com bolsa BEPE da FAPESP.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

Dedico

Aos meus pais Iraci e José (*in memoriam*)
e ao meu tio Dinho (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Adjunto Gisele Fabrino Machado, pela orientação, conselhos e paciência ao longo dos setes convivendo juntos.

À Professora Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima pelo total apoio na realização dos ELISAS de citocinas e sorologia dos animais estudados, além de todo conhecimento compartilhado.

À Professora Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto pelo apoio científico e conceder estrutura física e microscopia para captura e análise de imagem fundamentais para avaliação dos resultados do projeto.

À Professora Assistente Sueli Regina Bomfim pelas análises bioquímica realizadas em seu laboratório.

Ao Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles pelo apoio científico e conceder estrutura física para o desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani, Profa. Sueli Regina Bomfim pelas sugestões e pelo tempo dedicado à avaliação do meu estudo.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, pela disponibilização dos meios necessários para desenvolvimento dessa Tese.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa (#2016/14828-9) que originou a presente tese, bem como pela concessão da bolsa de doutorado (#2014/01209-9), e bolsa de estágio no exterior (#2015/13865-5), que foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa.

A Universidad Autònoma de Barcelona em especial à Professora Doutora Laia Solano-Gallego e sua equipe: Pamela Martinez-Orellana, Sara Montserrat, Aruanai Rivas, Vito Priolo, Laura Ordeix pelo apoio durante a realização do estágio de pesquisa na Universidad Autònoma de Barcelona, Espanha.

Aos meus irmãos, tios e primos pelo apoio e admiração e principalmente pelo amor incondicional.

Ao meu tio Dinho (*in memoriam*) que sempre me incentivou a estudar, foi quem sempre fez questão de comprar meus materiais escolares desde a primeira série do ensino fundamental até meus materiais da faculdade. Obrigado por sempre ter vibrado comigo por minhas vitórias como se fossem as suas. Não tive a oportunidade de me despedir dele, me deixou com o abraço de boa sorte em minha jornada em Barcelona, mas tenho a grande certeza que está no céu sempre torcendo por mim. Te amo!

Ao Xavier Blanch que mesmo distante se fez presente em todos os momentos proporcionando-me apoio e incentivo para conclusão desse sonho.

Aos amigos, Fernanda, Milena, Guilherme e Camila não somente pela imensa colaboração no desenvolvimento desse projeto, como também por muitos momentos de alegria e companheirismo, apoio científico e confiança. Levarei vocês aonde quer que eu vá no meu coração.

Aos colegas pós-graduandos, Larissa, Gabriela, Lívia, Kathlenn, Bruna, Jaqueline, Hugo, Ana Lucia, Elis e Vinicius pelo apoio, conselhos e troca de experiências durante os momentos de descontrações.

A técnica de laboratório Flávia por sua doçura e paciência para auxiliar na execução dos experimentos

Aos funcionários do Centro de Zoonoses de Araçatuba pela contribuição e auxílio no manejo com os animais.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FMVA-UNESP pelo apoio, informações e principalmente pela paciência em sanar dúvidas.

Aos animais, que involuntariamente cederam suas vidas para a realização dessa pesquisa.

A Deus pela oportunidade de concretizar meus sonhos e o do meu pai que, com sua humildade e “ignorância”, sempre me dizia que lutaria para que um dia eu me torna-se um doutor.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 Leishmaniose Visceral.....	16
1.2 Citocinas.....	17
1.2.1 Quimiocinas	18
1.3 Leishmaniose Visceral Canina e a Sistema Imunológico	19
1.4 Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio	20
1.5 Plexo Coroide	21
1.6 Sistema Nervoso Central e a Leishmaniose Visceral Canina.....	23
2 OBJETIVOS.....	24
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO ENCÉFALO E DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL	37
RESUMO	37
ABSTRACT.....	38
1 INTRODUÇÃO.....	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Aprovação do Comitê de Ética	41
2.2 Animais	41
2.3 Colheita de Amostras.....	42
2.4 Estadiamento Clínico	43
2.5 Análise histológica do encéfalo.....	43
2.6 Avaliação da expressão gênica de citocinas e quimiocinas por meio de RT-qPC	44
2.7 Quantificação de DNA de <i>Leishmania</i> em plexo coroide por meio de qPCR.....	45

2.8 Avaliação de níveis de albumina em soro e liquor.....	46
2.9 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> em liquor	46
2.10 Ensaio para detecção das citocinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no Soro e liquor	46
2.11 Análise Estatística.....	47
3 RESULTADOS.....	47
3.1 Estadiamento Clínico	47
3.2 Avaliação do infiltrado inflamatório no encéfalo dos cães com LV	48
3.3 Expressão gênica de citocinas e quimiocinas no plexo coroide	49
3.4 Ensaio para detecção das citocinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no soro e liquor	49
3.5 Quantificação de DNA de <i>Leishmania</i> em PC por meio de qPC	49
3.6 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> em liquor	50
3.7 Avaliação de níveis albumina em soro e liquor	50
4 DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÕES	71

