

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

GENES DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉREBROS DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Livia Castanhas Bregano

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2018

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

GENES DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉREBROS DE
CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

Livia Castanhas Bregano
Orientadora: Profa. Dra. 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
2018

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

Bregano, Livia Castanhas

B833g

Genes da resposta imune inata e adaptativa diferencialmente expressos em cérebros de cães com leishmaniose visceral / Livia Castanhas Bregano.

Araçatuba: [s.n], 2018.
126 f. il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, 2018

Orientadora: Prof. Dra. Gisele Fabrino Machado

1. Leishmania / Imunologia. 2. Condições Patológicas, Sinais e Sintomas. 3. Sistema Nervoso. I. T.


CDD 616.9364


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: GENES DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
CÉREBRO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

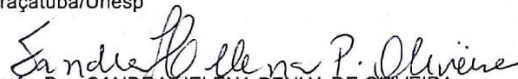
AUTORA: LIVIA CASTANHAS BREGANÓ
ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

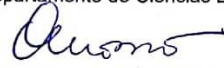
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


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


Pesquisadora FLÁVIA LOMBARDI LOPES
Departamento de Apoio, Produção e Saúde 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. SANDRA HELENA PENHA DE OLIVEIRA
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. CLAUDIA MOMO
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Araçatuba, 17 de agosto de 2018.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LIVIA CASTANHAS BREGANO – nascida em 15 de janeiro de 1985 na cidade de Bauru – SP. Médica Veterinária graduada na Faculdade de Medicina Veterinária – Campus de Araçatuba/UNESP, no ano de 2008. Mestre em Ciência Animal no ano de 2011 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da mesma instituição. Em março de 2015, ingressou no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – Campus de Araçatuba/UNESP, na área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, sob orientação da professora Adjunto Gisele Fabrino Machado. Foi bolsista pela Fundação CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) no período de março de 2015 a setembro de 2016. Atualmente é bolsista Fundação FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), período de outubro de 2016 a agosto de 2018 (Nº 2016/14828-9).

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar, e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro” (Fernando Sabino)

Dedico este trabalho a Augusto Schweigert

“Baby, nada há de ser em vão
Antes dessa noite acabar, dance comigo, é a nossa canção”

Agradecimento Especial

À Denise Miguel Castanhas Bregano e Marília Castanhas Bregano
Por me ensinarem todos os dias que o amor vale a pena

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e infinitos agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária - campus de Araçatuba / UNESP por ter sido minha casa há 14 anos, por ter me dado todos os meios necessários para que meu sonho se tornasse profissão, e por ter me feito um ser humano melhor.

À minha orientadora Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado por acreditar no meu trabalho, pelo incentivo constante, pelos ensinamentos que vão muito além desta tese, e por construir comigo um laço de amizade tão importante para mim.

À Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes e Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima pela participação neste trabalho, pelo incentivo, pelos valiosos ensinamentos e por serem mulheres tão inspiradoras.

Ao Prof. Dr. Iveraldo dos Santos Dutra e Profa. Dra. Kátia Denise Saraiva Bresciani pela oportunidade de realização de estágio docência, pelo incentivo e pelas valiosas conversas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa e concessão de bolsa de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de doutorado.

Ao Laboratório de Patologia Aplicada (LAPAP) (FMVA/UNESP) e toda sua equipe, em especial ao doutorando Hugo Ribeiro Moraes pelo apoio essencial para a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Laboratório de Epigenômica (FMVA/UNESP) e toda sua equipe, em especial à mestranda Natalia Francisco Scaramele pelo apoio essencial para a realização deste trabalho e pela amizade.

Ao Laboratório de Imunologia (FMVA/UNESP) e toda sua equipe, em especial à Larissa Melo, Flávia Yamamoto e Gabriela Venturin pelo incentivo, apoio e amizade.

Ao Setor de Patologia (FMVA/UNESP) e toda sua equipe, por fornecer os meios necessários para execução de parte deste trabalho e por todos os ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (FMVA/UNESP) pelo apoio constante e incentivo.

Ao Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba pela disponibilização da estrutura e pelo auxílio na execução de parte deste trabalho.

Ao Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação (FMVA/UNESP), em especial à bibliotecária Isabel Pereira de Matos pelo apoio com a normalização da tese.

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes e Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima pelo tempo dedicado à avaliação e aprimoramento deste trabalho.

Aos membros da banca de Defesa de Tese, Profa. Dra. Flávia Lombardi Lopes, Profa. Dra. Valéria Marçal Felix de Lima, Profa. Dra. Sandra Helena

Penha de Oliveira, Profa. Dra. Claudia Momo pela disponibilidade e pelos ensinamentos compartilhados.

À Denise Miguel Castanhas Bregano por ser meu cerne, meu espelho, minha alegria e minha melhor amiga.

À Marília Castanhas Bregano por me inspirar a ser uma pessoa melhor a cada dia e encher a minha vida de amor e carinho.

A José Carlos Bregano que vive para sempre dentro de mim.

A Ronaldo Eugênio Mamoni por segurar a minha mão, estar do meu lado e me dar tanto amor.

A todos os meus amigos que me rodeiam e tornam a minha vida muito mais feliz.

A todos os cães que involuntariamente compuseram este estudo. Meu respeito e toda a minha dedicação.

SUMÁRIO

	Página
1 CAPÍTULO 1.....	21
1.1. Considerações Gerais.....	21
1.1.1. Complexo Leishmanioses.....	21
1.1.2. Leishmaniose Visceral (LV).....	21
1.1.3. Leishmaniose Visceral Canina (LVC).....	22
1.1.4. Leishmaniose Visceral Canina x Resposta Imune.....	23
1.1.5. Leishmaniose Visceral Canina x Resposta Inata x Resposta Adaptativa.....	24
1.1.6. Leishmaniose Visceral Canina x Sistema Nervoso Central.....	26
1.1.7. Subclasses funcionais dos genes de interesse.....	29
1.1.7.1. Receptores de reconhecimento padrão.....	29
1.1.7.2. Receptores transmembrana.....	34
1.1.7.3. Fatores de transcrição.....	37
1.1.7.4. Quimiocina e receptores de quimiocinas.....	39
1.1.7.5. Citocinas.....	41
1.1.7.6. Resposta Th17.....	45
1.2. REFERÊNCIAS.....	46
2. CAPÍTULO 2.....	64
2.1. Genes da resposta imune inata e adaptativa diferencialmente expressos em cérebros de cães com Leishmaniose Visceral.....	64
2.1.1. RESUMO.....	64
2.1.2. ABSTRACT.....	65
2.1.3. Introdução.....	66
2.1.4. Métodos.....	68
2.1.4.1. Animais.....	68
2.1.4.2. Colheita de Material.....	70

2.1.4.3. Extração de RNA de amostras do cérebro.....	71
2.1.4.4. Avaliação da integridade de RNA.....	71
2.1.4.5. Síntese de cDNA.....	72
2.1.4.6. PCR <i>Profiler</i> de amostras de cérebro de cães com LVC.....	72
2.1.4.7. <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> (IPA).....	73
2.1.4.8. Análise Estatística.....	74
2.1.5. Resultados.....	74
2.1.5.1. Diagnóstico de LVC.....	74
2.1.5.2. Avaliação histopatológica dos encéfalos de cães com LVC.....	75
2.1.5.3. Investigação da expressão de genes relacionados às respostas imunes inata e adaptativa.....	76
2.1.5.4. Vias canônicas relacionadas aos genes de interesse.....	80
2.1.6. Discussão	85
2.1.7. Conclusão.....	94
2.1.8. Declarações.....	94
2.1.8.1. Aprovação Ética.....	94
2.1.8.2. Financiamento.....	94
2.1.9. REFERÊNCIAS.....	95
2.1.10. Arquivos Adicionais.....	105

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01 - Análise retrospectiva de pesquisas a respeito do acometimento nervoso em cães com LVC (adaptado de Giannuzzi et al., 2017).....	30
Tabela 02 - Condição dos ciclos realizados para PCR Profiler em amostras de SNC.....	73
Tabela 03 - Expressão diferencial de genes de resposta imune inata e adaptativa em cérebros de cães naturalmente infectados para <i>L. infantum</i> , com critério de seleção de <i>fold change</i> $\geq 1,5$ e p-valor $\leq 0,05$	78
Tabela 04 - Dez principais vias canônicas relacionadas com genes em aumento de expressão de encéfalos de cães naturalmente infectados para <i>L. infantum</i> quando comparados ao grupo controle..	81
Tabela adicional 01 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente por <i>L. infantum</i> . Diagnóstico molecular e sorológico por teste ELISA, de acordo com Lima et al., 2005, sendo consideradas amostras positivas com densidade óptica acima de 0,270. A letra (N) indica negatividade no teste realizado, e letra (P) indica positividade no teste realizado. A letra (F) indica sexo fêmea, e a letra (M) indica sexo macho.....	105
Tabela adicional 02 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente por <i>L. infantum</i> . Perfil hematológico por exame de eritrograma.....	106
Tabela adicional 03 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente por <i>L. infantum</i> . Perfil hematológico por exames de leucograma, contagem de plaquetas e quantificação de proteínas plasmáticas totais.....	107
Tabela adicional 04 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente por <i>L. infantum</i> . Perfil bioquímico sérico para a avaliação de função hepática e renal.....	108

Tabela adicional 05 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente por <i>L. infantum</i> . Diagnóstico citológico por teste parasitológico dos tecidos linfonodo, baço e medula óssea. O símbolo (+) indica positividade no teste, o símbolo (-) indica negatividade no teste realizado.....	109
Tabela adicional 06 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente para <i>L. infantum</i> . Avaliação da quantidade e da concentração de RNA de amostras de SNC em espectrofotômetro (NanoDrop®) e respectivos valores de absorvância.....	110
Tabela adicional 07 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente para <i>L. infantum</i> . Número de integridade de RNA (RIN) de amostras de extraídas de SNC.....	111
Tabela adicional 08 - Composição de genes da placa de <i>PCR Profiler RT² Profiler™ PCR Array Dog Innate & Adaptive Immune Responses</i>	112
Tabela adicional 09 - Sinais clínicos observados em exame clínico geral inicial de cães naturalmente infectados para <i>L. infantum</i>	113
Tabela adicional 10 - Escore de sinais clínicos baseado nas alterações clínicas compatíveis com leishmaniose visceral canina....	114
Tabela adicional 11 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente por <i>L. infantum</i> . Estadiamento clínico (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) baseado em escore de sinais clínicos, valores de exames bioquímicos de creatinina e albumina séricos, e presença de anemia e hiperproteinemia em hemograma.....	115
Tabela adicional 12 - Estadiamento clínico da leishmaniose canina baseado no <i>status</i> sorológico, sinais clínicos, achados laboratoriais, tipo de terapia e prognóstico de cada estágio. Adaptado de Solano-Galego et al., 2009.....	116
Tabela adicional 13 - Cães <i>controle</i> e infectados naturalmente para <i>L. infantum</i> . Valores de C _T dos genes de interesse (critério de seleção de <i>fold change</i> ≥ 1,5 e p-valor ≤ 0,05) em cérebros.....	117

Tabela adicional 14 - Valores de referência utilizados nos exames hematológicos do presente trabalho. MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis . 2.ed. Philadelphia: Sauders, 2004. 351p.....	119
Tabela adicional 15 - Cães infectados naturalmente para <i>L. infantum</i> . Valores de C _T de amostras de baço no teste qPCR para investigação de <i>Leishmania sp.</i>	120
Tabela adicional 16 - Vias canônicas relacionadas com genes em aumento de expressão de cérebros de cães naturalmente infectados para <i>L. infantum</i> quando comparados ao grupo controle, seus respectivos -log p-valor e taxas de relevância.....	121

LISTA DE FIGURAS

	Página
<p>Figura 01 - Interação das respostas Th1 e Th2 na LVC. Na resposta Th1, relacionada com a eliminação do parasita e proteção, as citocinas IFNγ, IL-2 e TNF-α são capazes de induzir a ativação de macrófagos e morte de parasitas. A resposta Th1 é regulada negativamente por IL-10, produzida por células T reguladores (Treg). A IL-10 também é produzida por células Th1e tem capacidade de limitar efeitos secundários da infecção. A resposta Th2 é relacionada com a disseminação do parasita associada ao aumento de atividade de células B, e é mediada por IL-10, TGF-β e IL-4. Adaptado de BANETH et al., 2008.....</p>	27
<p>Figura 02 - Fotomicrografia representativa de alterações inflamatórias. (a) discreto (asterisco) infiltrado no plexo coróide do quarto ventrículo (grau 01). (b) Infiltrado moderado (++) de células inflamatórias (asterisco) em plexo coróide (grau 02). (c) Infiltrado moderado de células inflamatórias (asterisco) em vaso da meninge (grau 02). (d) Infiltrado discreto de células inflamatórias (+) (seta) em meninge (grau 01). Hematoxilina e Eosina. Barra de escala = 50μm.....</p>	76
<p>Figura 03 - Expressão diferencial de genes relacionados à resposta imune, agrupados em categoria funcional, em cérebros de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>. Critério de seleção de <i>fold change</i> \geq 1,5 e p-valor \leq 0,05. (A) Receptores de reconhecimento padrão; (B) Receptores transmembrana; (C) fatores de transcrição; (D) quimiocinas e receptores de quimiocinas; (E) citocinas.....</p>	79
<p>Figura 04 - Possíveis funções biológicas e genes em aumento de expressão (em vermelho) em cérebros de cães com LVC associados ao reconhecimento TLR na micróglia e</p>	

desencadeamento de vias de sinalização. Em verde, genes avaliados e sem aumento de expressão quando comparados ao grupo controle. Adaptado do IPA. (A) Complexo NFκB promove síntese de proteínas pró-inflamatórias. (B) IRF7 promove a produção de IFNα. (C) Ativador de proteína 1 (AP1) promove a produção de INOS, COX2, cPLA2 e MMP-9 (D) IRF3 promovendo a produção de IFNβ1 e consequente produção de MMP9..... 82

Figura 05 - Possíveis funções biológicas e genes em aumento de expressão (em vermelho) associados à ação de IFNγ em micróglia. Em verde, genes avaliados e sem aumento de expressão quando comparados ao grupo controle. Adaptado do IPA. Células Th1 promovem a produção de IFNγ que, por meio da sinalização do receptor IFNγR, desencadeia na micróglia a produção de IFNγ, PGE2, NFκB, Inos e a citocina IL10..... 83

Figura 06 - Possíveis funções biológicas e genes em aumento de expressão (em vermelho) associados à ação de células Th1 e consequente produção de TNF e IFNγ, e suas respectivas ações em micróglia. Em verde, genes avaliados e sem aumento de expressão quando comparados ao grupo controle. Adaptado do IPA. (A) Células Th1 levam a produção de TNF que promove a ação de NFκB (B) Células Th1 levam à produção de IFNγ que promove a ação de NFκB..... 84

Figura 07 - Possíveis funções biológicas e genes em aumento de expressão (em vermelho) em resposta ao reconhecimento por TLR em astrócito e consequente sinalização do complexo NFκB, desencadeando a produção de proteínas pró-inflamatórias. Em verde, genes avaliados e sem aumento de expressão quando comparados ao grupo controle. Adaptado do IPA..... 85

GENES DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉREBROS DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, invariavelmente progressiva, de alta variabilidade clínica, incluindo desordens neurológicas. Para investigar as alterações neurológicas desencadeadas pela LVC, a expressão de genes envolvidos na resposta imune inata e adaptativa em cérebros de cães naturalmente infectados para *Leishmania infantum* foi realizada. Cães machos/fêmeas, 1 a 5 anos de idade, sem raça definida, com prévia avaliação clínica e laboratorial, avaliação histopatológica cerebral, e ausência das principais co-infecções foram organizados em dois grupos, grupo (Infectados) com 11 cães e grupo (Controle) com 04 cães. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR *Profiler* com kit comercial *RT² Profiler™ PCR Array Dog Innate & Adaptive Immune Responses* (Qiagen®). O p-valor estipulado foi em $\leq 0,05$ por Teste-t de Student. Infiltrados inflamatórios, de variação discreta a moderada, foram verificados nos cães infectados. Houve o aumento da expressão de 24 genes de diferentes subclasses comparados ao grupo controle (IRF6, CD4, CD40LG, TLR6, CCR4, TLR5, CCR8, CCL3, IFNG, IFNB1, TNF, IL13, IRF3, CD14, CD209, CD80, TLR4, CD86, CCR6, TRAF6, TLR7, RORC, NOD1, STAT3). Esta informação indica a participação da resposta imune inata e adaptativa no cérebro de cães com LVC, e a alta expressão destes pode ser considerada fator chave para o início, manutenção e persistência da inflamação.

Palavras-chave: *Leishmania*, imunologia, neuropatogenia

GENES OF THE INNATE AND ADAPTIVE IMMUNE RESPONSE DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN DOG BRAINS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT – Visceral canine leishmaniasis (LVC) is a chronic, invariably progressive disease of high clinical variability including neurological disorders. To investigate the neurological changes triggered by LVC, the expression of genes involved in the innate and adaptive immune response in brains of naturally infected dogs to *Leishmania infantum* was performed. Male and female dogs, 1 to 5 years of age, with no previous breed, previous clinical and laboratory evaluation, histopathological evaluation, and absence of major co-infections were organized into two groups (Infected) with 11 dogs and group Control) with 04 dogs. The evaluation of gene expression was performed by PCR Profiler with commercial Kit RT² Profiler™ PCR Array Dog Innate & Adaptive Immune Responses (Qiagen®). The p-value stipulated was ≤ 0.05 per Student's t-Test. Inflammatory infiltrates, mild to moderate, were found in infected dogs. There was an increase in expression of 24 genes of different subclasses compared to the control group (IRF6, CD4, CD40LG, TLR6, CCR4, TLR5, CCR8, CCL3, IFNG, IFNB1, TNF, IL13, IRF3, CD14, CD209, CD80, TLR4, CD86, CCR6, TRAF6, TLR7, RORC, NOD1, STAT3). This information indicates the involvement of the innate and adaptive immune response in the brain of dogs with LVC, and the high expression of these can be considered a key factor for the onset, maintenance and persistence of inflammation.

Keywords: Leishmania, immunology, neuropathogenesis

1. CAPÍTULO 1

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1.1. Complexo Leishmanioses

As Leishmanioses correspondem a um complexo de doenças incluído, pela Organização Mundial de Saúde, entre as seis mais importantes endemias do mundo, e tido como uma das doenças tropicais mais relevantes e negligenciadas. O risco de infecção atinge cerca de 350 milhões de pessoas em 88 diferentes países. Atualmente, a prevalência mundial é de 12 milhões de pessoas infectadas, com cerca de dois milhões de novos casos ao ano (WHO, 2015). Este complexo de doenças é causado por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, e gênero *Leishmania*). As espécies de *Leishmania* se dividem em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*. Sua transmissão ocorre por cerca de 30 espécies de mosquitos flebotomíneos (LAINSON; SHAW, 1987; SILVEIRA; CORBETT, 2010).

O complexo Leishmanioses pode acometer o homem e uma larga variedade de animais silvestres e domésticos. São descritas distintas formas clínicas que se relacionam com a espécie de *Leishmania* envolvida e com a resposta imune desencadeada pelo hospedeiro, dentre elas: leishmaniose visceral (LV); leishmaniose cutânea; leishmaniose muco-cutânea; e leishmaniose dérmica pós-calazar (CHAPPUIS et al., 2007).

1.1.2. Leishmaniose Visceral (LV)

A LV é considerada a forma mais grave do complexo Leishmanioses. Refere-se a uma antropozoonose responsável por cerca de 500.000 novos casos ao ano no mundo. É uma doença sistêmica, crônica, potencialmente fatal, e de grande diversidade clínica (WHO, 2015).

Os agentes etiológicos responsáveis pela LV compreendem o complexo *Leishmania donovani*, que aparentemente se distinguem pela distribuição geográfica do parasita. Foi considerado que *Leishmania (Leishmania) donovani* é o agente etiológico encontrado na África e Ásia; *Leishmania (Leishmania) infantum*, na Ásia, Europa e África; e *Leishmania (Leishmania) chagasi* encontrada nas Américas (CUNHA; CHAGAS, 1937). Atualmente, é consenso considerar *L. infantum* e *L. chagasi* como uma única espécie (MAURICIO et al., 2000), sendo no Brasil este principal agente etiológico da LV (WILSON et al., 2005).

1.1.3. Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Os cães são considerados o principal reservatório no ciclo de transmissão da LV, contribuem para a persistência do parasita em áreas urbanas, e podem ser considerados sentinelas de infecção para seres humanos (FRAGA et al., 2012; PRADO et al., 2011).

A LVC é considerada endêmica em aproximadamente 50 países, com destaque para duas maiores regiões, América do Sul e região Mediterrânea (BANETH et al., 2008). A prevalência de LVC no Brasil tem variação de 1,9 a 35% em áreas endêmicas, havendo descrições de até 53,4% em determinadas regiões (BARATA et al., 2013).

A LVC causa doença sistêmica, majoritariamente crônica, e que afeta principalmente órgãos do sistema fagocítico mononuclear. A reação inflamatória granulomatosa associada à presença de formas amastigotas de *Leishmania* em macrófagos é considerada a lesão histopatológica típica nos tecidos por LVC (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008).

Os cães com LVC podem apresentar ampla variedade clínica, desde assintomáticos até a forma clínica grave, sendo descritas alterações dermatológicas, renais, hepáticas, respiratórias, cardiovasculares, locomotoras, oculares, neurológicas, além de diáteses hemorrágicas e alterações atípicas (ALVAR et al., 2004; BLAVIER et al., 2001; CIARAMELLA; CORONA, 2003).

Grande parte dos cães infectados apresenta infecção subclínica (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

1.1.4. Leishmaniose Visceral Canina x Resposta Imune

Os mecanismos imunológicos desencadeados durante a LVC, como suscetibilidade, resistência e estabelecimento da infecção não são completamente esclarecidos (HOSEIN et al., 2017). Sabe-se que a evolução da doença e sua consequente apresentação clínica estão diretamente relacionadas com o tipo de resposta imune desenvolvida (STANLEY; ENGEWERDA, 2007).

Fatores como raça, imunossupressão, doenças concomitantes e *status* nutricional podem ter influência no desenvolvimento da resposta imune (MIRO et al., 2008). Os linfócitos T desempenham papel crucial na resposta à LVC por influenciarem a produção de mediadores inflamatórios e consequentemente ação dos macrófagos infectados (RODRIGUEZ-CORTES et al., 2007).

O estabelecimento da doença é descrito como “silencioso”, em virtude das alterações da resposta imune serem mínimas ou ausentes apesar da proliferação e disseminação do parasita (HOSEIN et al., 2017). Há a sugestão de que este estabelecimento “silencioso” ocorra para evitar a resposta imune mediada pelas células hospedeiras, e que cães com LVC podem expressar citocinas específicas a partir dos primeiros oito meses de infecção, tendo relação deste período com a disseminação parasitária, mas sem correlação com os sinais clínicos (SANTOS-GOMES et al., 2002).

Apesar da LVC ser considerada uma doença sistêmica grave, estudos de descrição histopatológica detalhada e avaliação de perfil de citocinas e mediadores inflamatórios permitiram o entendimento de que a resposta imune frente à LVC é compartimentalizada em órgãos específicos (REIS et al., 2009). A variação na composição do infiltrado inflamatório relacionada ao órgão alvo analisado foi descrita por Sanchez et al. (2004).

1.1.5. Leishmaniose Visceral Canina x Resposta Inata x Resposta Adaptativa

Estudos iniciais a respeito da resposta imune frente à leishmaniose definiam o processo como exclusivamente dicotômico Th1/Th2 (pró-inflamatório/anti-inflamatório). Com o advento de técnicas moleculares, foi possível compreender a maior complexidade desta resposta (HOSEIN et al., 2017), e entender o papel essencial das citocinas na natureza da resposta imune (CUMMINGS et al., 2010).

Na LVC, foram identificadas respostas do tipo Th1, Th2 e uma associação entre estas respostas em diversos órgãos estudados, e estes achados foram correlacionados com os níveis de carga parasitária e com as apresentações clínicas dos cães (BOGGIATTO et al., 2010; STRAUSS-AYALI et al., 2007; TRAVI et al., 2009).

Mais recentemente, investigações a respeito do envolvimento da resposta imune Th17 estão sendo realizados. Esta resposta tem sido associada à patogenia de algumas infecções causadas por protozoários (GUEDES et al., 2010; ZHANG et al., 2013), porém ainda são escassos os trabalhos que esclarecem o papel da resposta Th17 na infecção por *L. infantum* (CEZÁRIO et al., 2011).

É sabido que a resposta imune adaptativa desencadeada está intrinsecamente relacionada com a resolução da infecção, mas, mais recentemente, trabalhos reforçam evidências de que a resposta imune inata desempenha papel crucial na defesa frente à LVC (FARIA et al., 2012).

Apesar dos mecanismos da resposta imune inata serem menos específicos ao patógeno, esta resposta instrui o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa específica de longa duração (KUMAR et al., 2009), e é capaz de promover um reconhecimento específico ao patógeno, por meio de componentes moleculares e celulares (HOSEIN et al., 2017).

As células associadas à resposta imune inata, como células dendríticas e macrófagos, agem na eliminação do patógeno, principalmente por meio da

fagocitose e da indução da produção de citocinas (KUMAR et al., 2009). Além disso, a resposta imune inata, durante a invasão do patógeno, utiliza receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para identificação de moléculas padrões associadas ao patógeno (PAMPs), e este reconhecimento permite a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas efetoras adicionais, que participarão da ativação posterior da resposta imune adaptativa (FARIA et al., 2012). Nas infecções por *Leishmania*, foram descritas moléculas como lipofosfoglicanos (LPG), glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs) e glicoproteína 63 (gp63) como potenciais PAMPs relacionados a este patógeno (DOS SANTOS et al., 2017).

Apesar da polarização da resposta imune adaptativa não ser considerada regra absoluta, sabe-se que, em cães assintomáticos, há certa prevalência da resposta Th1, mediada pelas citocinas IL-2, IFN γ e TNF α . Em cães sintomáticos, em contraponto, há prevalência da resposta Th2, mediada por IL-4, IL-10, entretanto ainda há controvérsias a respeito destes achados (BARBIÉRI, 2006) (Figura 01). Destaca-se também o papel das células Treguladoras (Treg), que desencadeiam resposta do tipo Th0 (misto de Th1 e Th2), com capacidade de supressão da resposta imune por meio da interação célula-célula e/ou pela produção de citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β (BELKAID et al., 2002; CAMPANELLI et al., 2006; GANTT et al., 2003).

Em cães sintomáticos, a falha da resposta celular específica é caracterizada por uma redução do número de linfócitos T CD4 $^{+}$ e uma redução linfoproliferativa aos antígenos de *L. infantum* (SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Os linfócitos T CD8 $^{+}$, por meio de mecanismos citotóxicos são importantes na proteção imune frente à LVC (GIUNCHETTI et al., 2008; REIS et al., 2009).

1.1.6. Leishmaniose Visceral Canina x Sistema Nervoso Central

A associação de quadros neurológicos à LV é pouco documentada, subestimada, e muitas vezes desconhecida, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária (MAIA et al., 2015).

Na LVC, o estudo do acometimento neurológico é recente (Tabela 01), sendo o seu primeiro relato datado em 1980 (ANDERSON et al., 1980). São poucas as investigações a respeito da epidemiologia e patogênese das alterações neurológicas centrais e periféricas (MAIA et al., 2015).

Em seres humanos, relatos de LV indicam que é possível o desencadeamento de neuropatia periférica, disfunção de nervos cranianos, meningite, além de alterações semelhantes à síndrome de Guillain-Barré (SNYDMAN et al., 2006). Em estudo sobre LV humana, foi identificada uma taxa de 46% de pessoas com sinais clínicos neurológicos, sendo a sensação de dormência nos pés o principal sinal clínico identificado (HASHIM et al., 1995).

O acometimento neurológico desperta atenção em virtude do sistema nervoso central (SNC) ser considerado sítio de privilégio imunológico, devido à sua alta capacidade de permeabilidade seletiva, por meio da baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade, baixo número de células apresentadoras de antígeno, ausência de drenagem linfática e eficiência da barreira hematoencefálica (BHE) (GALEA et al., 2007).

A BHE possui a capacidade de limitar o tráfico de leucócitos e de substâncias sanguíneas (MAN et al., 2007), por meio de suas células endoteliais especializadas com junções intercelulares do tipo oclusivas; presença de pericitos; macrófagos perivascularres e prolongamentos astrocitários (SAUNDERS et al., 2008).

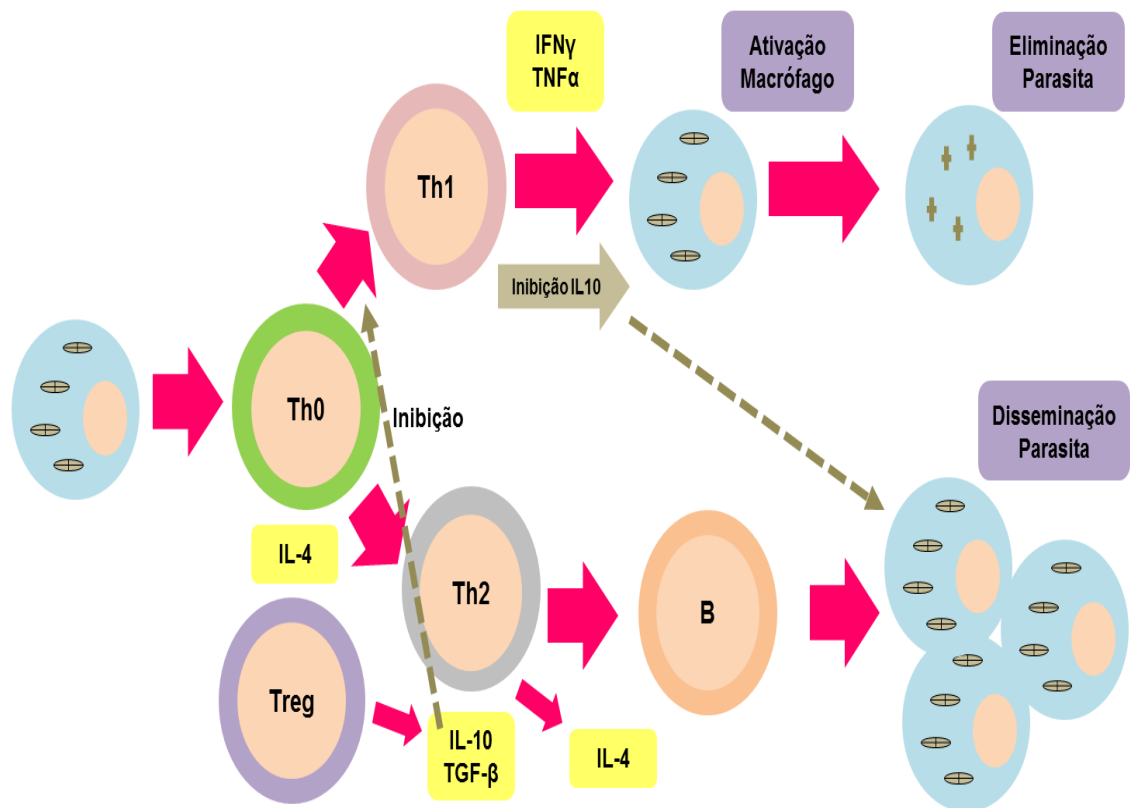


Figura 01 - Interação das respostas Th1 e Th2 na LVC. Na resposta Th1, relacionada com a eliminação do parasita e proteção, as citocinas IFN γ , IL-2 e TNF- α são capazes de induzir a ativação de macrófagos e morte de parasitas. A resposta Th1 é regulada negativamente por IL-10, produzida por células T reguladores (Treg). A IL-10 também é produzida por células Th1 e tem capacidade de limitar efeitos secundários da infecção. A resposta Th2 é relacionada com a disseminação do parasita associada ao aumento de atividade de células B, e é mediada por IL-10, TGF- β e IL-4. Adaptado de BANETH et al., 2008.

Apesar disto, é sabido que o SNC pode ser vulnerável aos danos desencadeados pela resposta inflamatória sistêmica, que promove a liberação de citocinas, quimiocinas e PAMPs sistemicamente, e estes, via fluxo

sanguíneo, podem interferir na relação neurônio-glia e prejudicar a homeostasia local (SANKOWSKI et al., 2015).

A exposição crônica a altos níveis de citocinas, a invasão de células do sistema imune, a expressão de moléculas de adesão, ativação do sistema complemento, e expressão de MHC estão diretamente relacionados à neurodegeneração, ativação glial e inflamação neurológica (LUCAS et al., 2006; QUAN et al., 1999).

Na LVC, há fortes evidências de que as alterações neurológicas são mediadas por mecanismos relacionados tanto com a imunidade celular quanto com a imunidade humoral (MELO et al., 2009; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2012). Em recente estudo, foi demonstrada a capacidade de *L. infantum* em encéfalos de cães de causar infecção ativa, conseqüente inflamação, quebra da integridade da BHE, além de disseminação em líquido cefalorraquidiano (OLIVEIRA et al., 2017).

Apesar a verificação da presença do parasita não ser frequentemente relatada no SNC (VIÑUELAS et al., 2001), complicações vasculares e lesões inflamatórias são considerados os achados patológicos mais frequentes (GIANUZZI et al., 2017). Há relatos da deposição de antígenos e imunoglobulinas (GARCIA-ALONSO et al., 1996), de migração do parasita em plexo coroide e meninges (NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001), e presença de múltiplos infartos em encéfalos de cães com LVC (JOSÉ-LOPEZ et al., 2012).

Além disto, são descritos grande infiltração de linfócito T (MELO et al., 2009), ativação de células gliais, alterações degenerativas em neurônio (MELO; MACHADO, 2011), meningite, coroidite (MACHADO et al., 2010), presença de enzimas do tipo metaloproteinases (MARANGONI et al., 2011), com ou sem manifestação clínica neurológica associada (IKEDA et al., 2007). A presença de DNA de *L. infantum* no encéfalo de cães com LVC foi identificada em 2014, sugerindo a migração do parasita para o SNC e/ou a passagem de DNA e proteínas solúveis para o compartimento encefálico (GRANO et al., 2014).

Dentre os possíveis sinais clínicos, foram relatados em cães com *L. infantum* convulsões generalizadas, tetraparesia, paraplegia, tetraplegia, andar em círculos alterações vestibulares e cerebelares, mioclonias, vocalização, anisocoria, midríase bilateral, nistagmo, ataxia, tremor de intenção (FONT et al., 2004; IKEDA et al., 2007; JOSÉ-LOPEZ et al., 2012). Em avaliação clínica de cães com LVC, foi identificada taxa de prevalência de sinais clínicos neurológicos de 4% (FEITOSA et al., 2000).

1.1.7. Subclasses funcionais dos genes de interesse

1.1.7.1. Receptores de reconhecimento padrão

Os receptores de reconhecimento padrão (PPRs) são receptores imunológicos que reconhecem fatores moleculares padrões (PAMPs), estruturas presentes no parasita, e assim permitem o desencadeamento de cascatas de reações imunes (FUKATA et al., 2009).

O NOD1 é um dos 20 membros da família de receptores do tipo NOD (domínio de oligomerização de nucleotídeo contendo proteína), são proteínas citosólicas que recrutam outras proteínas, por meio do reconhecimento de PAMPs, e desencadeiam vias de sinalização relacionadas à inflamação (ELINAV et al., 2011).

O NOD1 participa da sinalização apoptótica, interação proteína-proteína, início da inflamação, além da regulação no complexo NF- κ B e de citocinas, como TNF (CLAY et al., 2014). O NOD1 pode ser expresso por células de origem hematopoiética e não hematopoiética, incluindo as células endoteliais (GATHERAL et al., 2012). Este receptor é um importante mediador da inflamação vascular (PHILPOTT et al., 2014).

Tabela 01 - Análise retrospectiva de pesquisas a respeito do acometimento nervoso em cães com LVC (adaptado de Giannuzzi et al., 2017).

Referência	Título
Anderson et al., 1980	Endemic canine leishmaniasis
Garcia-Alonso et al., 1996	Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during <i>Leishmania</i> infection in dogs. Pathological features at the central nervous system
Nieto et al., 1996	Detection of <i>Leishmania infantum</i> amastigotes in canine choroid plexus
Viñuelas et al., 2001	Meningeal leishmaniosis induced by <i>Leishmania infantum</i> in naturally infected dogs
Lima et al., 2003	Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis
Font et al., 2004	Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis
Marcondes et al., 2006	Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infectados por <i>Leishmania chagasi</i>
Ikeda et al., 2007	Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>
Melo et al. 2009	Leukocyte entry into the CNS of <i>Leishmania chagasi</i> naturally infected dogs
Melo; Machado, 2009	Choroid plexus involvement in dogs with visceral Leishmaniasis: a histopathological investigation
Machado et al., 2010	Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis

- Toplu; Aydogan, 2011 An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis
- Cauduro et al., 2011 Paraparesis caused by vertebral canal leishmaniotic granuloma in a dog
- Melo; Machado, 2011 Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T-lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres
- Marangoni et al., 2011 Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis
- José-López et al., 2012 Presumed brain infarctions in two dogs with systemic leishmaniasis
- Melo et al., 2012 Canine cerebral leishmaniasis: potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease
- Melo et al. 2013 Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: a natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection
- Márquez et al., 2013 *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog
- Sakamoto et al., 2013 T and B lymphocytes in the brains of dogs with concomitant seropositivity to three pathogenic protozoans: *Leishmania chagasi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*
- Grano et al., 2014 First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs
- José-López et al., 2014 Intramedullary spinal cord mass presumptively associated with leishmaniasis in a dog
- Melo et al., 2014 Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis

Melo et al., 2015	Blood-brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis
Melo et al., 2015	<i>Leishmania</i> infection and neuroinflammation: specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally infected dogs
Cardinot et al., 2016	Detection of <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia vogeli</i> and <i>Toxoplasma gondii</i> DNA in the brain of dogs naturally infected with <i>Leishmania infantum</i>
Grano et al., 2016	T lymphocyte immunophenotypes in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis
Proverbio et al., 2016	Seizures as a consequence of hyperviscosity syndrome in two dogs naturally infected with <i>Leishmania infantum</i>
Macau et al., 2017	Main lesions in the central nervous system of dogs due to <i>Leishmania infantum</i> infection
Giannuzzi et al., 2017	Neurological manifestations in dogs naturally infected by <i>Leishmania infantum</i> : descriptions of 10 cases and a review of the literature
Zobba et al., 2017	A case of canine neurological leishmaniasis
Oliveira et al., 2017	Occurrence of <i>Leishmania infantum</i> in the central nervous system of naturally infected dogs: parasite load, viability, co-infections and histological alterations
Grano et al., 2018	Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with visceral leishmaniasis

Pouco se sabe sobre o papel de NOD1 em infecções por *Leishmania* (CLAY et al., 2014). Até o presente momento, a investigação de NOD1 em encéfalos de cães ainda não foi documentada. Na infecção por *L. infantum* em macrófagos derivados de monócitos caninos, foram observados baixos níveis de transcrição de NOD1. Recentemente, em infecção por *L. donovani* em

camundongos BALB/c, a expressão de NOD1 permaneceu inalterada frente à infecção, não sendo possível a associação deste silenciamento de NOD1 com o agravamento da doença (JAWED et al., 2018).

A família TLR é constituída por 11 membros (TLR1 a TLR11), e são proteínas transmembrana com capacidade de conferir especificidade a células imunes inatas (JANSSES; BEYAERT, 2003). Os TLRs são considerados um dos primeiros sistemas de defesa contra a invasão por microorganismos (ODA; KITANO, 2006).

Os TLRs possuem a capacidade de iniciar a resposta inata de diferentes caminhos, que desencadeiam a produção de citocinas inflamatórias. TLRs estão localizados na membrana plasmática ou membrana interna de células dendríticas, células *natural killers* e macrófagos. Linfócitos T e B também são capazes de expressar TLRs (KAWAI; AKIRA, 2011).