LISTA DE ABREVIATURAS

°C =	grau Celsius
BHE =	barreira hematoencefálica
BHL =	barreira hematoliquórica
PC =	plexo coroide
IFN- γ =	interferon gama
IL-1 =	interleucina 1
IL-6 =	interleucina 6
LV =	leishmaniose visceral
LVC =	leishmaniose visceral canina
p =	probabilidade
SNC =	sistema nervoso central
TGF- β =	fator de crescimento transformador beta
QA =	quociente de albumina
Th1 =	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 1
Th2 =	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 2
TNF- α =	fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Página

- FIGURA 1 – Fotomicrografias representativas da intensidade do infiltrado inflamatório no encéfalo de cães com LV. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto em subepêndima (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado em leptomeninges (seta). **(C)** Infiltrado inflamatório acentuado em PC (seta). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μm51
- FIGURA 2 – Porcentagem de cães com inflamação classificada de acordo com a intensidade quando observada nas leptomeninges, subepêndima e PC.....53
- FIGURA 3 – Formas amastigotas de *Leishmania infantum* em plexo coroide. **A)** formas amastigotas de *Leishmania infantum* no interior de macrófagos (setas) em corte histológico coloração HE. **B)** formas amastigotas de *Leishmania infantum* (setas) detectadas por Imunohistoquímica, revelado por DAB. Barra 50 μm54
- FIGURA 4 – Expressão gênica média relativa de citocinas e quimiocinas em PC de cães com leishmaniose visceral. Os valores, na escala logarítmica na base 10, indicam quantas vezes (*fold change*) o gene para as citocinas e quimiocinas está mais expresso (valores positivos) ou menos expresso (valores negativos) em relação aos cães do grupo controle. O fator de normalização foi o gene de referência G3PDH e o gene RPL-32 segundo o método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * Indica $P < 0.05$, $\pm 0.05 < p < 0.1$ Indica tendência de aumento da expressão gênica.....55
- FIGURA 5 – Determinação da concentração de Albumina, quociente de albumina em soro e liquor e anticorpos anti-*Leishmania* em liquor de cães com LV. **A)** albumina em liquor (valor de referência 2600-3300 mg/dL), **B)** albumina em soro (valor de referência <10 mg/dL), **C)** valor estabelecido para quociente de albumina em liquor de cães com LV foi <0,64, **D)** Concentração de anticorpos anti- *Leishmania* foi <0,309. Linha horizontal indica a mediana. Linha pontilhada indica valor de referência..... 56

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Intensidade de inflamação em diferentes áreas encefálicas de cães com LV.....	52
--	----

INVESTIGAÇÃO DE FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS EM PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que causa manifestações clínicas variadas em cães, incluindo alterações neurológicas, entretanto, existem poucos relatos que caracterizam as lesões observadas e que contribuem para elucidar a patogenia da forma neurológica da LV. O plexo coroide (PC) forma uma importante interface entre o liquor e o sistema periférico vascular, e é uma estrutura com potencial para permitir a passagem de células inflamatórias no sistema nervoso central além de servir como fonte de mediadores inflamatórios. O objetivo deste estudo foi avaliar as lesões encefálicas incluindo o PC em cães com LV e avaliar a possível participação do PC como estrutura produtora de mediadores pró-inflamatórios como citocinas (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α) e quimiocinas (CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-10), e disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) através da presença de albumina, anticorpo anti- *Leishmania* no liquor e também pelo quociente de albumina o que poderia facilitar a passagem de células imunes e contribuir para as alterações inflamatórias encefálicas. Foi observado infiltrado inflamatório variando de leve a acentuado principalmente em PC e meninges. Aumento na expressão gênica de CCL-5 e tendência no aumento da CXCL-10 em PC de cães infectados. Presença de formas amastigotas e DNA de *Leishmania* no PC, além de anticorpos anti-*Leishmania* e albumina no liquor de cães com LV. Esses resultados indicam que há disfunção da BHE em cães com LV e que a CCL-5 poderia ser produzida pelo PC, por outro lado, esse tecido não se mostrou contribuir ativamente na produção de outras citocinas avaliadas nesse estudo.