Para que ocorra a ativação de células, a principal via de transdução de sinal destes receptores é a via NF- κ B (BARTON; MEDZHITOV, 2003). TLR4 é expresso por uma variedade de tipos células como células dendríticas, macrófagos e células endoteliais (MEDZHITOV, 2001); é responsável pela regulação de TNF, IL1 β , IL-6 e IFN β 1; sua expressão é potencializada por citocinas pró-inflamatórias e pode ser afetada negativamente por citocinas anti-inflamatórias (MUZIO et al., 2000).

Na LVC, é conhecido o papel do TLR4 no controle da infecção e na tentativa de eliminação do parasita (HOSEIN et al., 2017). O aumento da expressão deste gene, em infecções por *L. infantum*, foi observado em amostras de baço de camundongos em fase aguda e crônica (CEZÁRIO et al., 2011); e em amostras de baço e linfonodo de cães naturalmente infectados (MELO et al., 2014). Grano et al. (2018) observaram o aumento da expressão de TLR4 em amostras de cérebros de cães com LVC.

A capacidade do TLR5 de interação com outros TLRs e de participação na resposta imune ainda é pouco conhecida (HOSEIN et al., 2017). TLR5 é expresso em células dendríticas imaturas, células epiteliais, células NK, monócitos e células T (OKAMURA et al., 2003). A ativação de TLR5 mobiliza o

fator nuclear NF- κ B, que torna ativo a maior parte dos genes alvo relacionados com a inflamação (HORNUNG et al., 2002).

O TLR6 é altamente expresso em células B, e em menor quantidade em células NK e monócitos (OKAMURA et al., 2001). O TLR6 interage funcionalmente com o TLR2 para mediar resposta imune celular, e é responsável pela regulação de TNF, IL-6, CXCL8 e IL-1B (MEDZHITOV, 2001). Além disso, o TLR6 atua como dímeros de reconhecimento de PAMPs com TLR1 e TLR2 (OSPELT; GAY, 2010).

As participações do TLR5 e TLR6 na resposta imune frente à LVC ainda são pouco compreendidas (HOSEIN et al., 2017). Turchetti et al. (2015) verificaram elevados níveis de transcrição de TLR5 e TLR6 em macrófagos derivados de monócitos caninos infectados para *L. infantum*. Em contraponto, Grano et al. (2018) observaram o aumento da expressão de TLR5 em baço de cães, mas não detectaram diferença na expressão de TLR6 em amostras de baço e cérebro quando comparados ao grupo controle.

TLR7 e TLR8 compartilham do mesmo ligante, e são encontrados dentro de membranas endossômicas intracelulares (ALEXOPOULOU et al., 2012). TLR7 é expresso em células B e células dendríticas plasmocitoides precursoras, e é altamente induzido por IL-6, e moderadamente regulado por outras citocinas (HORNUNG et al., 2002).

O TLR7 foi relatado em alta expressão em amostras de fígado de camundongos infectados para *L. donovani* (PAUN et al., 2011), mas em baixos níveis de transcrição em macrófagos derivados de monócitos caninos infectados para *L. infantum* (TURCHETTI et al., 2015).

1.1.7.2. Receptores transmembrana

O receptor CD4 é expresso em linfócitos T, células B, macrófagos e granulócitos, além de ser expresso em diferentes regiões do cérebro (LIU et al., 2001). O CD4 é capaz de codificar uma glicoproteínas de membrana de

linfócitos T que ativam diretamente com MHC II e participa das vias de sinalização de Th1 e Th2 (JOSHI-TOPE et al., 2005).

A importância de células CD4+ em cães com LVC em diferentes cargas parasitárias já foi evidenciada (MIRANDA et al., 2007). Reis et al. (2009) detectaram um aumento do número de células T CD4+ em cães com baixo parasitismo. Em amostras de linfonodo de cães com LVC, foi identificado número maior de células TCD4+ em cães tratados e assintomáticos quando comparados aos cães negativos. Além disso, houve a correlação entre a presença de célula T CD4+ e o controle do parasita (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010).

A proteína codificada pelo gene CD14 é preferencialmente expressa em macrófagos e monócitos (McGOVERN et al., 2014). O CD14 é considerado um marcador constitutivo da micróglia, mas os estudos a respeito da localização celular desta expressão ainda são escassos. Apesar disto, a mensuração dos níveis de expressão de CD14 é imprescindível para a determinação dos níveis de ativação da micróglia (WALKER; LUE, 2015).

Nas principais condições patológicas do SNC, como infecção e inflamação, a ativação de células microgлияis é considerada o ponto chave. Para que ocorram estas respostas imunes locais, é necessário que haja a transdução de sinal via diferentes ligações de receptores.

No sistema imune inato, o receptor CD14 tem função primordial em eventos inflamatórios como a transdução de sinal (via TLRs), ativação de diferentes vias (incluindo a NF- κ B), além da síntese de citocinas, como TNF e diferentes interleucinas (BESCHORNER et al., 2002).

Apesar de não haver estudo sobre a expressão de CD14 em encéfalos de cães com LVC, foi identificado o aumento da expressão deste gene, em macrófagos expressando TLR9, em jejuno em comparação a cólon de cães infectados (FIGUEIREDO et al., 2013). Monócitos periféricos CD14+ e macrófagos hepáticos CD14+ foram identificados na LVC e correlacionados diretamente a carga parasitária tecidual (DE AMORIM et al., 2011; LIMA et al., 2007).

O CD209, também conhecido como DC-SIGN (*cell-specific- intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin 1*), responde a PAMPs, mediando a adesão, migração, inflamação e ativação de células T, além do desencadeamento de respostas imunes (FENG et al., 2018). Este receptor está presente na superfície de macrófagos e células dendríticas, e sua interação com PAMPs pode ativar a fagocitose por estas células. Na imunidade inata, DC-SIGN pode promover seu início por meio da modulação de TLRs (JIANG; SUN, 2017). O estudo deste gene é recente, e não há relação de CD209 e *Leishmania* ainda documentada.

A proteína codificada pelo gene CD40LG é moduladora essencial em diversas respostas imune, e é expressa canonicamente em células T CD4+ (CHATZIGEORGIOU et al., 2009). Dentre suas funções, destaca-se a ativação de células dendríticas e monócitos, mediada por células T (CAUX et al., 1994). Entretanto, há a sugestão de que células T CD8+ também são capazes de expressar CD40LG, mesmo que transitoriamente, e assim possuir a capacidade de regulação de respostas imunes específicas (SHUGART et al., 2013).

O CD40LG participa da regulação da ação de CD86, CD80, além de TNF e ICAM1, e pode ser regulado diretamente por IFNG, CD40 e os linfócitos T (SCHÖNBECK; LIBBY, 2001). Até o presente momento, não há relatos da expressão deste gene relacionada à LVC.

Os CD80 e CD86 estão diretamente relacionados à resposta imune Th1, Th2, e a ativação de células T. A proteína codificada pelo gene CD80 participa da indução da proliferação de células T e da produção de diferentes citocinas, como IL-2, IL-4 e IFN γ (DOTY; CLARK, 1998).

De maneira semelhante, o gene CD86 é regulado por CD40LG, TNF, IFN γ . Este gene é responsável pela codificação de uma proteína de membrana do tipo 1 que, em ligação com CD28, atua como um sinal co-estimulatório para a ativação de célula T. Além disso, O CD86 está relacionado com a regulação de diferentes citocinas como IL-2, IL-4, IFN γ e TNF (CHUNG et al., 2008).

No cérebro, as expressões de CD80 e CD86 são fortemente reguladas pela inflamação, e estes receptores estão associados principalmente à microglia (BECHMANN et al., 2001; MAGNUS et al., 2005), mas podem ser encontrados também em astrócitos, neurônios e células-tronco neurais, dependendo do tipo de animal usado como modelo experimental (IMITOLA et al., 2004; LIU et al., 2006; ZEINSTRA et al., 2003).

Estudos prévios com *Leishmania major* e *Leishmania donovani* em células dendríticas humanas demonstram a capacidade deste parasita em regular positivamente moléculas de CD80 e CD86 (GHOSH et al., 2006; McDOWELL et al., 2002). Além disso, Probst et al. (1997) observaram que uma proteína exossômica, o fator de iniciação eucariótica de *Leishmania* (LeIF), teve a capacidade, em células dendríticas humanas, de regular positivamente a expressão de CD80.

1.1.7.3. Fatores de transcrição

O TRAF6 é um fator associado ao receptor TNF (TRAF). TRAFs são responsáveis por codificarem proteínas que fazem a modulação da transdução de sinal de membros da superfamília de receptores TNF, além de modularem família Toll/IL-1 e sinais de receptores como CD40.

Além disso, estas proteínas são responsáveis pela tradução de sinal na via NF- κ B, que ativa a quinase I κ B (IKK) em resposta a citocinas pró-inflamatórias. O TRAF6 é responsável pela regulação de IL1 β , IRAK1 e MyD88 (LAMOTHE et al., 2008).

Em estudo com macrófagos estimulados CD40/TNF α , previamente infectados com *L. major*, o peptídeo bloqueador CD40-TRAF6 foi capaz de inibir o aumento de expressão de iNOS (sintase induzida do óxido nítrico), que possui papel central na regulação imune (PORTILLO et al., 2012).

Na infecção por *L. donovani*, sabe-se que o início da resposta imune inata se dá pelo reconhecimento das estruturas moleculares relacionadas ao patógeno por receptores TLRs, que ativados, se ligam ao fator de diferenciação

mieloide 88 (MyD88), e assim recrutam proteínas de quinase associadas ao receptor de IL-1 (IRAK) e ao TRAF6 (SRIVASTAV et al., 2015).

Outra subclasse de fatores de transcrição são os fatores de transcrição regulatórios de interferon (IRF). A resposta imune inata possui como uma das principais características a indução de IFN tipo I (IFN- α / β), esta ocorre por meio da ativação dos receptores PPRs do sistema imune inato. O IRF3 desempenha papel essencial neste processo (TAMURA et al., 2008).

O IRF3 tem várias citocinas como gene alvo, IL-15, CXCL10, RANTES, mas principalmente os genes de IFN do tipo 1 (GORIELY et al., 2006). Além disso, há a sugestão de que IRF3 atue como regulador na expressão de miRNA-155 (TARASSISHIN et al., 2011).

A literatura sobre IRF3 ainda é escassa e sua relação com infecção por *L. infantum* ainda não foi documentada. Recentes trabalhos evidenciam a relação de IRF3 com infecções por parasitas tripanossomatídeos.

Em um modelo de infecção por *Trypanosoma cruzi* em macrófagos e fibroblastos, foi evidenciada que a sinalização de IRF3 é necessária para que haja a expressão de IFN β , por uma via independente de TLR (CHESSLER et al., 2008). Sabe-se que antígenos derivados de *T. cruzi*, por meio da regulação negativa de Ro52, permitem que IRF3 estimule continuamente a transcrição de IFN α e IFN β em monócitos, fibroblastos e células T (WINKLER; PAN, 2010).

É evidenciada também a relevância de IRF3 em patologias do SNC. Em um modelo de acidente vascular cerebral em camundongos, a capacidade neuroprotetora de IRF3 foi evidenciada pela indução de IFN β e por sinalização aumentada de TLR, promovendo meio importante de proteção de danos isquêmicos (MARSH et al., 2009).

O IRF6 desempenha papel multifuncional na regulação da resposta imune, e tem a capacidade de regulação da produção de IFN γ e IL-10 (LIN et al., 2016). O IRF6 é o único membro dos IRFs que não se relaciona diretamente com a ativação ou função de outros IRFs (HOU et al., 2017).

O IRF6 exerce papel crucial no controle da proliferação e diferenciação de queratinócitos (RICHARDSON et al., 2006) e mutações no gene IRF6 tem

sido identificadas na Síndrome de Van der Woude (KONDO et al., 2002). Sabe-se que IRF6 é constitutivamente expresso no cérebro, especialmente em neurônios corticais (LIN et al., 2016).

A investigação sobre IRF6 é recente, e sua relação com a infecção por *Leishmania* ainda não foi documentada. Sua relevância biológica é estudada em doenças neurológicas. Em um modelo de lesão cerebral traumática em ratos, IRF6 pode promover apoptose neuronal (LIN et al., 2016), e, em um ensaio com células endoteliais cerebrovasculares murinas,

O IRF6 foi identificado como chave para a supressão do dano cerebral pós acidente vascular encefálico (HUANG et al., 2017). A baixa expressão de IFR6 foi entendida como efeito protetivo na injúria traumática neuronal em ensaio com neurônios corticais primários de camundongos (HOU et al., 2017).

1.1.7.4. Quimiocina e receptores de quimiocinas

Quimiocinas, pequenos polipeptídeos, regulam o tráfico de vários tipos de leucócitos e são imprescindíveis para o desenvolvimento de diferentes vias canônicas de resposta imune.

A CCL3 aparentemente participa tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adaptativa, provavelmente pela sua associação a macrófagos, mas também pela sua ação de quimioatração para linfócitos T CD4 e CD8 ativados (BENDALL, 2005).

A CCL3 é uma β -quimiocinas, também conhecida por MIP-1 α (proteínas de macrófagos inflamatórios), e possui alta quimioatratividade para monócitos/macrófagos, células dendríticas, subconjuntos de linfócitos T, entre outros (BENDALL, 2005).

A expressão de CCL3 já foi descrita em cérebros humanos e em neurônios cultivados (SCHLUTER, 2001). Segundo Bendall (2005), células gliais, e até mesmo leucócitos de infiltrados inflamatórios, podem induzir a produção de quimiocinas no tecido nervoso.

Apesar desta quimiocina estar associada a macrófagos e à ativação de células NK, sabe-se que há uma quimioatração seletiva da mesma para linfócitos T ativados CD8 e CD4 (TAUB et al., 1993).

Na LVC, Strauss-Ayali et al. (2007) verificaram a alta expressão de CCL3 em amostras de baço de cães naturalmente infectados, e atribuíram o acúmulo de infiltração de monócitos, células CD4+ e CD8+ à quimioatração.

Melo et al. (2015), avaliando encéfalos de cães com LVC, identificaram o aumento da expressão desta quimiocina, o que leva a dedução de que o encéfalo de cães com LVC é um ambiente pró-inflamatório propício para o acúmulo seletivo de diferentes populações de células, com predominância de linfócitos T (MELO et al., 2009).

A proteína codificada do gene CCR4 pertence à família de receptores acoplados a proteína G, e possui a capacidade de regulação de diferentes citocinas, como o TNF (YOSHIE et al., 2002).

O CCR4 é considerado um marcador seletivo para linfócitos Th2, e CCL17 e CCL22 são produzidos constitutiva e seletivamente para CCR4. Dentre as funções biológicas de CCR4 podem se destacar a migração de linfócitos T para o tecido linfóide e a mobilização de células dendríticas (MURDOCH; FINN, 2000).

O CCR6 está expresso em linfócitos T e B, monócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e células NK (MURDOCH; FINN, 2000). CCR6 é o único receptor conhecido para CCL20, que é produzido por macrófagos ativados, células endoteliais e células dendríticas; e esta sinalização desencadeia a mobilização de cálcio e a quimiotaxia (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2000).

Recentemente, foi atribuída a participação de CCR6 na resposta Th17, sendo verificada a necessidade de células Th17 serem positivas para CCR6 para que ocorra a produção da citocina IL17 (VAN LANGELAAR et al., 2018).

O CCR8 é expresso em linfócitos Th2, monócitos, neutrófilos e tecidos pulmonar, cerebral, esplênico e muscular esquelético (SOLER et al., 2006). O

CCR8 liga-se a CCL1, quimiocina relevante nos processos de inflamação crônica (SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 2000).

A investigação na LVC destes receptores é escassa na literatura, e a avaliação em encéfalos de cães infectados ainda não foi documentada. Em amostras de fígado e baço de cães infectados para *L. infantum*, foi identificada uma baixa expressão de CCR4, CCR6 e CCR8 tanto em cães sintomáticos quanto cães assintomáticos comparados ao grupo controle (NASCIMENTO et al., 2013).

Em infecções por *Trypanosoma cruzi* (protozoário da família Trypanosomatidae, assim como *Leishmania*), é clara a relevância de receptores de quimiocina na ativação de integrinas, adesão de leucócitos e desencadeamento da inflamação (COSTA et al., 2016).

1.1.7.5. Citocinas

A citocina codificada por IFN β 1 se relaciona como parte da resposta inata, além de estar envolvida na diferenciação celular. Interferons tipo 1 se ligam a um complexo de receptores homólogos e induzem a transcrição de genes como citocinas e quimiocinas inflamatórias. Este gene pode ser regulado por IRF3 e TLR3 (COCCIA, 2008).

Os interferons deste tipo são polipeptídeos que são secretados por células infectadas e que apresentam funções relevantes como a limitação da disseminação de agente infecciosos por indução de estados antimicrobianos de célula a célula; a modulação de respostas imunes inatas restringindo vias pró-inflamatórias e produção de citocinas exacerbadas; e a ativação do sistema imune adaptativo, favorecendo o desenvolvimento de células T e B (TRINCHIERI et al., 2010).

A produção de IFN tipo 1 é induzida após a detecção do patógeno por PPRs e por citocinas (IVASHKIV; DONLIN, 2014). IFNs tipo 1 podem ter a capacidade de supressão da produção de citocinas por células imunes inatas, e em estimulações crônicas por complexos imunes, DAMPs e potencialmente

IFNs, pode haver o aumento da produção de IL-10 por monócitos, o que relaciona-se com a supressão da imunidade inata e adaptativa (IVASHKIV; DONLIN, 2014).

O entendimento da relevância de IFN β 1 em infecções por *Leishmania* ainda é pouco esclarecido, e, até o presente momento, a relação de IFN β 1 e LVC ainda não foi documentada.

Em modelo de macrófagos humanos infectados tanto por *L. amazonensis* quanto por *L. braziliensis*, houve o aumento da carga parasitária relacionado com IFN β 1 dose-dependente, sem que houvesse relação com NO endógeno ou exógeno (KHOURI et al., 2004). Em investigação em células dendríticas plasmocitoides de camundongos expostas à *L. infantum in vitro*, foi observada uma forte produção de IFN β 1 relacionada a expressão de TLR9 (SCHLEICHER et al., 2009).

O TNF é uma citocina multifuncional pro-inflamatória, pertence à superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF) e é secretada principalmente por macrófagos. Recentes estudos sugerem a importante função neuroprotetiva desta citocina (BANNO et al., 2004).

O TNF, juntamente com a IL-1 β , está relacionado às alterações funcionais da barreira hematoencefálica, e possui ação na expressão de moléculas de adesão no endotélio o que permite o tráfico de leucócitos no tecido nervoso (ABBOTT et al., 2006). Sabe-se que, em astrócitos, o TNF α e o IFN γ , principal citocina Th1, podem aumentar a expressão de TLR (CARPENTIER et al., 2005).

Uma variedade de trabalhos investiga a expressão de TNF na infecção por *L. infantum* em diferentes órgãos de cães (HOSEIN et al., 2017). Na LVC, a alta expressão de TNF foi verificada em amostras de pele de cães doentes (BRACHELENTE et al., 2005), na medula óssea de cães infectados (MANZILLO et al., 2006), em amostras de linfonodo de cães assintomáticos (ALVES et al., 2009), em amostras de pele de cães subclínicos e de cães sintomáticos (MENEZES-SOUZA et al., 2011; PAPADOGIANNAKIS, KOUTINAS, 2015), em amostras de jejuno e cólon de cães infectados

(FIGUEIREDO et al., 2013), em amostras de linfonodos de cães positivos (VENTURIN et al., 2016).

Melo et al. (2013) identificaram aumento da expressão de TNF em amostras de cérebro de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, mas não houve correlação desta expressão com a carga parasitária. Em contraponto, Grano et al. (2018) observaram uma maior expressão em cães saudáveis quando comparados a cães infectados.

Apesar de algumas divergências na literatura, grande parte dos trabalhos, que investiga a expressão de TNF, destaca seu mecanismo efetor de proteção relacionado à ativação de macrófagos e controle da infecção por LVC (HOSEIN et al., 2017).

Por fim, cabe destacar o envolvimento do TNF juntamente com a IL-1 β nas alterações de permeabilidade da BHE, já descrita em encéfalos de cães naturalmente infectados para *L. infantum*, o que permite o tráfico de leucócitos no tecido nervoso, por meio da expressão de moléculas de adesão (ABBOTT et al., 2006; MELO et al., 2015).

A IL-13 é uma citocina imunoreguladora produzida primariamente por células Th2 ativadas, mas também por células T, células NK e células dendríticas, e está envolvida em uma série de estágios de maturação e diferenciação de células B (KWON et al., 2018).

A IL-13, em similaridade com a IL-4, é considerada classicamente como uma citocina anti-inflamatória por ter capacidade de inibição da inflamação tipo 1 (IFN- γ , IL-12, NO), entretanto ressalta a capacidade desta citocina em regular a resposta Th1 e Th17 de células T, além de importantes funções na resposta Th2, o que permite o entendimento de que estas citocinas não podem ser considerada unicamente anti-inflamatórias (McCORMICK; HELLER, 2015).

Em infecções por *L. infantum* em cães, a literatura sobre IL-13 ainda é pouco esclarecedora, e a detecção de alta expressão deste gene está relacionada principalmente a amostras de pele, tanto em cães positivos subclínicos quanto em cães sintomáticos (BRACHELENTE et al., 2005; MENEZES-SOUZA et al., 2011; PAPADOGIANAKIS, KOUTINAS, 2015). Até o

presente momento, não há relatos da avaliação de IL-13 em encéfalos de cães com LVC.

O IFN γ é membro da classe interferon tipo II, e é secretada tanto na resposta imune inata quanto na resposta imune adaptativa. Na resposta imune inata, é produzida por células NK, linfócitos NKT, e linfócitos T gamadelta+; na resposta adaptativa, em linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. IFN γ é regulado por IL-12, IL-18, CD3 e CD28, majoritariamente (DALTON et al., 2000).

Dentre as funções exercidas por IFN γ , destacam-se o controle de linfócitos; ativação potente de macrófagos, levando a produção de NO; estímulo para o aumento da expressão de moléculas do MHC I e MHC II; moléculas de adesão e moléculas co-estimuladoras (DALTON et al., 2000).

A citocina IFN γ é bastante investigada na LVC. A expressão desta citocina é entendida como compartimentalizada em órgãos específicos (CARRILO; MORENO, 2009).

O aumento da expressão desta citocina foi vastamente verificada, como na investigação em linhagem de macrófagos caninos (PINELLI et al., 2000), em amostras de sangue pós estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania* (CHAMIZO et al., 2005), em amostras de pele de cães doentes (BRACHELENTE et al., 2005), em medula óssea de cães infectados (MANZILLO et al., 2006), em amostras de baço de cães sintomáticos e amostras de fígado de cães assintomáticos (CORREA et al., 2007), em amostras de baço associada à carga parasitária (LAGE et al., 2007, STRAUSS AYALI et al., 2007), em amostras de linfonodo em cães assintomáticos (ALVES et al., 2009) e sintomáticos (BARBOSA et al., 2011), em pele de cães positivos subclínicos (MENEZES-SOUZA et al., 2011).

Melo et al. (2013) evidenciaram a alta expressão de IFN γ em encéfalos de cães com LVC sem correlação com a carga parasitária; e Melo et al. (2017), em um modelo de inflamação em cérebros de ratos infectados para *L. donovani*, observaram a alta expressão de IFN γ , em fase inicial e tardia da doença, e associaram esta expressão à produção de quimiocinas e desestabilização da BHE.

1.1.7.6. Resposta Th17

A regulação da resposta Th17 e consequente diferenciação de células T *naive* em células Th17 dependem da sinalização via receptor de célula T (TCR) e do sinal de citocina, geralmente IL-6, levando à regulação de TGF β (STOCKINGER et al., 2007).

A resposta Th17 induz a produção de citocinas como IL17A, IL17F, IL21 e IL22, e estas citocinas podem estimular a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias (GÁLVEZ, 2014). Para que ocorra o sucesso desta resposta é preciso que STAT3 regule IL-6 e assim ocorra a diferenciação Th17 (AUGUST, 2018). Além disso, a presença de IL-6, combinada à expressão de TGF β , ativam o fator de transcrição RORC, o que leva a diferenciação Th17 (KORN et al., 2009).

O receptor de quimiocina CCR6 possui a capacidade de regulação da migração e recrutamento de células T e dendríticas durante a inflamação e diferentes repostas imunes (GREAVES et al., 1997).

Para que ocorra a completa diferenciação da resposta Th17, é imprescindível a ação de IL-23, citocina pró-inflamatória da família IL-12 (LIU et al., 2012). A IL-17A participa tanto da resposta imune inata quanto adaptativa, e é considerada uma das principais citocinas pró-inflamatórias (ISAILOVIC et al., 2015).

A IL-17F tem como principal função o aumento da resposta inflamatória induzida por TNF α (ANDOH et al., 2008). Tanto IL-17A quanto IL-17F são consideradas potentes estimuladoras da produção de IL-6, IL-1 β , TNF- α e PGE2 (YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013).

Em estudo com infecção por *L. infantum* em diferentes tecidos de cães, foi evidenciada uma baixa expressão de IL-17 e IL-22 (citocinas relacionadas à resposta Th17) com a progressão da doença em amostras de linfonodos; baixa expressão de IL-22 em amostras de baço comparadas ao grupo controle; baixa expressão de IL-22 em amostras de fígado relacionada com a progressão da

doença; e, em amostras de pele, não houve a detecção de diferença da expressão de IL-17 e IL-22 do grupo controle.

1.2. REFERÊNCIAS

ABBOTT, N. J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 41-53, Jan 2006.

ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 137, n. 3-4, p. 275-83, Oct 15 2010.

ALEXOPOULOU, L.; DESNUES, B.; DEMARIA, O. Toll-like receptor 8: the awkward TLR. **Med. Scien.: M/S**, v. 28, n. 1, p. 96-102, 2012.

ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol**, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, C. F. et al. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 128, n. 4, p. 349-58, Apr 15 2009.

ANDERSON, D. C. et al. Endemic canine leishmaniasis. **Vet Pathol**, v. 17, n. 1, p. 94-6, Jan 1980.

ANDOH, A. et al. Mucosal cytokine network in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 33, p. 5154-61, Sep 7 2008.

AUGUST, A. Who regulates whom: ZNF341 is an additional player in the STAT3/TH17 song. **Sci Immunol**, v. 3, n. 24, Jun 15 2018.

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

BANNO, T.; GAZEL, A.; BLUMENBERG, M. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. **J Biol Chem**, v. 279, n. 31, p. 32633-42, Jul 30 2004.

- BARATA, R. A. et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 405083, 2013.
- BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 28, n. 7, p. 329-37, Jul 2006.
- BARBOSA, M. A. et al. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **J Comp Pathol**, v. 145, n. 4, p. 336-44, Nov 2011.
- BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor signaling pathways. **Science**, v. 300, n. 5625, p. 1524-5, Jun 6 2003.
- BECHMANN, I. et al. Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. **FASEB J**, v. 15, n. 6, p. 1086-8, Apr 2001.
- BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502-7, Dec 5 2002.
- BENDALL, L. Chemokines and their receptors in disease. **Histol Histopathol**, v. 20, n. 3, p. 907-26, Jul 2005.
- BESCHORNER, R. et al. Infiltrating CD14+ monocytes and expression of CD14 by activated parenchymal microglia/macrophages contribute to the pool of CD14+ cells in ischemic brain lesions. **J Neuroimmunol**, v. 126, n. 1-2, p. 107-15, May 2002.
- BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Vet J**, v. 162, n. 2, p. 108-20, Sep 2001.
- BOGGIATTO, P. M. et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 2, p. 267-73, Feb 2010.
- BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Vet Pathol**, v. 42, n. 2, p. 166-75, Mar 2005.

- CAMPANELLI, A. P. et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J Infect Dis**, v. 193, n. 9, p. 1313-22, May 1 2006.
- CARDINOT, C. B. et al. Detection of Ehrlichia canis, Babesia vogeli, and Toxoplasma gondii DNA in the Brain of Dogs Naturally Infected with Leishmania infantum. **J Parasitol**, v. 102, n. 2, p. 275-9, Apr 2016.
- CARPENTIER, P. A. et al. Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. **Glia**, v. 49, n. 3, p. 360-74, Feb 2005.
- CARRILLO E, MORENO J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol. Immunopathol.**, v. 128, n. 1, p. 67-70, 2009.
- CAUDURO, A. et al. Paraparesis caused by vertebral canal leishmaniotic granuloma in a dog. **J Vet Intern Med**, v. 25, n. 2, p. 398-9, Mar-Apr 2011.
- CAUX, C. et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. **J Exp Med**, v. 180, n. 4, p. 1263-72, Oct 1 1994.
- CEZARIO, G. A. et al. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 and cytokine production during experimental Leishmania chagasi infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 573-83, Aug 2011.
- CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 103, n. 1-2, p. 67-75, Jan 10 2005.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 873-82, Nov 2007.
- CHATZIGEORGIOU, A. et al. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. **Biofactors**, v. 35, n. 6, p. 474-83, Nov-Dec 2009.
- CHESSLER, A. D. et al. A novel IFN regulatory factor 3-dependent pathway activated by trypanosomes triggers IFN-beta in macrophages and fibroblasts. **J Immunol**, v. 181, n. 11, p. 7917-24, Dec 1 2008.
- CHUNG, Y. et al. A critical role of costimulation during intrathymic development of invariant NK T cells. **J Immunol**, v. 180, n. 4, p. 2276-83, Feb 15 2008.

- CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. **Compend. on Contin. Educat. for the Pract. Veterin.**, v.25, n.5, p.358-369, 2003.
- CLAY, G. M.; SUTTERWALA, F. S.; WILSON, M. E. NLR proteins and parasitic disease. **Immunol Res**, v. 59, n. 1-3, p. 142-52, Aug 2014.
- COCCIA, E. M. IFN regulation and functions in myeloid dendritic cells. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 19, n. 1, p. 21-32, Feb 2008.
- CORREA, A. P. et al. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by Leishmania (*Leishmania*) *chagasi*. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 3-4, p. 267-74, Feb 28 2007.
- COSTA, L. B. et al. Compound profiling and 3D-QSAR studies of hydrazone derivatives with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi*. **Bioorgan. & Medic. Chem.**, v. 24, n. 8, p. 1608-1618, 2016.
- CUMMINGS, H. E.; TULADHAR, R.; SATOSKAR, A. R. Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 294389, 2010.
- CUNHA A.M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi* n.sp. Nota prévia. **Hospital**, v. 11, p. 3-9, 1937.
- DALTON, D. K. et al. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. **J Exp Med**, v. 192, n. 1, p. 117-22, Jul 3 2000.
- DE AMORIM, I. F. G. et al. Toll receptors type-2 and CR3 expression of canine monocytes and its correlation with immunohistochemistry and xenodiagnosis in visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27679, 2011.
- DOS SANTOS, J. C. et al. The NOD2 receptor is crucial for immune responses towards New World *Leishmania* species. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 15219, Nov 9 2017.

- DOTY, R. T.; CLARK, E. A. Two regions in the CD80 cytoplasmic tail regulate CD80 redistribution and T cell costimulation. **J Immunol**, v. 161, n. 6, p. 2700-7, Sep 15 1998.
- ELINAV, E. et al. Regulation of the antimicrobial response by NLR proteins. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 665-79, May 27 2011.
- FARIA, M. S.; REIS, F. C.; LIMA, A. P. 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.
- FENG, D. et al. DC-SIGN reacts with TLR-4 and regulates inflammatory cytokine expression via NF-kappaB activation in renal tubular epithelial cells during acute renal injury. **Clin Exp Immunol**, v. 191, n. 1, p. 107-115, Jan 2018.
- FIGUEIREDO, M. M. et al. 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, May 14 2013.
- FONT, A. et al. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. **J Small Anim Pract**, v. 45, n. 4, p. 199-201, Apr 2004.
- FRAGA, D. B. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: a 13 years survey and association with human disease. **Vet Parasitol**, v. 190, n. 3-4, p. 591-4, Dec 21 2012.
- FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Semin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 242-53, Aug 2009.
- GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V. H. What is immune privilege (not)? **Trends Immunol**, v. 28, n. 1, p. 12-8, Jan 2007.
- GALVEZ, J. Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. **ISRN Inflamm**, v. 2014, p. 928461, 2014.

- GANTT, K. R. et al. Activation of TGF-beta by Leishmania chagasi: importance for parasite survival in macrophages. **J Immunol**, v. 170, n. 5, p. 2613-20, Mar 1 2003.
- GARCIA-ALONSO, M. et al. 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, n. 11, p. 539-46, Nov 1996.
- GATHERAL, T. et al. A key role for the endothelium in NOD1 mediated vascular inflammation: comparison to TLR4 responses. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e42386, 2012.
- GHOSH, M. et al. Leishmania donovani infection of human myeloid dendritic cells leads to a Th1 response in CD4+ T cells from healthy donors and patients with kala-azar. **J Infect Dis**, v. 194, n. 3, p. 294-301, Aug 1 2006.
- GIANNUZZI, A. P. et al. 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, n. 3, p. 125-138, Mar 2017.
- GIUNCHETTI, R. C. et al. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 121, n. 1-2, p. 23-33, Jan 15 2008.
- GORIELY, S. et al. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll-like receptor 4 (TLR4)- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 1078-84, Feb 1 2006.
- GRANO, F. G. et al. First detection of Leishmania infantum DNA within the brain of naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 204, n. 3-4, p. 376-80, Aug 29 2014.
- GRANO, F. G. et al. T lymphocyte immunophenotypes in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet. Parasit.**, v. 232, p. 12-20, 2016.
- GRANO, F. G. et al. Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary parasitology**, v. 253, p. 30-38, 2018.

- GREAVES, D. R. et al. CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3 α and is highly expressed in human dendritic cells. **J Exp Med**, v. 186, n. 6, p. 837-44, Sep 15 1997.
- GUEDES P.M.M.; GUTIERREZ. F;R;S.; MAIA, F.L.; MILANEZI, C.M.; SILVA, G.K.; PAVANELLI, W.R.; SILVA, J.S. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulation parasite-induced myocarditis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.4, p. 604, 2010.
- HASHIM, F. A. et al. Neurologic changes in visceral leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 52, n. 2, p. 149-54, Feb 1995.
- HORNUNG, V. et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. **J Immunol**, v. 168, n. 9, p. 4531-7, May 1 2002.
- HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 95-115, Jan 2017.
- HOU, M. S. et al. Down-Regulation of IRF6 Protects Cortical Neurons Against Traumatic Neuronal Injury Through Activating Akt-eNOS Pathway. **Cell Mol Neurobiol**, v. 37, n. 4, p. 587-594, May 2017.
- HUANG, R. et al. The transcription factor IRF6 co-represses PPAR γ -mediated cytoprotection in ischemic cerebrovascular endothelial cells. **Scient. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 2150, 2017.
- 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.
- IMITOLA, J. et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 α /CXC chemokine receptor 4 pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 52, p. 18117-22, Dec 28 2004.
- ISAILOVIC, N. et al. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. **J Autoimmun**, v. 60, p. 1-11, Jun 2015.

- IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 1, p. 36-49, Jan 2014.
- JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 4, p. 637-46, Oct 2003.
- JAWED, J. J. et al. Immunomodulatory effect of Arabinosylated lipoarabinomannan restrict the progression of visceral leishmaniasis through NOD2 inflammatory pathway: Functional regulation of T cell subsets. **Biom. & Pharm.**, v. 106, p. 724-732, 2018.
- JIANG, S.; SUN, L. Tongue Sole CD209: A Pattern-Recognition Receptor that Binds a Broad Range of Microbes and Promotes Phagocytosis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 9, Sep 4 2017.
- JOSE-LOPEZ, R. et al. Intramedullary spinal cord mass presumptively associated with leishmaniasis in a dog. **J Am Vet Med Assoc**, v. 244, n. 2, p. 200-4, Jan 15 2014.
- JOSE-LOPEZ, R.; LA FUENTE, C. D.; ANOR, S. Presumed brain infarctions in two dogs with systemic leishmaniasis. **J Small Anim Pract**, v. 53, n. 9, p. 554-7, Sep 2012.
- JOSHI-TOPE, G. et al. Reactome: a knowledgebase of biological pathways. **Nucleic Acids Res**, v. 33, n. Database issue, p. D428-32, Jan 1 2005.
- 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, May 27 2011.
- KHOURI, R. et al. IFN- β impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **The Journ. of Immun.**, v. 182, n. 4, p. 2525-2531, 2009.
- KONDO, S. et al. Mutations in IRF6 cause Van der Woude and popliteal pterygium syndromes. **Nat Genet**, v. 32, n. 2, p. 285-9, Oct 2002.
- KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 485-517, 2009.
- KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 388, n. 4, p. 621-5, Oct 30 2009.

- KWON, H. J.; CHOI, J. E.; BAE, Y. K. Interleukin-13 receptor alpha 2 expression in tumor cells is associated with reduced disease-free survival in patients with luminal subtype invasive breast cancer. **Tumour Biol**, v. 40, n. 6, p. 1010428318783657, Jun 2018.
- LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 115, n. 1-2, p. 135-45, Jan 15 2007.
- LAINSON R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETEERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Press Inc; 1987. p. 12-120.
- LAMOTHE, B. et al. The RING domain and first zinc finger of TRAF6 coordinate signaling by interleukin-1, lipopolysaccharide, and RANKL. **J Biol Chem**, v. 283, n. 36, p. 24871-80, Sep 5 2008.
- LIMA, V. M. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 4, p. 485-9, Apr 2003.
- LIMA, W. G. et al. Histopathological and immunohistochemical study of type 3 complement receptors (CD11b/CD18) in livers and spleens of asymptomatic and symptomatic dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 117, n. 1-2, p. 129-36, May 15 2007.
- LIN, Y. et al. Upregulation of Interferon Regulatory Factor 6 Promotes Neuronal Apoptosis After Traumatic Brain Injury in Adult Rats. **Cell Mol Neurobiol**, v. 36, n. 1, p. 27-36, Jan 2016.
- LIU, K. et al. Augmentation in expression of activation-induced genes differentiates memory from naive CD4⁺ T cells and is a molecular mechanism for enhanced cellular response of memory CD4⁺ T cells. **J Immunol**, v. 166, n. 12, p. 7335-44, Jun 15 2001.
- LIU, Y. et al. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. **Nat Med**, v. 12, n. 5, p. 518-25, May 2006.

- LIU, Z. et al. Increased Th17 cell frequency concomitant with decreased Foxp3+ Treg cell frequency in the peripheral circulation of patients with carotid artery plaques. **Inflam. Res.**, v. 61, n. 10, p. 1155-1165, 2012.
- LUCAS, S. M.; ROTHWELL, N. J.; GIBSON, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S232-40, Jan 2006.
- MACAU, W. L. et al. Main lesions in the central nervous system of dogs due to *Leishmania infantum* infection. **BMC Vet Res**, v. 13, n. 1, p. 255, Aug 18 2017.
- MACHADO, G. F. et al. 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, n. 3-4, p. 340-5, Aug 15 2010.
- MAGNUS, T. et al. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. **J Neurosci**, v. 25, n. 10, p. 2537-46, Mar 9 2005.
- MAIA, C. S. et al. Neurological disease in human and canine leishmaniasis--clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunol**, v. 37, n. 8, p. 385-93, Aug 2015.
- MAN, S.; UBOGU, E. E.; RANSOHOFF, R. M. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. **Brain Pathol**, v. 17, n. 2, p. 243-50, Apr 2007.
- MANZILLO, V. F., RESTUCCI, B., PAGANO, A., GRADONI, L. AND OLIVA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **Vet. Rec.**, v. 158, p. 690–694, 2006.
- MARANGONI, N. R. et al. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 33, n. 6, p. 330-4, Jun 2011.
- MARCONDES, J. S. et al. Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. **Rev. Bras. de Ciên. Vet.**, v. 13, n. 1, 2006.