Palavras-chave: barreira hematoencefálica, CCL-5, inflamação, *Leishmania*, quimiocinas

INVESTIGATION OF PRO-INFLAMMATORY FACTORS IN CHOROID PLEXUS OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIOSIS

SUMMARY – Visceral leishmaniasis (VL) is a disease that causes several clinical manifestations in dogs, including neurological alterations, however, there are few reports that characterize the lesions observed and that contribute to elucidate the pathogenesis of the neurological form of VL. The choroid plexus (CP) forms an important interface between the cerebrospinal fluid and the vascular peripheral system, and is a structure with the potential to allow the passage of inflammatory cells into CNS and serve as a source of inflammatory mediators. The objective of this study was to evaluate brain lesions including CP in dogs with VL and to evaluate the possible participation of CP as a producer of pro-inflammatory mediators such as cytokines (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α) and chemokines (CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-10), and blood brain barrier (BBB) dysfunction through the presence of albumin, antibody anti-*Leishmania* in the cerebrospinal fluid and also by the albumin quotient facilitate the passage of immune cells and contribute to inflammatory brain disorders. Inflammatory infiltrates were observed ranging from mild to severe, mainly in CP and meninges. Increased gene expression of CCL-5 and tendency to increase CXCL-10 in CP from infected dogs. Presence of amastigotes and *Leishmania* DNA in CP, as well as anti-*Leishmania* antibodies and albumin in the cerebrospinal fluid of dogs with VL. These results indicate that there is dysfunction of BBB in dogs with VL and that CCL-5 could be produced by CP, on the other hand, this tissue did not prove to actively contribute to the production of other cytokines evaluated in this study.

Keywords: blood-brain barrier, CCL-5, chemokines, inflammation, *Leishmania*

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Leishmaniose visceral

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) (BANETH et al., 2008; LUKEŠ et al., 2007).

A LV, também conhecida como Calazar é uma doença protozoária, causada pela *Leishmania donovani* (no velho mundo) e *Leishmania infantum chagasi* (no novo mundo) (MAURICIO et al., 2000). Esta doença está classificada entre as doenças tropicais como a quarta em morbidade e segunda em mortalidade com 20.000 a 40.000 mortes por ano no mundo (ALVAR et al., 2012).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é endêmica em aproximadamente 50 países entre a América do Sul e a região do Mediterrâneo (BANETH et al. 2008), isso devido as condições climática e ecológica que favorecem a proliferação do vetor (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O cão e o homem são os principais hospedeiros desse parasito, entretanto a presença da *Leishmania* já foi detectada em canídeos silvestres (LUPPI et al., 2008), gatos (VIDES et al., 2011), marsupiais (SANTIAGO et al., 2007) e roedores (OLIVEIRA et al., 2005).

Ao longo do seu ciclo de vida as espécies de *Leishmania* possuem duas formas. A forma promastigota metacíclica, que é flagela e encontrada no trato

intestinal dos vetores, é transmitida ao hospedeiro pela fêmea do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo e a forma amastigota, aflagelada, sendo parasito intracelular de células fagocitárias como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (BATES, 2007; KAYE; SCOTT, 2011).

Após interação com o sistema imune na pele e transformação das formas promastigotas metacíclicas em amastigotas, os parasitos são transportados por macrófagos infectados para os linfonodos regionais (SARIDOMICHELAKIS, 2009). O resultado da infecção pode variar dependendo de alguns fatores relacionados com o vetor, a *Leishmania* e resposta imune do hospedeiro (BAÑULS et al., 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Esta enfermidade também pode ser encontrada em pessoas com o vírus da imunodeficiência como co-infecção (ABDALMAULA et al., 2013), entretanto pessoas imuno competentes também podem se infectar com essa enfermidade (HORRILLO et al. 2015). Além disso, a LV em humanos tem sido relacionado ao aumento dos casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (NUNES et al., 2010).

A LVC é considerada uma doença crônica, cujos sinais clínicos são variados e alguns são imunomediados. Entre eles os mais frequentemente observados são perda de peso, onicogribose, linfadenomegalia, epistaxe, letargia, pneumonia, miocardite, além de alterações dermatológicas, renais, hepáticas, esplênica e oculares, distúrbios locomotores e alterações neurológicas (FEITOSA et al., 2000; BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010; HOSEIN et al., 2016).

A progressão da doença e prognóstico está relacionada ao tipo de resposta imune que o hospedeiro pode estabelecer frente a infecção (HOSEIN et al., 2016).

1.2 Citocinas

As citocinas são proteínas e glicoproteínas que atuam como mediadores na comunicação celular, enviam sinais que estimulam, modulam ou até mesmo inibem as células imunes. São produzidas devido a lesão tecidual, infecção e inflamação. Sendo secretadas como precursores inativos que precisam ser clivados por enzimas específicas para exercer sua função biológica, sendo então sua produção controlada. Suas atividades podem ser redundantes, ou seja, diferentes citocinas podem resultar nas mesmas funções. Além disso, uma citocina podem estimular uma célula para produzir outras citocinas, agindo como uma cascata. Entretanto, também podem inibir a produção de outras atuando de forma antagônicas (ZANG; AN., 2007)

A transmissão do sinal é feita por meio de receptores específicos localizados nas membranas celulares. Dentro da classe de citocinas estão as interleucinas, interferons, fatores de crescimento, fatores de necrose tumoral e quimiocinas (ALLAN; ROTHWELL, 2001; KADHIM et al., 2008).

1.2.1 Quimiocinas

As Quimiocinas compõem uma superfamília de proteínas de baixo peso molecular (8-14 kDa) que atuam na resposta imune, principalmente na ativação e o tráfego de leucócitos (BENDALL et al., 2005, VIGDAL; KALLIKOUDIS, 2017). As quimiocinas estão subdivididas em quatro subfamílias, de acordo com a posição de seus resíduos de cisteína: CXC (ou α -quimiocinas), CC (ou β -quimiocinas), C e CX₃C (VIGDAL; KALLIKOUDIS, 2017).

Dentre elas encontram-se as quimio atraentes de monócitos, as β -quimiocinas representada pela MCPs -1 e -2 (CCL-2 e CCL-8, respectivamente), as proteínas inflamatórias de macrófagos representada pela MIPs -1 α e -1 β (CCL-3 e CCL-4, respectivamente) e as proteínas secretadas e expressadas por linfócitos T, as RANTES (CCL-5), que são altamente atraentes para macrófagos

e monócitos, diversas subpopulações de linfócitos, células dendríticas e células *natural killer* (NK) (BENDALL, 2005; RABIN, 2003).

Entre as α -quimiocinas encontra-se a CXCL-10 (proteína 10 induzida por IFN- γ ou IP-10), cuja principal função é regular a migração de células Th1 efetoras ao local da inflamação, durante a resposta imune adaptativa (BENDALL, 2005; MURPHY; 2003).

1.3 Leishmaniose Visceral Canina e o Sistema Imunológico

A LVC é considerada uma doença imunomediada devido a capacidade do parasito em modificar o sistema imunológico do hospedeiro (BARBIÉRI, 2006). Algumas lesões na LVC são decorrentes da deposição de imunocomplexos que levam a vasculite em pele, olhos e rins (HOSEIN et al., 2016).

A resposta imunológica pode ser desencadeada por compostos de antígenos de superfície do parasito ou substâncias produzidas pelo protozoário (SANTARÉM et al., 2010).

Durante LVC, as células mononucleares fagocitárias infectadas por *Leishmania* atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando linfócitos T auxiliares CD4⁺ tipo 1 e 2 (Th1 e Th2) (HOSEIN et al., 2016).

A resposta do tipo Th1 produzem uma resposta celular associado com a produção de citocinas como interferon-gama (IFN- γ), interleucina dois (IL-2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que ativam os macrófagos. Após a ativação, os macrófagos, por sua vez, estimulam a resposta celular pela ativação de outras células ou por sua proliferação. Por outro lado, a resposta Th2 resulta em resposta humoral associada com a produção de citocinas como a interleucina quatro (IL-4), interleucina dez (IL-10), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), o que favorece a sobrevivência do parasito, ocasionando lesões

pelas ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (HOSEIN et al., 2016), e também ativação de linfócitos B estimulando a produção de anticorpos, não obtendo uma resposta eficiente contra a infecção (BARBIÉRI, 2006; HOSEIN et al., 2016; REIS et al., 2009). Entretanto, alguns estudos indicam que pode haver uma associação entre Th1 e Th2 (HOSEIN et al., 2016).

Alguns trabalhos comprovam que cães com LV sintomáticos possuem uma falha de resposta celular específica, caracterizada por redução na resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* e uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ (PINELLI et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Além da imunossupressão, fatores como raça, doenças concomitantes (MIRÓ et al., 2008) e até mesmo a virulência do parasito podem influenciar na resposta imune do hospedeiro (MARTIM-MARTIM et al., 2008).

1.4 Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio

Em condições normais o Sistema Nervoso Central (SNC) é considerado um local imunologicamente privilegiado (SHIMADA; HASEGAWA-ISHII, 2017), esse imunoprivilégio está relacionado à baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade, ao reduzido número de células apresentadoras de antígeno e à eficiência das barreiras hematoencefálica (BHE) e hematoliquórica (BHL) (BALLABH et al., 2004; GALEA et al., 2007).

A BHE é composta por uma camada de células endoteliais, com junções intercelulares do tipo oclusivas (“*tight junctions*”). Além disso, é envolvida por pericitos, membrana basal, macrófagos perivasculares e pés terminais de astrócitos. Esta barreira encontra-se entre a luz de vasos sanguíneos e o parênquima nervoso (DANIELSKI et al., 2017).

A principal função BHE é limitar a saída de substâncias do sangue e o tráfego de leucócitos dentro do SNC, entretanto, estudos indicam que leucócitos ativados são capazes de cruzar a mesma e realizar a vigilância imunológica do SNC (ABBOTT et al., 2010). A BHE é encontrada em todo o SNC, com exceção do PC e áreas adjacentes aos ventrículos cerebrais (órgãos circunventriculares) (KUAR et al., 2016).