- MARQUEZ, M. et al. Leishmania amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **J Vet Diagn Invest**, v. 25, n. 1, p. 142-6, Jan 2013.
- MARSH, B. et al. Systemic lipopolysaccharide protects the brain from ischemic injury by reprogramming the response of the brain to stroke: a critical role for IRF3. **Journ. of Neurosc.**, v. 29, n. 31, p. 9839-9849, 2009.
- MAURÍCIO I.L.; STOTHARD J.R.; MILES M.A. The strange case of Leishmania chagasi. **Parasit. Tod.** v.16, n. 5, p. 188-9, 2000.
- MCCORMICK, S. M.; HELLER, N. M. Regulation of Macrophage, Dendritic Cell, and Microglial Phenotype and Function by the SOCS Proteins. **Front Immunol**, v. 6, p. 549, 2015.
- MCDOWELL, M. A. et al. Leishmania priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 3994-4001, Aug 2002.
- MCGOVERN, N. et al. Human dermal CD14(+) cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 3, p. 465-477, Sep 18 2014.
- MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 2, p. 135-45, Nov 2001.
- MELO, G. D. et al. Leishmania infection and neuroinflammation: Specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally-infected dogs. **J Neuroimmunol**, v. 289, p. 21-9, Dec 15 2015.
- MELO, G. D. et al. Leukocyte entry into the CNS of Leishmania chagasi naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 162, n. 3-4, p. 248-56, Jun 10 2009.
- MELO, G. D. et al. Unveiling Cerebral Leishmaniasis: parasites and brain inflammation in Leishmania donovani infected mice. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 8454, Aug 16 2017.
- MELO, G. D. de et al. Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis. **Par. Immun.**, v. 36, n. 12, p. 726-731, 2014.
- MELO, G. D. et al. Blood–brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. **Par. Immun.**, v. 37, n. 12, p. 635-645, 2015.

- MELO, G. D. et al. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: a natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Vet. Parasit.**, v. 192, n. 1-3, p. 57-66, 2013.
- 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, n. 3, p. 293-304, Dec 2011.
- MELO, G. D.; MARCONDES, M.; MACHADO, G. F. Canine cerebral leishmaniasis: potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 148, n. 3-4, p. 260-6, Aug 15 2012.
- MELO, G.D.; MACHADO, G.F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral leishmaniasis: a histopathological investigation. **Braz. J. Vet. Pathol.**, v.2, n. 2, p. 69-74, 2009.
- MENEZES-SOUZA, D., CORREA-OLIVEIRA, R., GUERRA-SA, R., GIUNCHETTI, R. C., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O. A., OLIVEIRA, G. C. AND REIS, A. B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Vet. Parasit.**, v. 177, p. 39–49, 2011.
- MIRANDA, S. et al. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. **Vet. Parasit.**, v. 144, n. 3-4, p. 251-260, 2007.
- MIRO, G. et al. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 8, p. 371-7, Aug 2008.
- MURDOCH, C.; FINN, A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. **Blood**, v. 95, n. 10, p. 3032-43, May 15 2000.
- MUZIO, M. et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. **J Immunol**, v. 164, n. 11, p. 5998-6004, Jun 1 2000.

- NASCIMENTO, M. S. L., ALBUQUERQUE, T. D. R., DO-VALLE-MATTA, M. A., CALDAS, I. S., DINIZ, L. F., TALVANI, A., BAHIA, M. T., ANDRADE, C. M., GALVAO, L. M. C., CAMARA, A. C. J. AND GUEDES, P.M.M. Naturally Leishmania infantum-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. **Vet. Immun. and Immunop.**, v.153, p. 202–208, 2013.
- NIETO, C. G. et al. Detection of Leishmania infantum amastigotes in canine choroid plexus. **Vet Rec**, v. 139, n. 14, p. 346-7, Oct 5 1996.
- ODA, K.; KITANO, H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. **Mol Syst Biol**, v. 2, p. 2006 0015, 2006.
- OKAMURA, Y. et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. **J Biol Chem**, v. 276, n. 13, p. 10229-33, Mar 30 2001.
- OLIVEIRA, V. D. C. et al. 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.
- OSPELT, C.; GAY, S. TLRs and chronic inflammation. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 42, n. 4, p. 495-505, Apr 2010.
- PAPADOGIANNAKIS E.I., KOUTINAS A.F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to Leishmania infantum. **Vet Imm. Immun.**, v. 163, n. 3, p. 94-102, 2015.
- PAUN, A. et al. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 1, p. e1001246, Jan 6 2011.
- PHILPOTT, D. J. et al. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 1, p. 9-23, Jan 2014.
- PINELLI, E. et al. Infection of a canine macrophage cell line with leishmania infantum: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet Parasitol**, v. 92, n. 3, p. 181-9, Oct 1 2000.
- PORTILLO, J. C. et al. CD40 and tumour necrosis factor- α co-operate to up-regulate inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Immunol.**, v. 135, n. 2, p. 140-150, 2012.

- PRADO, P. F. et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, State of Minas Gerais, Brazil, between 2007 and 2009. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 5, p. 561-6, Oct 2011.
- PROBST, P. et al. A Leishmania protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 10, p. 2634-42, Oct 1997.
- PROVERBIO, D. et al. Seizures as a Consequence of Hyperviscosity Syndrome in Two Dogs Naturally Infected with Leishmania infantum. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 52, n. 2, p. 119-23, Mar-Apr 2016.
- QUAN, N. et al. Chronic overexpression of proinflammatory cytokines and histopathology in the brains of rats infected with Trypanosoma brucei. **J Comp Neurol**, v. 414, n. 1, p. 114-30, Nov 8 1999.
- REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, Mar 15 2009.
- RICHARDSON, R. J. et al. Irf6 is a key determinant of the keratinocyte proliferation-differentiation switch. **Nat Genet**, v. 38, n. 11, p. 1329-34, Nov 2006.
- RODRIGUEZ-CORTES, A. et al. Leishmania-specific isotype levels and their relationship with specific cell-mediated immunity parameters in canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 116, n. 3-4, p. 190-8, Apr 15 2007.
- SAKAMOTO, K. P.; DE MELO, G. D.; MACHADO, G. F. T and B lymphocytes in the brains of dogs with concomitant seropositivity to three pathogenic protozoans: Leishmania chagasi, Toxoplasma gondii and Neospora caninum. **BMC Res Notes**, v. 6, p. 226, Jun 8 2013.
- SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. **Immunol Rev**, v. 177, p. 134-40, Oct 2000.

- SANCHEZ, M. A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 6, p. 618-24, Jun 2004.
- SANKOWSKI, R.; MADER, S.; VALDES-FERRER, S. I. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 28, 2015.
- SANTOS-GOMES, G. M. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 88, n. 1-2, p. 21-30, Sep 6 2002.
- SAUNDERS, N. R. et al. Barriers in the brain: a renaissance? **Trends Neurosci**, v. 31, n. 6, p. 279-86, Jun 2008.
- SCHLEICHER, U. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **Journ. of Experim. Med.**, v. 204, n. 4, p. 893-906, 2007.
- SCHLUTER, D. et al. *Toxoplasma gondii* infection of neurons induces neuronal cytokine and chemokine production, but gamma interferon- and tumor necrosis factor-stimulated neurons fail to inhibit the invasion and growth of *T. gondii*. **Infect Immun**, v. 69, n. 12, p. 7889-93, Dec 2001.
- SCHONBECK, U.; LIBBY, P. CD40 signaling and plaque instability. **Circ Res**, v. 89, n. 12, p. 1092-103, Dec 7 2001.
- SHUGART, J. A. et al. A self-help program for memory CD8+ T cells: positive feedback via CD40-CD40L signaling as a critical determinant of secondary expansion. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64878, 2013.
- SILVEIRA, F.T.; CORBETT, C.E.P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: indigenous or introduced? A brief review. **Rev. Pan-Amaz. de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 143-147, 2010.
- SNYDMAN, D.R.; WALKER, M.; KUBLIN, J.G.; ZUNT, J.R. Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts: malaria, microsporidiosis, leishmaniasis, and african trypanosomiasis. **Clin. Infect. Dis.**, v.42, n.1, p.115-125, 2006.

- SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, Oct 28 2009.
- SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. **Vet Parasitol**, v. 90, n. 1-2, p. 37-45, Jun 10 2000.
- SOLER, D. et al. CCR8 expression identifies CD4 memory T cells enriched for FOXP3+ regulatory and Th2 effector lymphocytes. **J Immunol**, v. 177, n. 10, p. 6940-51, Nov 15 2006.
- SRIVASTAV, S. et al. IRAK-M regulates the inhibition of TLR-mediated macrophage immune response during late in vitro Leishmania donovani infection. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 10, p. 2787-97, Oct 2015.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 138-47, Feb-Mar 2007.
- STOCKINGER, B.; VELDHOEN, M.; MARTIN, B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. **Semin Immunol**, v. 19, n. 6, p. 353-61, Dec 2007.
- STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet Res**, v. 38, n. 4, p. 547-64, Jul-Aug 2007.
- TAMURA, T. et al. The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. **Annu Rev Immunol**, v. 26, p. 535-84, 2008.
- TARASSISHIN, L.; SUH, H. S.; LEE, S. C. Interferon regulatory factor 3 plays an anti-inflammatory role in microglia by activating the PI3K/Akt pathway. **J Neuroinflammation**, v. 8, p. 187, Dec 30 2011.
- TAUB, D. D. et al. Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. **Science**, v. 260, n. 5106, p. 355-8, Apr 16 1993.
- TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitol Res**, v. 109, n. 4, p. 1051-7, Oct 2011.

- TRAVI, B. L. et al. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 81, n. 6, p. 994-1003, Dec 2009.
- TRINCHIERI, G. Type I interferon: friend or foe? **J Exp Med**, v. 207, n. 10, p. 2053-63, Sep 27 2010.
- TURCHETTI, A. P. et al. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 163, n. 1-2, p. 67-76, Jan 15 2015.
- VAN LANGELAAR, J. et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. **Brain**, v. 141, n. 5, p. 1334-1349, May 1 2018.
- VENTURIN G.L., CHIKU V.M., SILVA K.L., DE ALMEIDA B.F., DE LIMA V.M. M1 polarization and the effect of PGE2 on TNF- α production by lymph node cells from dogs with visceral leishmaniasis. **Paras. Immunol.**, v. 38, n. 11, p. 698-704, 2016
- VINUELAS, J. et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 101, n. 1, p. 23-7, Oct 31 2001.
- WALKER, D. G.; LUE, L. F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. **Alzheimers Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 56, Aug 19 2015.
- WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb Pathog**, v. 38, n. 4, p. 147-60, Apr 2005.
- WINKLER, M. A.; PAN, A. A. Is there a link between the human TRIM21 and *Trypanosoma cruzi* Clone 36 genes in Chagas' disease?. **Molec. Immun.**, v. 48, n. 1-3, p. 365-367, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of neglected tropical diseases. **Stat. of endem. of visc. Leishm., worldwide, 2015**. World Health Organization, 2015. Disponível em:

<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf> Acesso em 28 de junho de 2018.

YOSHIE, O. [Lymphocyte subsets and chemokine receptors]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v. 47, n. 16 Suppl, p. 2206-13, Dec 2002.

YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Rev Mol Med**, v. 15, p. e7, Aug 5 2013.

ZEINSTRA, E.; WILCZAK, N.; DE KEYSER, J. Reactive astrocytes in chronic active lesions of multiple sclerosis express co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. **J Neuroimmunol**, v. 135, n. 1-2, p. 166-71, Feb 2003.

ZHANG, L. et al. Eimeria tenella: interleukin 17 contributes to host immunopathology in the gut during experimental infection. **Exp Parasitol**, v. 133, n. 2, p. 121-30, Feb 2013.

ZOBBA, R. et al. A case of canine neurological leishmaniasis. **Vet Ital**, v. 53, n. 4, p. 321-326, Dec 29 2017.

2. CAPÍTULO – GENES DA RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM CÉREBROS DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

2.1. Genes da resposta imune inata e adaptativa diferencialmente expressos em cérebros de cães com Leishmaniose Visceral

2.1.1. RESUMO – A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, invariavelmente progressiva, de alta variabilidade clínica, incluindo desordens neurológicas. Para investigar as alterações neurológicas desencadeadas pela LVC, a expressão de genes envolvidos na resposta imune inata e adaptativa em cérebros de cães naturalmente infectados para *Leishmania infantum* foi realizada. Cães machos/fêmeas, 1 a 5 anos de idade, sem raça definida, com prévia avaliação clínica e laboratorial, avaliação histopatológica cerebral, e ausência das principais co-infecções foram organizados em dois grupos, grupo (Infectados) com 11 cães e grupo (Controle) com 04 cães. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR *Profiler* com kit comercial *RT² Profiler™ PCR Array Dog Innate & Adaptive Immune Responses* (Qiagen®). O p-valor estipulado foi em $\leq 0,05$ por Teste-t de Student. Infiltrados inflamatórios, de variação discreta a moderada, foram verificados nos cães infectados. Houve o aumento da expressão de 24 genes de diferentes subclasses comparados ao grupo controle (IRF6, CD4, CD40LG, TLR6, CCR4, TLR5, CCR8, CCL3, IFNG, IFNB1, TNF, IL13, IRF3, CD14, CD209, CD80, TLR4, CD86, CCR6, TRAF6, TLR7, RORC, NOD1, STAT3). Esta informação indica a participação da resposta imune inata e adaptativa no cérebro de cães com LVC, e a alta expressão destes pode ser considerada fator chave para o início, manutenção e persistência da inflamação.

Palavras-chave: *Leishmania*, imunologia, neuropatogenia

Genes of the innate and adaptive immune response differentially expressed in dog brains with Visceral Leishmaniasis

2.1.2. ABSTRACT – Visceral canine leishmaniasis (LVC) is a chronic, invariably progressive disease of high clinical variability including neurological disorders. To investigate the neurological changes triggered by LVC, the expression of genes involved in the innate and adaptive immune response in brains of naturally infected dogs to *Leishmania infantum* was performed. Male and female dogs, 1 to 5 years of age, with no previous breed, previous clinical and laboratory evaluation, histopathological evaluation, and absence of major co-infections were organized into two groups (Infected) with 11 dogs and group Control) with 04 dogs. The evaluation of gene expression was performed by PCR Profiler with commercial Kit RT² Profiler™ PCR Array Dog Innate & Adaptive Immune Responses (Qiagen®). The p-value stipulated was ≤ 0.05 per Student's t-Test. Inflammatory infiltrates, mild to moderate, were found in infected dogs. There was an increase in expression of 24 genes of different subclasses compared to the control group (IRF6, CD4, CD40LG, TLR6, CCR4, TLR5, CCR8, CCL3, IFNG, IFNB1, TNF, IL13, IRF3, CD14, CD209, CD80, TLR4, CD86, CCR6, TRAF6, TLR7, RORC, NOD1, STAT3). This information indicates the involvement of the innate and adaptive immune response in the brain of dogs with LVC, and the high expression of these can be considered a key factor for the onset, maintenance and persistence of inflammation.

Keywords: Leishmania, immunology, neuropathogenesis

2.1.3. Introdução

Leishmanioses correspondem a um complexo de doenças incluído, pela Organização Mundial de Saúde, entre as seis mais importantes endemias do mundo, e é uma das doenças tropicais mais relevantes e negligenciadas, com cerca de dois milhões de novos casos ao ano (WHO, 2015). Dentre as diferentes apresentações, as principais formas são a leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral (LV).

A LV é uma antroponose responsável por cerca de 500.000 novos casos ao ano, e, nas Américas, é causada pelo parasita *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) (LUKEŠ et al., 2007; BANETH et al., 2008). O cão doméstico é o principal reservatório da doença em áreas urbanas, e pode apresentar considerável diversidade de apresentação clínica, desde cães assintomáticos a manifestações clínicas sistêmicas graves (BLAVIER et al., 2001; REIS et al., 2009).

A leishmaniose visceral canina (LVC) apresenta um estabelecimento “silencioso” e a resposta imune ao parasita é tida como órgão-específica (REIS et al., 2009; HOSEIN et al., 2017). Apesar dos recentes estudos a este respeito, os mecanismos imunológicos relacionados à resistência, suscetibilidade e estabelecimento da infecção ainda não são precisos e completamente estabelecidos (HOSEIN et al., 2017), entretanto é sabido que a evolução da doença depende diretamente do tipo de resposta imune desenvolvida (STANLEY; ENGWERD, 2007).

A resolução da infecção está intrinsecamente relacionada à imunidade adaptativa desencadeada, mas há fortes evidências de que os mecanismos inatos também desempenham um papel importante nas defesas anti-leishmania (FARIA et al., 2012). Respostas do tipo Th1, Th2 e a associação entre estas respostas foram observadas em diferentes órgãos e correlacionadas às apresentações clínicas e os níveis de carga parasitária (STRAUSS-AYALI et al., 2007; TRAVI et al., 2009; BOGGIATTO et al., 2010).

O envolvimento da resposta imune inata, apesar de não ser compreendido completamente, é seguramente aceito que ocorra em cães suscetíveis à LVC (HOSEIN et al., 2017). Para padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), o sistema imune inato utiliza um número limitado de receptores de reconhecimento padrão (PRRs). Há diferentes tipos de PRRs com diferentes atividades de reconhecimento durante a invasão de patógenos, como os receptores *toll-like* (TLRs) e os receptores *nod-like* (NLRs) (FUKATA et al., 2009). A membrana da *Leishmania* possui moléculas que são reconhecidas por estas células imunes, como lipofosfolícanos (LPG), glicoinositolfosfolídeos (GIPLs) e a glicoproteína 63 (gp63) (DOS SANTOS et al., 2017).

São escassos os trabalhos que comprovam a infecção direta do SNC por *L. infantum* (CARDINOT et al., 2016). Recentemente, foi descrita a detecção de DNA de *Leishmania* em líquido cefalorraquidiano de um cão com sinais neurológicos decorrentes da LVC (MARQUEZ et al., 2013); e detecção de DNA de *Leishmania* em diferentes áreas do cérebro de cães naturalmente infectados porém sem sinais neurológicos (GRANO et al., 2014).

O sistema nervoso central (SNC), apesar de possuir um complexo sistema de barreiras de proteção, pode ser vulnerável aos danos causados por uma resposta inflamatória sistêmica na LVC, e os mecanismos envolvidos nestas alterações neurológicas podem estar relacionados tanto com a imunidade celular quanto com a imunidade humoral (MELO et al., 2009; MELO & MACHADO, 2011; MELO et al., 2012).

Sabe-se que produtos da inflamação, como citocinas e quimiocinas, podem interferir na permeabilidade das barreiras do SNC (BALLABH et al., 2004), na relação neurônio-glia, e afetar consideravelmente a homeostasia local, permitindo a invasão de células do sistema imune, a expressão de moléculas de adesão, a ativação do sistema complemento, e desencadear neurodegeneração (SANKOWSKI et al., 2015). As interações parasita-hospedeiro e as implicações imunológicas ocasionadas durante a resposta

imune inata frente à infecção por *L. infantum* determinam o destino da resposta imune adaptativa (FALCÃO et al., 2016).

A liberação de mediadores pró-inflamatórios interfere na resposta inata e adaptativa do SNC, e estas são desencadeadas majoritariamente pela micróglia. Para a primeira linha de defesa contra patógenos no SNC, células da glia, particularmente micróglia e astrócitos, demonstram fortes evidências do seu papel fundamental. A micróglia, macrófagos profissionais residentes no SNC, é considerada uma das principais células efetoras na resposta imune inata neurológica (KONAT et al., 2006).

Apesar da importância e da gravidade dos quadros neurológicos relacionados à LVC, os mesmos são subestimados, pouco documentados e muitas vezes desconhecidos (MAIA et al., 2015). Frente a este desafio, o presente estudo visa avaliar a expressão de genes envolvidos na resposta imunológica e inflamatória no cérebro de cães com LVC.

2.1.4. Métodos

2.1.4.1. Animais

Os cães utilizados no presente estudo foram provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba/SP. Foram selecionados cães em idade adulta (01 a 05 anos de idade), sem raça definida e em proporção aleatória de macho/fêmea (MORENO; ALVAR, 2002) (Tabela Adicional 01). Os cães foram submetidos à eutanásia em acordo com a lei estadual vigente (SÃO PAULO, 2006).