As células residentes como os astrócitos e micróglia conferem uma resposta imunológica específica ao SNC e regulam o processo inflamatório nesse tecido (BAILEY et al., 2006). Além disso, elas podem responder a estímulos periféricos como citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , produzidas por células imunes periféricas resultando em síntese de citocinas e quimiocinas no SNC que podem causar ou potencializar lesões no encéfalo (PAVLOV; TRACEY, 2006; TIAN et al., 2012). Mostrando assim uma comunicação ativa entre a vigilância imunológica do SNC e o sistema imune periférico (SHIMADA; HASEGAWA-ISHII, 2017).

1.5 Plexo Coroide

O PC é uma estrutura especializada localizada nos ventrículos laterais, e terceiro e quarto ventrículos (KAUR et al., 2016). É altamente vascularizado e composto por uma camada simples de células epiteliais cuboides que são continuação das células endoteliais (SHIMADA; HASEGAWA-ISHII, 2017). Tradicionalmente, esta estrutura é considerada responsável pela produção e secreção do líquido cefalorraquidiano, também conhecido como liquor (VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003; KAUR et al., 2016). O liquor é produzido constantemente, sendo transparente, estéril e sem a presença de sangue. Confere ao cérebro e a medula espinhal proteção mecânica contra impactos. Considerado como meio de comunicação entre o SNC. De fato, estudos recentes

tem mostrado que o líquor pode ter acesso a todo o SNC por meio do espaço perivascular (espaço de Virchow-Robin), onde é feita a drenagem e depuração de moléculas, além dos ventrículos e espaço subdural (BRINKER et al., 2014).

As células deste tecido possuem junções justas oclusivas (“*tight junctions*”) localizadas na parte apical das células (VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003), que evitam a difusão passiva do sangue formando assim uma barreira física chamada barreira hematoliquórica (BHL). Assim como BHE a integridade da BHL impede a entrada de patógenos, moléculas inflamatória e toxinas que chegam pelo sangue periférico, protegendo assim o SNC (KAUR et al., 2016).

Considerado como um mediador entre o sistema imune periférico e o SNC, o PC está constantemente exposto a sinais vindo do parênquima cerebral e sistema imune periférico, devido à sua estrutura e posicionamento. Alguns estudos têm relacionado o PC à mediação da resposta inflamatória dentro do SNC (KAUR et al., 2016).

Trabalhos de Englehardt et al. (2001) e Vercellino et al. (2008), demonstram o papel do PC na inflamação associada com a encefalite alérgica experimental e a esclerose múltipla. Além disso, o PC é uma estrutura com potencial para permitir a passagem de células inflamatórias no SNC, além de servir como fonte de mediadores inflamatórios durante várias doenças. Ainda, as células epiteliais do PC, mostraram capacidade de produzir citocinas como IL-6, IL-8, TNF- α , e IL-1 β , que são liberadas no líquor quando ocorre inflamação periférica sistêmica, o que resultaria em alterações no tecido nervoso (FUNG et al., 2012; MARQUES et al., 2009; MITCHELL et al., 2009; MURTA et al., 2015). No entanto, não existem muitos estudos sobre a síntese e a secreção de quimiocinas pelo PC (STRAZIELLE et al., 2016).

O PC e o líquor podem atuar como portas de entrada para patógenos ou antígenos circulantes e essa estrutura pode ser a primeira a responder a um estímulo inflamatório periférico (MELO; MACHADO, 2009, 2011). Estudos

mostram evidências de inflamação no encéfalo de cães com LV (IKEDA et al., 2007; MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2009; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, a presença de anticorpos anti-*Leishmania*, albumina e imunoglobulina como a IgG até mesmo o DNA do protozoário já foram relatados em liquor de cães com LV (GARCIA-ALONSO et al., 1996; LIMA et al., 2003; MELO et al., 2015, OLIVEIRA et al., 2017).

A função altamente secretora das células do PC e sua interface entre o sangue e o liquor, podem desempenhar um papel importante na comunicação entre o sangue e o cérebro como tem sido comprovado por inúmeros trabalhos (BALUSU et al., 2016). Alguns trabalhos apontam que a BHL encontrada no PC desempenha importante papel fisiopatológico da inflamação no encéfalo causada por protozoários como o *Trypanossoma* (MOGK et al., 2014), mas pouco se sabe ainda sobre a participação desta estrutura na patogenia das lesões encefálicas dos cães com LV.

1.6 Sistema Nervoso Central e Leishmaniose visceral

O envolvimento do SNC durante a LV é pouco relatado tanto em humanos como em cães (MAIA et al., 2015).

Estudos realizados com 215 cães com infecção crônica de LV mostraram que somente 4% desses animais apresentaram sinais neurológicos. (FEITOSA et al., 2000). Giannuzzi et al. (2017), apesar do estudo feito com 54 cães com LV, observou que 5,4% dos animais possuíam sinais neurológico. Em humanos os sinais mais comumente relatados são relacionados a alterações no sistema nervoso periférico entretanto, meningite, disfunção de nervos cranianos e parasitas no liquor já foram relatados (MAIA et al., 2015). Contudo, os cães podem apresentar sinais de comprometimento generalizado do SNC como convulsões, disfunção de nervos cranianos, sinais cerebello-vestibulares,

incoordenação motora, paresia e mioclonia (GIANNUZZI, et al., 2017; IKEDA et al., 2007; MAIA et al., 2015).

Cães naturalmente infectados apresentam evidências de inflamação no encéfalo e desregulação da BHE, além de meningite e coroidite, deposição perivascular de imunoglobulinas, infiltração de leucócitos, ativação glial, enzimas que degradam componentes da matriz extracelular (MMP-2 e MMP-9) e um perfil de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (GARCIA-ALONSO et al., 1996; GIANNUZZI et al., 2017; IKEDA et al., 2007; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2013, MELO et al., 2015, OLIVEIRA et al., 2017).

Apesar do DNA do parasito ser detectado no SNC em cães naturalmente infectados (CARDINOT et al., 2016; GRANO et al., 2014), no encéfalo, existem raros relatos de identificação de *Leishmania* nesse tecido (MÁRQUEZ et al., 2013; NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001).

REFERÊNCIAS

ABBOTT, N.; PATABENDIGE, A.A.; DOLMAN, D.E.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiol. Dis.**, v. 37, p.13–25, 2010.

ABDALMAULA, G. H.; BARBADORO, P.; MARIGLIANO, A.; ILLUMINATI, D.; DI STANISLAO, F.; D'ERRICO, M. M.; PROSPERO, E. Human visceral leishmaniasis: a picture from Italy. **J. Infect. P. H.**, v.6, p. 465–472. 2013.

ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**, v.2, p.734-744, 2001.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOE, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos one**. v. 7, e35671, 2012.

BAILEY, S. L.; CARPENTIER, P. A.; MCMAHON, E. J.; BEGOLKA, W. S.; MILLER, S. D. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 149–188, 2006.

BALUSU, S.; VAN WONTERGHEM, E.V.; DE RYCKE, R.; RAEMDONCK, K.; STREMERSCH, S.; GEVAERT, K.; BRKIC, M.; DEMEESTERE, D.; VANHOOREN, V.; HENDRIX, A.; LIBERT, C.; VANDENBROUCKE, R.E. Identification of a novel mechanism of blood–brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. **EMBO Mol. Med.**, v. 8, p. 1162–1183, 2016.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiol. Dis.**, v. 16, p. 1-13, 2004.

BANETH, G.; KOUTINAS, A.; 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.

BAÑUS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol.**, v. 64, p. 1-109, 2007.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine Leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.28, p.329-37, 2006.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.**, v.37, p.1097-1106, 2007.

BENDALL, L. Chemokines and their receptors in disease. **Histol and Histopathol**, v. 20, p. 907-926, 2005.

BRINKER, T.; STOPA, E; MORRISON, J.; KLINGE, P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. **Fluids Barriers CNS**, v.11, p.10, 2014.

CARDINOT, C.B.; SILVA, J.E.S.; YAMATOIGI, R.S.; NUNES, C.M.; BIONDO, A.W.; VIEIRA, R.F.C; ARAUJO 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. 275–279, 2016.

DANIELSKI, L.G.; GIUSTINA, D.A.; BADAWEY, M.; BARICHELLO, T.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F.; PETRONILHO, F. Brain barrier breakdown as a cause and consequence of neuroinflammation in sepsis. **Mol. Neurobiol.**, p.1-9, **Mol Neurobiol.**, 2017. Disponível em:<doi:10.1007/s12035-016-0356-7>. Acessado em 20 jun.2017.

ENGLEHARDT, B.; WOLBURG-BUCHHOLZ, K.; WOLBURG, H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. **Microsc. Res. Technol.**, v.52, p. 112–129, 2001.

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). **Clínic. Vet.**, v. 28, p. 36-44, 2000.

FUNG, A.; VIZCAYCHIPI, M.; LLOYD, D.; WAN, Y.; MA. D. central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. **Brain Res.**, v. 1446, p.144-155, 2012.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V. H. 2007. What is immune privilege (not)? **Trends immunol.**, v. 28, p. 12-18, 2007.

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.

GIANNUZZI, 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.S.P.**, v. 58, p. 125–138, 2017.

GRANO, F.G.; MELO, G.D.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; GOMEZ-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.