Foi realizada colheita de material de 50 cães. Todos os cães foram inicialmente submetidos a minucioso exame clínico, para avaliação dos sinais clínicos apresentados e sua compatibilidade com LVC. Nenhum dos cães utilizados no experimento apresentou sinais neurológicos. Os cães do grupo infectados possuíam pelo menos três sinais clínicos compatíveis com LVC. Foram realizados exames complementares de hemograma e exame bioquímico

sérico de perfil hepático e renal (Tabelas Adicionais 02, 03 e 04). Com estes resultados, foi possível a elaboração do estadiamento clínico de acordo com Solano-Gallego et al., (2009) (Tabela adicional 12).

Para o diagnóstico definitivo de LVC, os cães selecionados foram submetidos a teste sorológico ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para a detecção de anticorpos anti-leishmania, e foram consideradas amostras positivas com densidade óptica acima de 0,270 (LIMA et al., 2003); investigação parasitológica por exame citológico de linfonodo, baço e medula óssea (FERRER et al., 1999), sendo que os cães com exame parasitológico positivo em pelo menos um dos tecidos avaliados; além da investigação da presença de DNA do parasito em amostras de baço por qPCR (*Real Time Quantitative PCR*) (COLOMBO, 2015).

A ausência de co-infecção por outros agentes etiológicos, necessária para a investigação da inflamação no cérebro de cães com LVC, foi determinada com testes sorológicos de ELISA para *E. canis* e *Babesia spp.* (FURUTA et al., 2009; STILLMAN et al., 2014), e RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum* (ZANETTE et al., 2014), acrescido de teste de PCR para a confirmação da negatividade do teste anterior. Além disso, para a detecção do vírus da cinomose canina, foi realizada a avaliação histopatológica de cortes do cérebro para a exclusão de lesões características e a investigação de PCR para a pesquisa do agente viral (ELIA et al., 2006).

Os cães selecionados foram divididos em dois grupos, sendo grupo de cães infectados constituído por 11 cães com diagnóstico de LVC; e grupo controle composto por 04 cães com diagnóstico negativo para LVC, seguindo os mesmos critérios. A causa da morte dos cães do segundo grupo não esteve relacionada a qualquer enfermidade que levasse ao comprometimento do SNC dos mesmos.

2.1.4.2. Colheita de Material

Foram colhidas, de maneira asséptica, amostras de sangue de veia jugular, 1 mL armazenado em tubo EDTA a vácuo, para realização imediata de hemograma; e 10 mL em tubo sem anticoagulante para a realização do perfil bioquímico e teste ELISA. Após 20 minutos, foi realizada centrifugação (800xg por 10 minutos) dos tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro, que foi aliquoteado e armazenado a -20°C.

A avaliação bioquímica foi padronizada com kits comerciais Fosfatase Alcalina LiquiformVet® (1011-4/30); Creatinina KVet® (1010-300); Ureia UV LiquiformVet® (1013-4/50); ALT/GPT LiquiformVet® (1008-4/30); Albumina Vet® (1007-1/250); Proteínas Totais® (99-250) (Labtest Diagnóstica®) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os cães, de ambos os grupos, foram submetidos à eutanásia de acordo com a Resolução Nº 1.000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que dispõe detalhadamente sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Os cães foram submetidos à superdosagem de tiopental, por via intravenosa, associada à administração de cloreto de potássio 19% em dose letal. A necropsia para exame macroscópico e colheita de amostras de tecidos foi efetuada imediatamente após a eutanásia.

O exame histopatológico foi realizado de acordo com Grano et al. (2018). Foi colhido um hemisfério cerebral, aleatoriamente. Este foi fixado em formalina 10% (pH 7,4), onde foi mantido por 12-24 horas. Das amostras de áreas pré-determinadas, córtex temporal e piriforme, tálamo, hipocampo, bulbo, cerebelo, e plexo coroide ventricular, foram colhidos fragmentos e incluídos em parafina, conforme protocolo padrão. Foram obtidos cortes de 5µm, corados com hematoxilina-eosina (HE) para posterior avaliação e caracterização das lesões.

Do hemisfério contralateral, não fixado, foram realizados cortes coronais e colhidos fragmentos com um *punch* de 0,5 cm³ para compor um *pool* das

regiões de tálamo, hipocampo, córtex temporal e substância branca periventricular. As amostras de cérebros para obtenção de RNA foram colhidas tomando o necessário cuidado de desinfecção dos materiais, utilizando solução de peróxido de hidrogênio 3% e solução de descontaminação RNase (RNaseZap®, ThermoFisher Scientific, AM9780).

O material obtido foi armazenado em solução preservadora de RNA (RNAlater®, Applied Biosystems, AM7020), e mantido por 24 horas à temperatura de 4°C e posteriormente estocado a -80°C até o processamento das amostras. Para a detecção do DNA de *Leishmania* em amostras de baço, foram extraídos fragmentos de 0,5 cm³, armazenados à temperatura de -80°C até o momento da análise.

2.1.4.3. Extração de RNA de amostras do cérebro

Para a extração de RNA de amostras do *pool* de fragmentos cérebros, foi utilizado 20 mg de tecido e o RNA foi extraído com kit RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit N°. 74804 (Qiagen®), protocolo utilizando QIAzol® Lysis Reagent (Qiagen®), de acordo com as recomendações descritas pelo fabricante. Foi utilizado espectrofotômetro (NanoDrop®) e o critério de seleção das amostras foi valor de absorbância 260/280 entre 2,0 a 2,3 (Tabela Adicional 06). O armazenamento das amostras foi feito em -80°C até as próximas análises.

2.1.4.4. Avaliação da integridade de RNA

A avaliação da integridade de RNA das amostras e exclusão do risco de degradação das mesmas foi realizada por eletroforese capilar em Agilent® Bioanalyzer em RNA 600 Nano Labchip® (Agilent Technologies®) com RNA 6000 Nano Marker Green, seguindo as instruções descritas pelo fabricante. Foi realizada a verificação da existência de bandas/picos em RNAs ribossômicos 18S e 28S. Além disso, para a confiabilidade da amostra, exigiu-se um número de integridade de RNA (RIN – *RNA Integrity Number*) de sete ou superior, o

que garante comparações confiáveis de dados de qualidade (Tabela Adicional 07).

2.1.4.5. Síntese de cDNA

A obtenção do cDNA das amostras de cérebro foi realizada utilizando kit comercial RT² First Strand Kit (50)[®] N^o 330404 (Qiagen[®]). Além da síntese de cDNA, o kit possui capacidade de eliminação de DNA genômico e controle de RNA externo que possa ter sido incorporado, monitorando, assim, a eficiência da transcrição reversa. Foram utilizados 500ng de RNA total para, a preparação de mix de eliminação de DNA genômico com tampão GE, seguida da preparação do mix de transcrição reversa. A solução final foi submetida à incubação a 37°C por 60 minutos, com sequente incubação a 95°C por 5 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

2.1.4.6. PCR *Profiler* de amostras de cérebro de cães com LVC

Para a análise da expressão gênica, as reações de RT-PCR foram realizadas em placas do kit comercial RT² Profiler[™] PCR Array Dog Innate & Adaptive Immune Responses (PAFD-052Z) (Qiagen[®]), que contém genes relacionados à imunidade inata e adaptativa. Acrescido a isto, há também, em cada uma das placas, um painel de gene *housekeeping*, que normalizam os dados do ensaio; um controle para a contaminação por DNA genômico; replicatas de controle da transcrição reversa; e replicatas de controle positivo de PCR (Tabela Adicional 08).

Para a realização do ensaio, foram utilizados cDNA sintetizados previamente e RT² SYBR Green[®] qPCR Mastermix N^o330501 (Qiagen[®]). A reação de qPCR foi realizada em equipamento Stratagene[®] modelo Mx3005P[®] (Agilent Technologies[®]) com ciclos descritos na Tabela 02.

Tabela 02 - Condição dos ciclos realizados para PCR Profiler em amostras de SNC

Ciclos	Duração	Temperatura
1	10 min	95°C
40	15 s	95°C
	1min	60°C

Foram examinados os valores de C_T do controle do DNA genômico; e os valores de C_T do controle de transcrição reversa, usando os valores para o controle de PCR positivo, na seguinte fórmula $\Delta CT = \text{AVG } C_T^{\text{RTC}} - \text{AVG } C_T^{\text{PPC}}$. Foram avaliados também os valores de controle PCR positivos, e o valor médio de C_T^{PPC} estipulado em 20 ± 2 em cada ensaio, e sem variação de mais de 2 ciclos entre as placas comparadas.

Foi calculado o ΔC_T para cada gene focado na via em cada placa, usando os valores de C_T para o gene de interesse (GOI) e os genes *housekeeping* usados para a normalização (HKG). Para isto, foi utilizada a seguinte fórmula: $\Delta C_T = C_T^{\text{GOI}} - C_T^{\text{AVG HKG}}$. Como se trata de uma análise biológica, foi calculado o ΔC_T médio de cada gene em todas as placas para os grupos (positivo/controle). Por fim, foi calculado o $\Delta \Delta C_T$ para cada gene nos dois diferentes grupos (grupo de cães infectados/grupo controle); e foi calculado o *fold-change* para cada gene do grupo de cães infectados para o grupo controle como $2^{(-\Delta \Delta CT)}$.

2.1.4.7. Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Para que houvesse o entendimento de como estes genes, diferencialmente expressos, se associaram uns aos outros e para facilitar a compreensão das vias de sinalização dos mesmos, os dados, previamente analisados, foram inseridos ao *software Ingenuity Pathway Analysis (IPA)*. A análise causal do IPA é feita com base em um vasto repositório de achados biológicos e químicos de fontes de literatura (*Ingenuity Knowledge Base®*).

Ingenuity Knowledge Base® contém aproximadamente 5 milhões de arquivos individuais. O IPA forneceu informações com relação à localização dos genes, função, mecanismos biológicos e interações pertinentes.

2.1.4.8. Análise Estatística

A comparação da expressão gênica entre os dois grupos foi avaliada pelo Teste-t de Student em valores de replicata $2-\Delta C_T$ para cada gene no grupo de cães infectados comparado ao grupo controle. Foram considerados valores estatisticamente significativos quando o p-valor < 0,05. Para a identificação das vias canônicas relacionadas aos genes expressos no trabalho, foi utilizado o teste de correção para múltiplos de Benjamini-Hochberg. Foram selecionadas vias canônicas estatisticamente significativas quando o p-valor < 0,001.

2.1.5. Resultados

2.1.5.1. Diagnóstico de LVC

Todos os animais infectados tiveram a confirmação da positividade para LVC por meio dos testes de ELISA, PCR (Tabela adicional 01), e exame parasitológico (Tabela adicional 05); e os cães do grupo controle a negatividade dos mesmos testes. Além disso, os cães do grupo de cães infectados apresentam pelo menos três sinais clínicos compatíveis com LVC no exame clínico inicial. Os sinais clínicos mais frequentes foram esplenomegalia em 81,8% (09/11) dos cães; seborreia seca em 63,6% (07/11); e lesões ulcerativas/crostosas em ponta de orelha, lesões ulcerativas em pele, onicogribose e hepatomegalia em 54,5% (06/11) dos cães infectados (Tabela adicional 09). Não houve a presença de sinais neurológicos em nenhum dos cães de ambos os grupos. Todos os animais incluídos no grupo experimental (grupo de cães infectados e grupo controle) apresentaram PCR negativo para *E. canis*, *Babesia spp.*, *T. gondii* e *N. caninum*. Os animais infectados foram

submetidos ao estadiamento clínico segundo Solano-Gallego et al. (2009), baseado em escore de sinais clínicos (Tabela Adicional 10), valores de exames bioquímicos de creatinina e albumina (níveis de densidade óptica no teste ELISA para *Leishmania spp.*). Desta forma, os cães do grupo de cães infectados foram compostos por 63,6% (07/11) no estágio (1); 18,2% (02/11) no estágio (2); 9,1% (01/11) no estágio (3); e 9,1% (01/11) no estágio (4) (Tabela Adicional 11).

2.1.5.2. Avaliação histopatológica dos cérebros de cães com LVC

A análise histopatológica dos cérebros de cães naturalmente infectados para *L. infantum* revelou alterações inflamatórias discretas. Foi detectada a infiltração de células mononucleares, principalmente em áreas de plexo coroide, regiões perivasculares e em meninge (Figura 02). Foi verificada ausência de células inflamatórias em 63,6% (07/11) dos cães infectados; discreta infiltração de células inflamatórias (grau 01) em 27,3% (03/11); e moderada infiltração de células inflamatórias (grau 02) em 9,1% (01/11). A avaliação histopatológica dos cães do grupo controle verificou ausência de alterações histopatológicas em todos os cães. Não foram detectadas alterações histopatológicas compatíveis com cinomose canina em ambos os grupos avaliados. Não foram encontradas formas amastigotas de *Leishmania* em todos os cortes avaliados corados por H-E. Não houve correlação entre as alterações histopatológicas e os achados de expressão gênica.

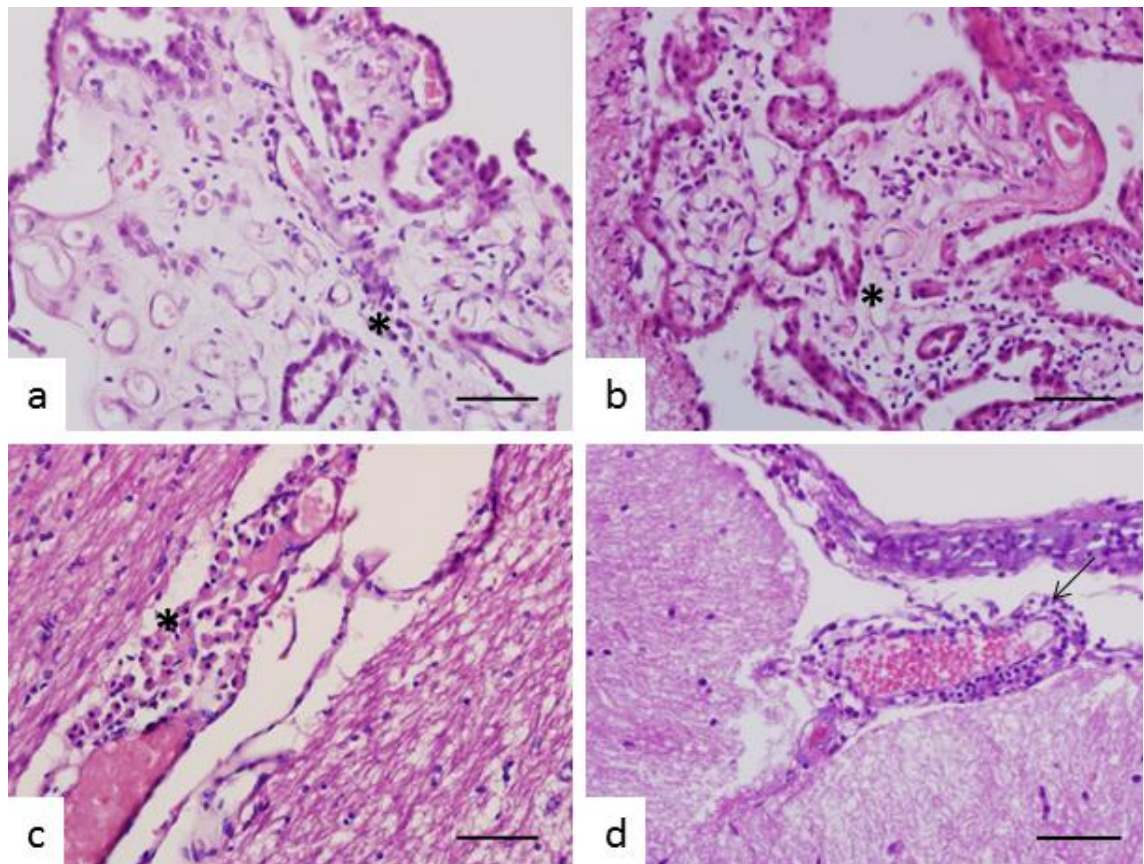


Figura 02 - Fotomicrografia representativa de alterações inflamatórias. (a) discreto (asterisco) infiltrado no plexo coróide do quarto ventrículo (grau 01). (b) Infiltrado moderado (++) de células inflamatórias (asterisco) em plexo coróide (grau 02). (c) Infiltrado moderado de células inflamatórias (asterisco) em vaso da meninge (grau 02). (d) Infiltrado discreto de células inflamatórias (+) (seta) em meninge (grau 01). Hematoxilina e Eosina. Barra de escala = 50µm.

2.1.5.3. Investigação da expressão de genes relacionados às respostas imunes inata e adaptativa

A investigação da ativação da resposta imune inata e adaptativa no cérebro de cães com LVC foi possível por meio da mensuração da expressão de 84 diferentes genes que participam de cadeias relacionadas a estas respostas (Tabela Adicional 12). Dentre estes, foram considerados, como diferencialmente expressos entre os grupos de cães infectados X controle, 24

genes que apresentaram *fold change* $\geq 1,5$ e p-valor $\leq 0,05$ (CCL3; CCR4; CCR6; CCR8; CD14; CD209; CD4; CD40LG; CD80; CD86; IFNB1; IFNG; IL13; IRF3; IRF6; NOD1; RORC; STAT3; TLR4; TLR5; TLR6; TLR7; TNF; TRAF6) (Tabela 03). Estes genes desempenham diferentes funções relacionadas à imunidade inata e adaptativa, sendo que 20,8% (05/24) codificam receptores de reconhecimento padrão (Figura 03A); 25% (06/24) codificam receptores transmembrana (Figura 03B); 20,8% (05/24) fatores de transcrição (Figura 03C); 16,7% (04/24) quimiocina e receptores de quimiocinas (Figura 03D); e 16,7% (04/24) citocinas (Figura 03E).

Tabela 03 - Expressão diferencial de genes de resposta imune inata e adaptativa em cérebros de cães naturalmente infectados para *L. infantum*, com critério de seleção de *fold change* $\geq 1,5$ e p-valor $\leq 0,05$.