HORRILLO, L.; SAN MARTIN, J. V.; MOLINA, L.; MADRONAL, E.; MATIA, B.; CASTRO, A.; GARCIA-MARTINEZ, J.; BARRIOS, A.; CABELLO, N.; ARATA, I.G.; CASAS, J. M.; RUIZ GIARDIN, J. M. Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). **Clin Microbiol Infec.**, v. 21, p.269–273, 2015.

HOSEIN, S.; DAMER, P.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitol.**, v. 1, p.1-21, 2016.

IKEDA. F.A.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E; FEITOSA, M.M.; MACHADO, G.F.; Perri, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central

nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Braz. J. Vet. Res. Anin.Sci.**, v. 44, p. 5-11, 2007.

KAUR, C.; RATHNASAMY, G.; LING, E.A. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. **J Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 75, p.198–213, 2016.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews*. **Microbiol.**, v. 9, p. 604-615. 2011.

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R., FEITOSA, M. M. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p.485-489, 2003.

KADHIM, H.J.; DUCHATEAU, J.; SÉBIRE, G. Cytokines and brain injury: invited review. **J. Intensive Care Med.**, v.23, n.4, p.236-249, 2008.

LUKEŠ, J.; MAURICIO, I.L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J.-C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.-P.; KUHL, K.; TINTAYA, K.W.Q.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, 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. USA**, v.104, n.22, p.9375-9380, 2007.

LUPPI, M.M.; MALTA, M.C.C.; SILVA, T.M.A.; SILVA, F.L.; MOTTA, R.O.C.; MIRANDA, I.; ECCO, R.; SANTOS, R.L. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.155, n.1-2, p.146-151, 2008.

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.

MAIA, C. S. F.; MONTEIRO, M. C.; GAVIOLI, E. C.; OLIVEIRA, F. R.; OLIVEIRA, G. B.; ROMÃO, P. R. T. Neurological disease in human and canine leishmaniasis

– clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunol.**, v. 37, p. 385-393, 2015.

MARANGONI, N.R.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; PERRI, S.H.V.; MACHADO, G.F., 2011. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.33, p. 330-334, 2011.

MARQUES, F.; SOUSA, J.C.; COPPOLA, G.; FALCAO, A.M.; RODRIGUES, A.J.; GESCHWIND, D.H.; SOUSA, N.; CRREIA-NEVES, M.; PALHA, J.A. Kinetic profile of the transcriptome changes induced in the choroid plexus by peripheral inflammation. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 29, p. 921–932, 2009.

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.

MARTIN-MARTIN, I.; JIMENEZ, M.; GONZALEZ, E.; EGUILUZ, C.; MOLINA, R. Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. **Vet. Res.**, v.46, p.138, 2015.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v.16, 188-189, 2000.

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.; 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, 2015.

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.

MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis–new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol.**, v. 24, p.371–377. 2008.

MITCHELL, K.; YANG, H.Y.T.; BERK, J.D.; TRAN, J.H.; LADAROLA, M.J. Monocyte chemoattractant protein-1 in the choroid plexus: a potential link between vascular pro-inflammatory mediators and the CNS during peripheral tissue inflammation. **J. Neurosci.**, v.158, p. 885–895, 2009.

MOGK, S.; MEIWES, A.; SHTOPEL, S.; SCHRAERMAYER, U.; LAZARUS, M.; KUBATA, B.; WOLBURG, H.; DUSZENKO, M. Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS. **Plos One**, v.3, p.91372, 2014.

MURPHY, P. M. CXC chemokines. In: HENRY, H. L.; NORMAN, A. W. (Ed.). **Encyclopedia of hormones**. New York: Academic Press, 2003. p. 351-362.

MURTA, V.; FARÍAS, M.I.; PITOSI, F.J.; FERRARI, C.C. Chronic systemic IL-1 β exacerbates central neuroinflammation independently of the blood–brain barrier integrity. **J. Neuroimmunol.**, v. 278, p. 30–43, 2015.

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.

NUNES, C. M.; PIRES, M. M.; DA SILVA, K. M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVES FILHO, J.; VENTUROLI PERRI, S.H. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Vet. Parasitol.**, v. 170, p. 131–133, 2010.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R.S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol.**, v.129, p.219-227, 2005.

OLIVEIRA, V.C.; BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C.; FIGUEIREDO, B.F.; CAMPOS, M.P.; RODRIGUES, F.C.C.; OLIVEIRA, R.V.C.; 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. 2, p. e0175588, 2017.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A. Guideline for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 236, p. 1184-1191, 2010.

PAVLOV, V.A.; TRACEY, K. J. Controlling inflammation: the cholinergic pathway. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, p.1037–1040, 2006.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania*

infantum-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 237-243, 1999.