Símbolo	p-valor	Fold Change
Gene	Infectados / Controle	Infectados / Controle
IRF6	0,014811	3,0231
CD4	0,007029	2,8551
CD40LG	0,000879	2,731
TLR6	0,009739	2,5075
CCR4	0,009528	2,1049
TLR5	0,022468	2,0913
CCR8	0,007668	2,0694
CCL3	0,044826	2,0457
IFNG	0,009034	2,0192
IFNB1	0,010445	2,0052
TNF	0,019717	1,9939
IL13	0,013593	1,9739
IRF3	0,049078	1,9235
CD14	0,000257	1,8979
CD209	0,020722	1,8221
CD80	0,002101	1,7956
TLR4	0,030618	1,7703
CD86	0,034211	1,7558
CCR6	0,033813	1,7506
TRAF6	0,003124	1,688
TLR7	0,011855	1,6724
RORC	0,032714	1,6058
NOD1	0,004114	1,5815
STAT3	0,025901	1,5123

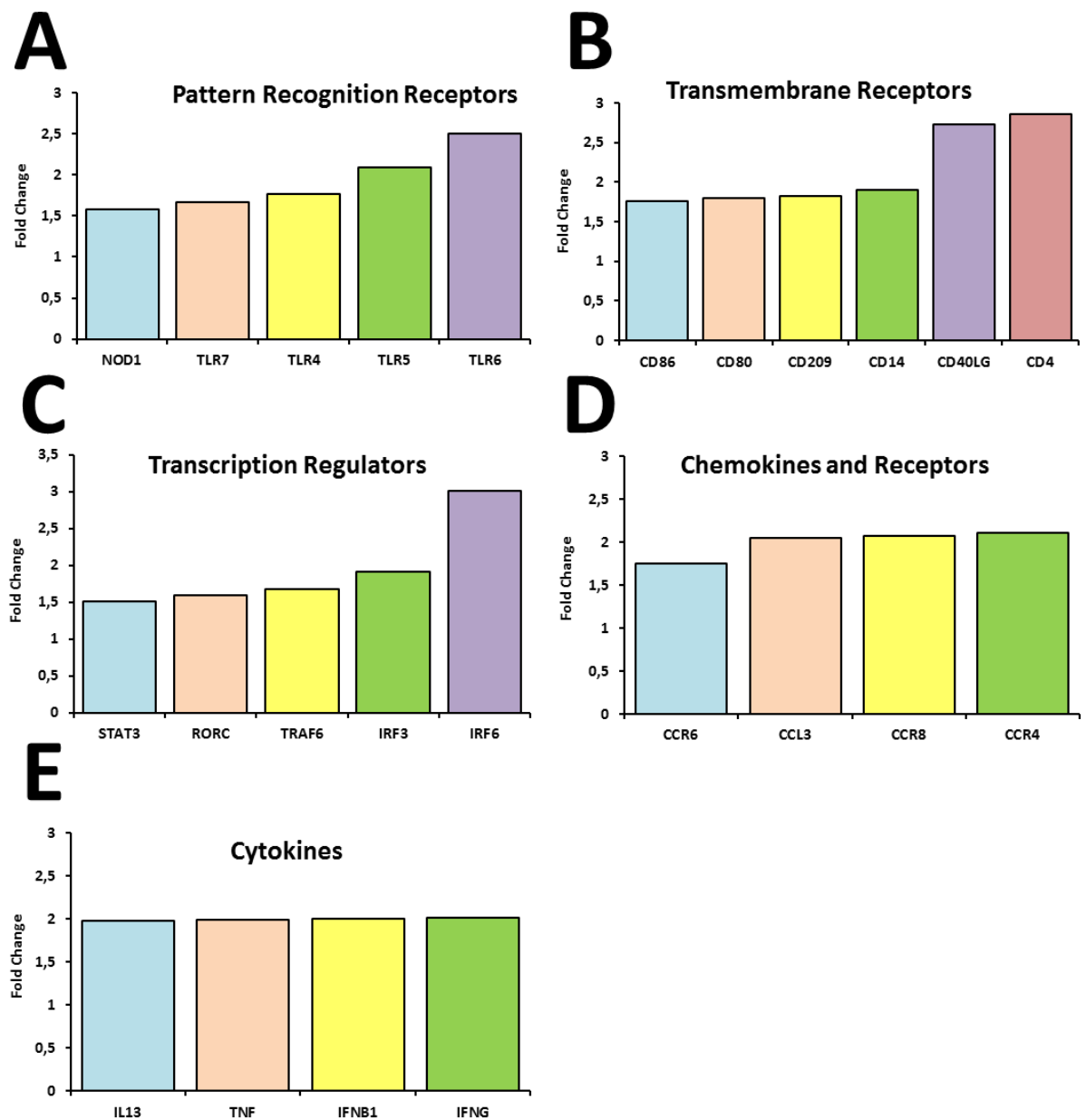


Figura 03 - Expressão diferencial de genes relacionados à resposta imune, agrupados em categoria funcional, em cérebros de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Critério de seleção de *fold change* $\geq 1,5$ e *p*-valor $\leq 0,05$. (A) Receptores de reconhecimento padrão; (B) Receptores transmembrana; (C) fatores de transcrição; (D) quimiocinas e receptores de quimiocinas; (E) citocinas.

2.1.5.4. Vias canônicas relacionadas aos genes de interesse

Com base em banco de dados existente na literatura extraído do *software* IPA, foram identificadas, em cães naturalmente infectados com LVC, 166 vias canônicas relacionadas aos genes em aumento de expressão comparados ao grupo controle (Tabela adicional 16). O critério de seleção das vias canônicas de interesse foi $p\text{-valor} \leq 0,001$, e foram identificadas 46 vias canônicas neste critério (Tabela 04). Baseado no critério de seleção das vias canônicas e sua relevância biológica com o presente estudo, a “Via de sinalização da neuroinflamação” (log $p\text{-valor}$ 1,28), com relevância de 4% (11/131) dos genes em alta expressão estudados (TRAF6, IFN γ , TLR4, CD80, TLR5, TLR6, IFN β 1, TLR7, CD86, IRF3, TNF) foi selecionada para contribuir para o entendimento da participação destes genes no quadro desencadeado pela LVC. Dentre as hipóteses mecanicistas propostas por IPA dentro desta via, foram destacadas categorias funcionais. (1) Reconhecimento de patógeno por TLR em micróglia e sua consequente sinalização de fatores de transcrição, como TRAF6 e IRF3, e consequente produção de proteínas pró-inflamatórias e metaloproteinases (Figura 04). (2) Sinalização de IFN γ em micróglia e consequente síntese de produtos que desencadeiam ao dano neuronal, recrutamento de células Th1, estresse oxidativo, e produção de citocinas pró-inflamatórias (Figura 05). (3) Produção de TNF e IFN γ , por ação de células Th1, e consequente ativação do complexo NF κ B em micróglia, desencadeando a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e suas consequentes ações sobre o parênquima nervoso (Figura 06). (4) Em astrócito, reconhecimento de patógeno por TLR e sinalização do complexo NF κ B, desencadeando síntese de proteínas pró-inflamatórias e suas consequentes implicações em tecido nervoso (Figura 07).

Tabela 04 - Dez principais vias canônicas relacionadas com genes em aumento de expressão de encéfalos de cães naturalmente infectados para *L. infantum* quando comparados ao grupo controle.

	Vias Canônicas	$-\log(p\text{-valor})$	Relevância	Genes
1	Comunicação entre células imunes inata e adaptativa	2,03E01	12/95 (13%)	IFNG,TLR4,CD40LG,CD80,TLR5,CCL3,CD4,TLR6,IFNB1,TLR7,CD86,TNF
2	Papel dos receptores de reconhecimento padrão no reconhecimento de bactérias e vírus	1,64E01	11/137 (8%)	TRAF6,IFNG,TLR4,TLR5,TLR6,IFNB1,TLR7,NOD1,IRF3,IL13TNF
3	Sinalização celular alterada de célula T e B na artrite reumatoide	1,4E01	9/90 (10%)	IFNG,TLR4,CD40LG,CD80,TLR5,TLR6,TLR7,CD86,TNF
4	Via de sinalização da neuroinflamação	1,28E01	11/311 (4%)	TRAF6,IFNG,TLR4,CD80,TLR5,TLR6,IFNB1,TLR7,CD86,IRF3,TNF
5	Diferenciação de célula T Helper	1,28E01	8/73 (11%)	IFNG,CD40LG,CD80,CD86,STAT3,RORC,IL13,TNF
6	Sinalização TREM1	1,28E01	8/75 (11%)	TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,CD86,NOD1,STAT3,TNF
7	Comunicação entre células dendríticas e células <i>natural killer</i>	1,22E01	8/89 (9%)	IFNG,TLR4,CD40LG,CD80,IFNB1,TLR7,CD86,TNF
8	Via de ativação de Th1 e Th2	1,16E01	9/185 (5%)	IFNG,CD40LG,CCR4,CD80,CD4,CCR8,CD86,STAT3,IL13
9	Sinalização de receptor <i>toll-like</i>	1,07E01	7/76 (9%)	TRAF6,TLR4,TLR5,TLR6,TLR7,CD14, TNF
10	Via Th2	8,65E00	7/150 (5%)	IFNG,CCR4,CD80,CD4,CCR8,CD86,IL13

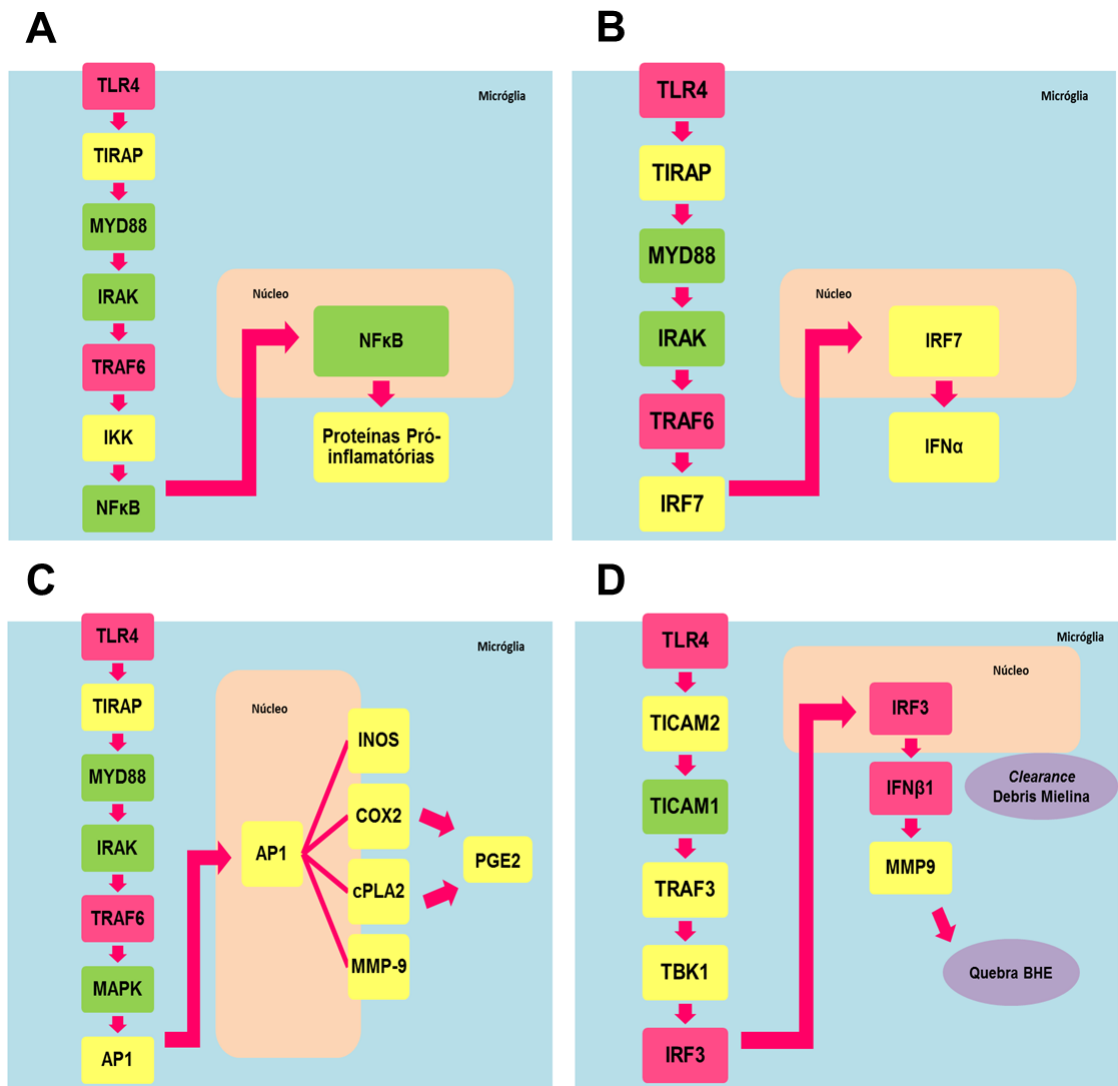


Figura 04 - Possíveis funções biológicas e genes em aumento de expressão (em vermelho) em cérebros de cães com LVC associados ao reconhecimento TLR na micróglia e desencadeamento de vias de sinalização. Em verde, genes avaliados e sem aumento de expressão quando comparados ao grupo controle. Adaptado do IPA. (A) Complexo NFkB promove síntese de proteínas pró-inflamatórias. (B) IRF7 promove a produção de IFN α . (C) Ativador de proteína 1 (AP1) promove a produção de INOS, COX2, cPLA2 e MMP-9 (D) IRF3 promovendo a produção de IFN β 1 e consequente produção de MMP9.

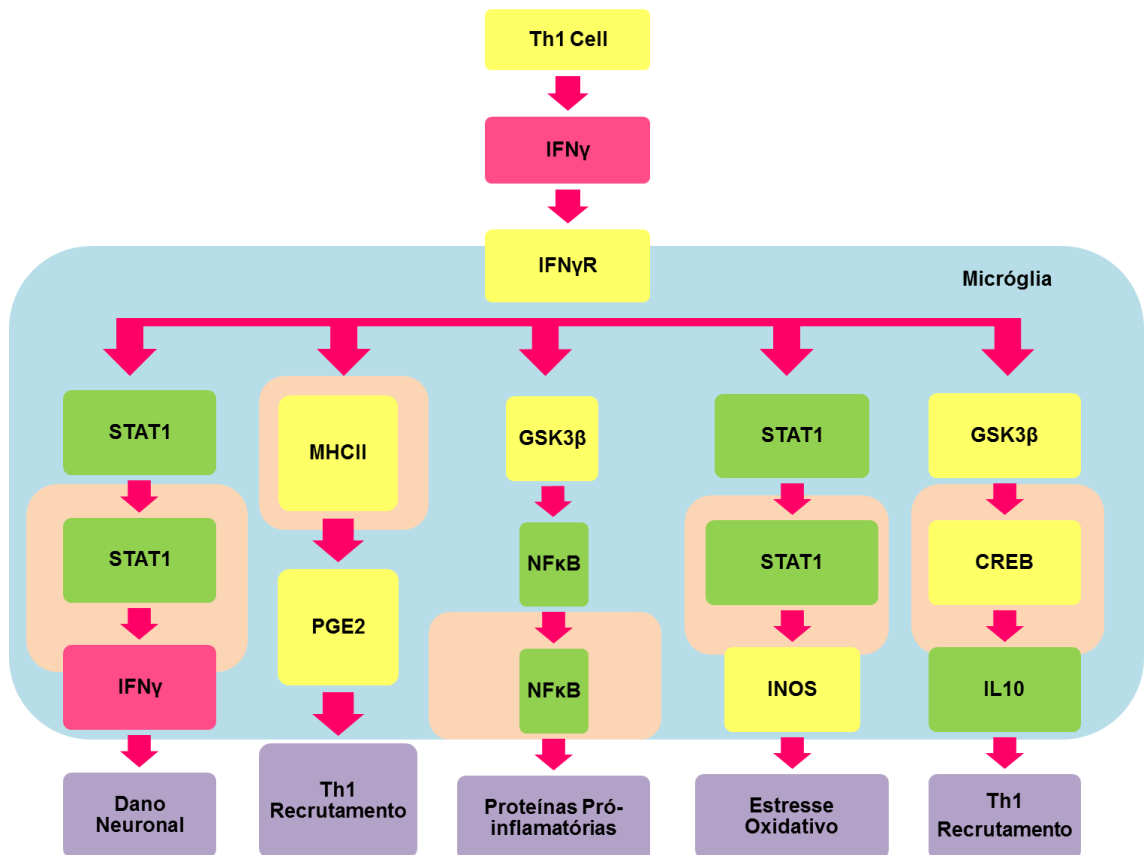


Figura 05 - Possíveis funções biológicas e genes em aumento de expressão (em vermelho) associados à ação de IFN γ em micróglia. Em verde, genes avaliados e sem aumento de expressão quando comparados ao grupo controle. Adaptado do IPA. Células Th1 promovem a produção de IFN γ que, por meio da sinalização do receptor IFN γ R, desencadeia na micróglia a produção de IFN γ , PGE2, NFκB, Inos e a citocina IL10.

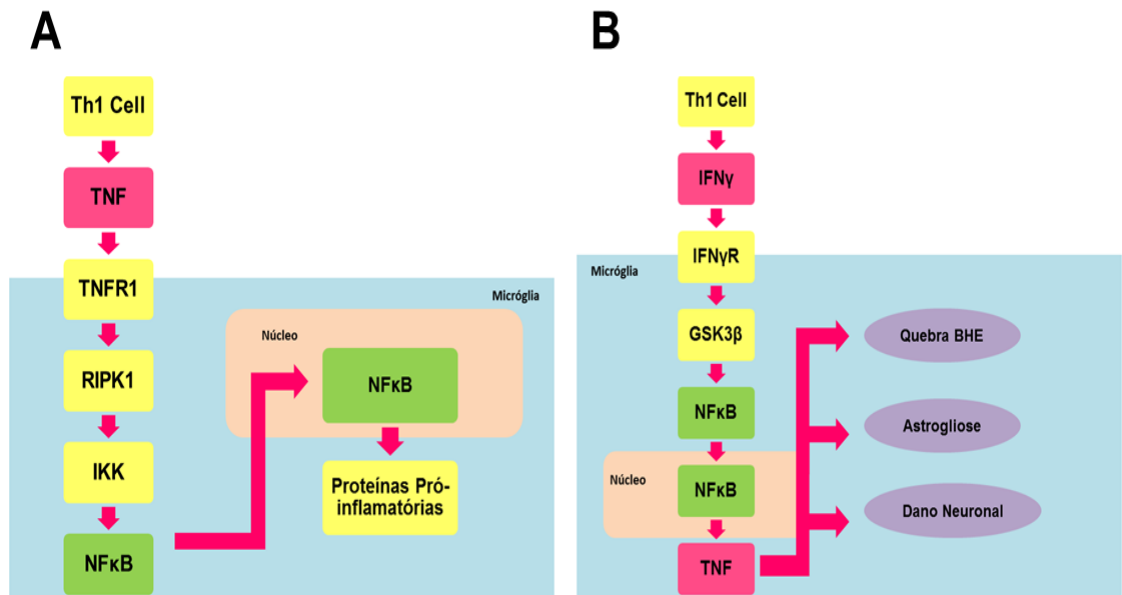


Figura 06 - Possíveis funções biológicas e genes em aumento de expressão (em vermelho) associados à ação de células Th1 e consequente produção de TNF e IFN γ , e suas respectivas ações em micróglia. Em verde, genes avaliados e sem aumento de expressão quando comparados ao grupo controle. Adaptado do IPA. (A) Células Th1 levam a produção de TNF que promove a ação de NFκB (B) Células Th1 levam à produção de IFN γ que promove a ação de NFκB.

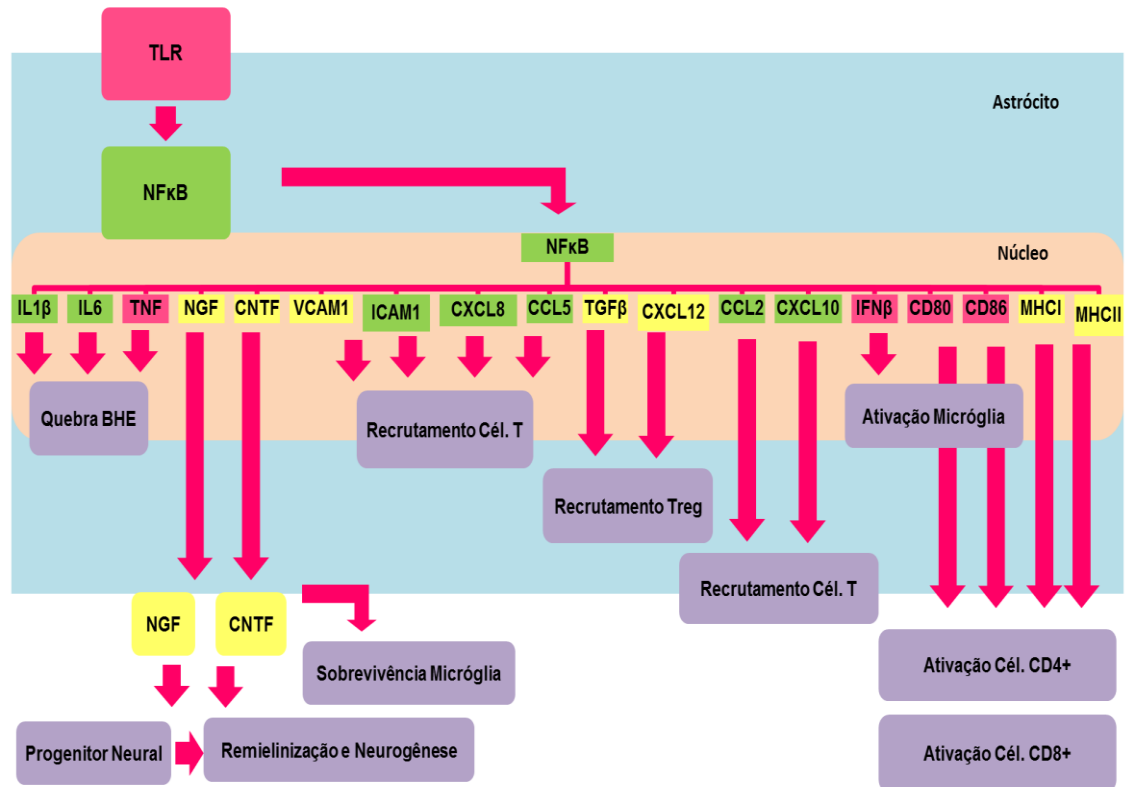


Figura 07 - Possíveis funções biológicas e genes em aumento de expressão (em vermelho) em resposta ao reconhecimento por TLR em astrócito e consequente sinalização do complexo NFκB, desencadeando a produção de proteínas pró-inflamatórias. Em verde, genes avaliados e sem aumento de expressão quando comparados ao grupo controle. Adaptado do IPA.