RABIN, R. L. CC, C, and CX3C chemokines. In: HENRY, H. L. e NORMAN, A. W. (Ed.). **Encyclopedia hormones**. New York: Academic Press, 2003. p. 255-263.

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.

SANTARÉM, N.; SILVESTRE, R.; TAVARES, J.; SILVA, M.; CABRAL, S.; MACIEL, J.; SILVA, A. C. Immune response regulation by *Leishmania* Secreted and non secreted Antigens. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2007, p. 1-10, 2007.

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.D.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Vet. Parasitol.**, v.150, p.283-290, 2007.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Vet. Dermatol.**, v. 20, p. 471-489, 2009.

SHIMADA, A.; HASEGAWA-ISHII, S. Histological architecture underlying brain-immune cell-cell interactions and the cerebral response to systemic inflammation. **Frontiers Immunol.**, v.8, p.1-9, 2017.

LUKES, 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.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G.; RIERA, C.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania infection*. **Vet. Parasitol.**, v. 90, p.37-45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L.; KUOTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 165, p. 1-18, 2009.

STRAZIELLE, N.; CREIDY, R.; MALCUS, C.; BOUCRAUT, J.; GHERSI-EGEA, J.F. T-Lymphocytes traffic into the brain across the blood-csf barrier: evidence using a reconstituted choroid plexus epithelium. **PLOS ONE**, v. 21. Disponível em < DOI:10.1371/journal.pone.0150945, 2016> Acesso em 20 jun.2017. p. 0150945, 2016.

TIAN, L.; M.A; L.; KAARELA, T.; LI, Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. **J. Neuroinflammation**, v. 9, p. 2-10, 2012.

VERCELLINO, M.; VOTTA, B.; CONDELLO, C.; PIACENTINO, C.; ROMAGNOLO, A.; MEROLA, A.; CAPELLO, E.; MANCARDI, G.L.; MUTANI, R.; GIORDANA, M.T.; CAVALLA, P. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathologic study. **J. Neuroimmunol.**, v. 199, p. 133–141, 2008.

VIDES, J.P.; SCHWARDT, T.F.; SOBRINHO, L.S.V.; MARINHO, M.; LAURENTI, M.D.; BIONDO, A.W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.178, n.1-2, p.22-28, 2011.

VIGNAL, D.; KALLIKOUDIS, M. Improving homing in T cell therapy. **Cytokine**

Growth Factor Rev. 2017. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.06.009>. Acessado 20 jun 2017.

VIÑUELAS, J.; GARCIA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 101, p. 23-27, 2001.

VORBRODT, A.W.; DOBROGOWSKA, D.H. Molecular anatomy intercellular junction in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist' view. **Brain Res. Rev.**, v. 42, p.221-241, 2003.

ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int. Anesthesiol. Clin.**, v. 45, p. 27–37, 2007.

CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÕES

Desde 2011 tenho participado de inúmeros trabalhos com objetivo de compreender a fisiopatogenia da infecção periférica por *Leishmania* spp. e as lesões observadas no encéfalo. Dessa maneira, o presente estudo foi continuação de estudos anteriores onde observou-se aumento na expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no encéfalo de cães com LV e disfunção da BHE.

Avaliando todos os resultados apresentados nesta tese podemos concluir que:

- Cães com LV apresentam infiltrado inflamatório constituído por células mononucleares principalmente em leptomeninges e PC, sem correlação com estadiamento clínico do animal.
- O PC pode ser uma importante porta de entrada da *Leishmania* para o SNC uma vez que encontramos formas amastigotas nesse tecido. Além disso o DNA de *Leishmania* encontrado também no PC poderia estar desencadeando resposta imunológica específica no SNC.
- Com a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no liquor, além da presença elevada de albumina e do aumento do quociente de albumina, podemos concluir que há aumento da permeabilidade da BHE cães com LV.
- O aumento de expressão gênica da quimiocina CCL-5 e tendência no aumento da expressão gênica da CXCL-10 no PC de cães com LV, mostram que essas quimiocinas podem estar envolvidas na quimiotaxia de células inflamatórias encontradas no PC de cães com LV. Ao contrário da CCL-3 e CCL-4 que a expressão gênica no PC não apresentou diferença com o grupo controle.

- PC mostrou-se não participar ativamente no aumento de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ em cães com LV. Isto indica que essas citocinas, já observadas no encéfalo previamente, poderiam estar sendo produzidas em outras áreas encefálicas, e não no PC. Essas citocinas poderia estar sendo produzidas por outras células do encéfalo como astrócitos e micróglia, que podem ser estimuladas por mediadores inflamatórios da resposta periférica.
- Não foi detectada a produção de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no soro e no liquor tanto de cães saudáveis como de cães infectados. A ausência de detecção dessas citocinas nesse tipo de amostra pode ser devido a elas estarem em baixa concentrações ou até mesmo na baixa sensibilidade do método utilizado nesse estudo.