2.1.6. Discussão

O presente trabalho identificou alterações inflamatórias discretas em cérebros de cães naturalmente infectados para *L. infantum*. Os infiltrados inflamatórios foram identificados em áreas como plexo coroide, regiões perivasculares, e meninges, semelhante a trabalhos anteriores (VIÑUELAS et al., 2001; MELO et al., 2009; SAKAMOTO et al., 2013; GRANO et al., 2016). Mesmo assim foram identificados genes diferencialmente expressos e relacionados com resposta imune inata e adaptativa em cérebros de cães

naturalmente infectados para *L. infantum*, comprovando o envolvimento do sistema nervoso central durante a evolução da doença.

Não foram identificadas formas amastigotas de *Leishmania* nos cortes avaliados deste trabalho, o que pode se justificar pela menor sensibilidade da técnica utilizada e pela fase inicial de evolução da doença, visto que os cães, em sua maioria, se encontravam nos estágios clínicos 1 e 2, segundo a classificação de Solano-Galego et al. (2009).

Um pequeno número de trabalhos detectou o parasita em meninge (VIÑUELAS et al., 2001); em plexo coroide (NIETO et al., 1996; MÁRQUEZ et al., 2013); e parênquima nervoso (MÁRQUEZ et al., 2013). Nestes trabalhos, a maioria dos cães apresentava alterações inflamatórias neurológicas proeminentes e em fase crônica da doença.

O aumento de expressão de CD4 foi verificado nos cérebros dos cães com LVC. Entende-se que as células T CD4+ desempenham papel protetivo em cães com LVC (MIRANDA et al., 2007), e o aumento do número destas células está relacionado com o baixo parasitismo (REIS et al., 2009; ALEXANDRE-PIRES et al., 2010), o que também pode estar relacionado com a não identificação de formas amastigotas de *Leishmania* pelo presente trabalho.

O gene CD40LG, ainda não relatado em cães com LVC, apresentou aumento de expressão nos cérebros de cães com LVC. Este gene é canonicamente expresso em células T CD4+ (CHATZIGEORGIOU et al., 2009), mas também pode ser expressado, transitoriamente, por células T CD8+ (SHUGART et al., 2013). Apesar da escassez na literatura, é sabido que o CD40LG participa da regulação de genes como CD80, CD86 e TNF (SCHÖNBECK; LIBBY, 2001), genes que também apresentaram aumento de expressão no presente trabalho.

Houve o aumento da expressão de quatro membros da família TLRs (TLR4, TLR5, TLR6, TLR7) nos cérebros de cães naturalmente infectados para *L. infantum* (Figura 02). Os TLRs são considerados um dos primeiros sistemas de defesa contra a invasão do patógeno (ODA; KITANO, 2006). De acordo com

a via canônica estudada, estes TLRs participam do reconhecimento do patógeno tanto em micróglia (Figura 04) quanto em astrócito (Figura 07).

Ambos estes tipos celulares foram avaliados por Melo; Machado, 2011, que observaram alterações morfológicas compatíveis com ativação e portanto com capacidade de iniciar e modular o processo inflamatório no cérebro de animais com LVC.

Na LVC, é conhecido o papel do TLR4 no controle da infecção e na tentativa de eliminação do parasita (HOSEIN et al., 2017). O aumento de expressão deste gene foi identificado em amostras de baço e linfonodo (MELO et al., 2014), e cérebro (GRANO et al., 2018).

O CD14 é considerado marcador constitutivo da micróglia (WALKER; LUE, 2015), e no presente trabalho apresentou aumento de expressão nos cérebros de cães com LVC, investigação inédita até o presente momento. O CD14 tem função primordial na transdução de sinal via TLRs, e, em infecções por *Leishmania*, é reconhecido como chave para ocorra o reconhecimento por TLR4 (MUKHERJEE et al., 2016).

As participações do TLR5 e TLR6 na resposta imune frente à LVC ainda são pouco compreendidas (HOSEIN et al., 2017). Turchetti et al. (2015) verificaram elevados níveis de transcrição de TLR5 e TLR6 em macrófagos derivados de monócitos caninos infectados para *L. infantum*. Grano et al. (2018) observaram o aumento da expressão de TLR5 em baço de cães, mas não detectaram diferença na expressão de TLR6 em amostras de baço e cérebro quando comparados ao grupo controle.

O TLR7 difere dos TLRs anteriores por ser encontrado em membranas endossômicas intracelulares (ALEXOPOULOU et al., 2012). Sua participação no reconhecimento da LVC é pouco esclarecida. A alta expressão deste gene foi verificada em amostras de fígado de camundongos infectados para *L. donovani* (PAUN et al., 2011), mas baixos níveis de transcrição em macrófagos derivados de monócitos caninos infectados para *L. infantum* (TURCHETTI et al., 2015).

Houve o aumento da expressão de NOD1 em comparação ao grupo controle. Este PRR participa do início da inflamação, regulação do complexo NF- κ B e de citocinas, como o TNF (CLAY et al., 2014), além de ser um importante mediador da inflamação vascular (PHILPOTT et al., 2014). O seu papel de NOD1 na LVC é pouco esclarecido (CLAY et al., 2014), e, até o presente momento, a investigação de NOD1 em cérebros de cães com LVC não foi documentada.

O presente trabalho verificou o aumento da expressão de CD209, também conhecido como DC-SIGN (*cell-specific- intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin 1*). O estudo deste gene é recente, e não há ainda documentação sobre a relação do CD209 e infecção por *Leishmania*.

O CD209 responde a PAMPs, mediando a adesão, migração, inflamação e ativação de células T, além do desencadeamento de respostas imunes (FENG et al., 2017). Este receptor está presente na superfície de macrófagos e células dendríticas, e sua interação com PAMPs pode ativar a fagocitose por estas células. Na imunidade inata, DC-SIGN pode promover seu início por meio da modulação de TLRs (JIANG; LU, 2017).

Os receptores transmembrana, CD80 e CD86, são moléculas co-estimuladoras e estão diretamente relacionados à resposta imune adaptativa e a ativação de células T. No presente trabalho, ambos estes genes apresentaram aumento da expressão em cérebros de cães com LVC. A proteína codificada pelo gene CD80 participa da indução da proliferação de células T e da produção de diferentes citocinas, como IL-2, IL-4 e IFN γ . O gene CD86 é regulado por CD40LG, TNF, IFN γ (DOTY; CLARCK, 1998), e os genes para estas proteínas também apresentaram maior expressão em relação ao grupo controle.

No cérebro, as expressões de CD80 e CD86 são fortemente reguladas pela inflamação, e estes receptores estão associados principalmente à microglia (BECHMANN et al., 2001; MAGNUS et al., 2005), mas podem ser encontrados também em astrócitos, neurônios e células-tronco neurais (IMITOLA et al., 2004; LIU et al., 2006; ZEINSTRA et al., 2003).

Estudos prévios com *Leishmania major* e *Leishmania donovani*, em células dendríticas humanas, demonstram a capacidade do parasita em regular positivamente CD80 e CD86 (GHOSH et al., 2006; McDOWELL et al., 2002). Probst et al. (1997) observaram que uma proteína exossômica, o fator de iniciação eucariótica de *Leishmania* (LeIF), teve a capacidade, em células dendríticas humanas, de regular positivamente a expressão de CD80.

Na via canônica estudada (Figura 07), observa-se que, no astrócito, por meio do reconhecimento de TLR, há a sinalização do complexo NFκB que é responsável por promover a síntese de proteínas pró-inflamatórias e suas distintas ações; além de promover a regulação de CD80 e CD86, responsáveis pela ativação de células CD4+.

A investigação sobre o fator de transcrição IRF6 é recente, e sua relação com a infecção por *Leishmania* ainda não foi documentada. Sua relevância biológica é estudada em doenças neurológicas (LIN et al., 2016; HUANG et al., 2017; HOU et al., 2017).

Resultados obtidos por Joly et al. (2016) sugerem que IRF6 controla vários TLRs de uma maneira célula-específica interferindo na resposta inata, e foi detectado em macrófagos, neutrófilos e células dendríticas de camundongos estimulados com LPS.

Assim como o IRF6, a literatura sobre IRF3 ainda é escassa e sua relação com infecção por *L. infantum* ainda não foi documentada. Na via canônica estudada (Figura 03D), é proposto que, por meio do reconhecimento por TLR4 na micróglia, haja a sinalização do complexo TICAM e fator de transcrição TRAF3, levando a ativação do IRF3. Com esta ativação, há a produção de IFNβ1 e consequente MMP-9. Sabe-se que a MMP-9 desempenha papel essencial na degradação de membrana basal e aumento da permeabilidade da BHE em cérebros de cães com LVC (MELO et al., 2012). O IRF3 é mais conhecido por seu papel crítico como fator de transcrição promovendo a expressão IFN Tipo I, gene que também foi observado com expressão aumentada em cães com LVC.

O IFN β 1 teve aumento de expressão no cérebro dos cães com LVC. A investigação do gene desta citocina em LVC ainda não foi documentada. De acordo com a via canônica estudada (Figura 07), o reconhecimento por TLR em astrócitos leva a ativação do complexo NF κ B que induz a síntese de diferentes proteínas pró-inflamatórias, como o IFN β 1. A este gene é atribuída a ativação da micróglia na sinalização da neuroinflamação. Em investigação em células dendríticas plasmocitoides de camundongos expostas à *L. infantum in vitro*, foi observada uma forte produção de IFN β 1 relacionada a expressão de TLR9 (SCHLEICHER et al., 2009).

O fator de transcrição TRAF6 apresentou alta expressão nos cérebros de cães com LVC. Na infecção por *L. donovani*, sabe-se que o início da resposta imune inata se dá pelo reconhecimento de PAMPs por receptores TLRs, que ativados, se ligam ao fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88), e assim recrutam proteínas de quinase associadas ao receptor de IL-1 (IRAK) e ao TRAF6 (SRIVASTAV et al., 2015). Na via canônica estudada, é proposto que, na micróglia, ocorra o reconhecimento por TLR4, levando a sinalização de MyD88 e ativação de TRAF6. Como consequências desta ativação, pode ocorrer a ativação do complexo NF κ B e consequente produção de proteínas pró-inflamatórias (Figura 04A); a ativação do fator de transcrição IRF7, que leva a produção de IFN α (Figura 04B); e a ativação do complexo AP1 com produção de INOS, COX2, cPLA2 e MMP-9 (Figura 04C).

Dentre as quimiocinas avaliadas neste trabalho, o gene CCL3 apresentou aumento da expressão no cérebro de cães com LVC. Strauss-Ayali et al. (2007) verificaram a alta expressão de CCL3 em amostras de baço de cães naturalmente infectados, e atribuíram o acúmulo de infiltração de monócitos, células CD4+ e CD8+ à quimioatração. Melo et al. (2015), avaliando cérebros de cães com LVC, também identificaram o aumento da expressão de CCL3, concluindo que o cérebro de cães com LVC é um ambiente pró-inflamatório propício para o acúmulo seletivo de células, com predominância de linfócitos T (MELO et al., 2009).

Houve o aumento de expressão dos genes CCR4, CCR6 e CCR8 no cérebro dos cães com LVC. A investigação destes receptores é escassa na literatura, e a avaliação em cérebros de cães infectados ainda não foi documentada. Em amostras de fígado e baço de cães infectados para *L. infantum*, foi identificada uma baixa expressão de CCR4, CCR6 e CCR8 tanto em cães sintomáticos quanto cães assintomáticos comparados ao grupo controle (NASCIMENTO et al., 2013), esta variação de padrão de acordo com o órgão corrobora com a ideia de compartimentalização imunológica durante a LVC (REIS et al., 2009).

O gene IFN γ , amplamente investigado na LVC, apresentou alta expressão no cérebro de cães com LVC. A expressão desta citocina é entendida como compartimentalizada em órgãos específicos (CARRILO; MORENO, 2009), e está relatada no sangue (CHAMIZO et al., 2005), em medula óssea (MANZILLO et al., 2006), em baço (CORREA et al., 2007), em linfonodos (ALVES et al., 2009; BARBOSA et al., 2011) de cães infectados.

Em convergência com o presente trabalho, Melo et al. (2013) evidenciaram a alta expressão de IFN γ em cérebros de cães com LVC sem correlação com a carga parasitária; e Melo et al. (2017), em um modelo de inflamação em cérebros de camundongos infectados para *L. donovani*, observaram a alta expressão de IFN γ , em fase inicial e tardia da doença, e associaram esta expressão à produção de quimiocinas e desestabilização da BHE.

Na via canônica estudada (Figura 05), é sugerido que as células Th1 promovam a produção de IFN γ que, por meio da sinalização do receptor IFN γ R, desencadeiem na micróglia a produção de (1) IFN γ , por meio da sinalização de STAT1, que promove o dano neuronal; (2) PGE2, responsável pelo recrutamento de Th1; (3) complexo NF κ B, que gera a síntese de diferentes proteínas pró-inflamatórias; (4) iNOS, por meio da sinalização do STAT1, que promove o estresse oxidativo; (5) a citocina IL10, que também participa do recrutamento de células Th1. Além disso, quando há a sinalização do complexo NF κ B (Figura 06B), pelo IFN γ na micróglia, dentre as proteínas

pró-inflamatórias produzidas, encontra-se o TNF que é responsável por promover a quebra da BHE, astrogliose e o dano neuronal.

Foi identificado neste trabalho o aumento da expressão do gene TNF, citocina multifuncional pró-inflamatória. Grande parte dos trabalhos, que investiga a expressão de TNF, destaca seu mecanismo efetor de proteção relacionado à ativação de macrófagos e controle da infecção por LVC (HOSEIN et al., 2017).

Uma variedade de trabalhos investiga a expressão de TNF na infecção por *L. infantum* em diferentes órgãos de cães (HOSEIN et al., 2017), em amostras de pele (BRACHELENTE et al., 2005), na medula óssea (MANZILLO et al., 2006), em amostras de jejuno e cólon (FIGUEIREDO et al., 2014), e linfonodos (VENTURIN et al., 2016).

Melo et al. (2013) identificaram aumento da expressão de TNF em amostras de cérebro de cães com LVC, mas não houve correlação desta expressão com a carga parasitária.

Na via canônica estudada, é proposto que o TNF na micróglia, por meio da regulação de células Th1 (Figura 06A), leve a ativação do complexo NFκB, e que também possa promover, por estimulação da produção de IFNγ (Figura 06B), a quebra da BHE, astrogliose e dano neuronal. Nos astrócitos (Figura 07), o TNF tem comportamento semelhante, sendo ativado pelo complexo NFκB e promovendo a quebra da BHE, associada a IL-1β. O envolvimento do TNF juntamente com a IL-1β nas alterações de permeabilidade da BHE (ABBOTT et al., 2006), é descrito em cérebros de cães naturalmente infectados para *L. infantum*, o que permite o tráfego de leucócitos no tecido nervoso, por meio da expressão de moléculas de adesão (MELO et al., 2015).

A IL-13 teve aumento da expressão no cérebro dos cães com LVC. Em infecções por *L. infantum* em cães, a literatura sobre IL-13 ainda é pouco esclarecedora, e a detecção de alta expressão deste gene está relacionada principalmente a amostras de pele (BRACHELENTE et al., 2005; MENEZES-SOUZA et al., 2011; PAPADOGIANAKIS, KOUTINAS, 2015). Até o presente momento, não há relatos da avaliação de IL-13 em cérebros de cães com LVC.

A IL-13, quando produzida primariamente por células Th2 ativadas, destaca-se por sua ação imunoreguladora, capaz de modular a inflamação em diferentes tecidos (KWON et al., 2018), entretanto é sabido que a IL-13 também participa da regulação de células T nas respostas Th1 e Th17 (McCORMICK; HELLER, 2015).

No presente trabalho, houve a investigação de diferentes classes de genes relacionados à resposta Th17. Apesar da expressão da citocina IL17A não apresentar aumento de expressão nos cães infectados, o aumento da expressão de RORC, STAT3 e CCR6 reforçam o envolvimento da resposta Th17 na patogênese das lesões observadas no cérebro dos cães com LVC. Os fatores de transcrição STAT3 e RORC participam da diferenciação Th17 por meio da regulação da IL-6 (AUGUST, 2018), e da transdução das células T *naive* (IVANOV et al., 2006). As células Th17 necessitam serem positivas para CCR6 para que haja a produção de IL17 (VAN LANGELAAR et al., 2018).

Com relação à LVC, os estudos são poucos esclarecedores e não houve a investigação de STAT3, RORC E CCR6 na ativação da resposta Th17 em cães com LVC. Em estudo com infecção por *L. infantum* em diferentes tecidos de cães, foi evidenciada uma baixa expressão de IL-17 e IL-22 (citocinas relacionadas à resposta TH17) com a progressão da doença em amostras de linfonodos; baixa expressão de IL-22 em amostras de baço comparadas ao grupo controle; baixa expressão de IL-22 em amostras de fígado relacionada com a progressão da doença; e, em amostras de pele, não houve a detecção de diferença da expressão de IL-17 e IL-22 do grupo controle.

Não houve a investigação de IL-22 no presente trabalho. É clara a necessidade de estudos esclarecedores sobre a resposta Th17 em LVC, porém o presente trabalho, em investigação inédita, especula a participação da resposta Th17 por meio da alta expressão dos genes relacionados STAT3, RORC e CCR6 em cérebros de cães com LVC.

2.1.7. Conclusão

O aumento da expressão de genes relevantes para o início, a manutenção e a persistência da inflamação indica a participação da resposta imune inata e adaptativa no cérebro de cães infectados naturalmente para *L. infantum*. Mesmo em cães em fase inicial da LVC, foi possível observar a presença de células inflamatórias em 36,4% dos cães infectados.

A ativação da via de sinalização da neuroinflamação, evidenciou a ação, em micróglia, de genes como TLR4, TRAF6, IRF3, IFN β 1, IFN γ e TNF, que podem ser responsáveis pela produção de proteínas pró-inflamatórias, quebra da BHE, dano neuronal, recrutamento de resposta Th1, estresse oxidativo e astrogliose. Em astrócitos, genes TLRs participam do reconhecimento e ativação do complexo NF κ B, o que leva a ativação/regulação de TNF, IFN β 1, CD80 e CD86, o que pode resultar em quebra da BHE, ativação da micróglia, ativação de células T CD4+.

2.1.8. Declarações

2.1.8.1. Aprovação Ética

Todos os procedimentos e métodos utilizados no estudo foram realizados sob ciência e de acordo com a Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA da FMVA, UNESP, Araçatuba/SP (#FOA 00633-2016).

2.1.8.2. Financiamento

L. C. Bregano recebeu apoio de bolsa de estudos de doutorado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) N°201614828-9. O projeto de pesquisa foi financiado por FAPESP N° 20160284-9.

2.1.9. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J.; RONNBACK, L.; HANSSON, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 1, p. 41-53, Jan 2006.
- ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 137, n. 3-4, p. 275-83, Oct 15 2010.
- ALEXOPOULOU, L.; DESNUES, B.; DEMARIA, O. Toll-like receptor 8: the awkward TLR. **Med. Sci.: M/S**, v. 28, n. 1, p. 96-102, 2012.
- AUGUST, A. Who regulates whom: ZNF341 is an additional player in the STAT3/TH17 song. **Sci Immunol**, v. 3, n. 24, Jun 15 2018.
- BALLABH P.; BRAUN A.; NEDERGAARD M. The blood–brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiol. Dis.**, v. 16, p. 11-13, 2004.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 7, p. 324-30, Jul 2008.
- BARBOSA, M. A. et al. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **J Comp Pathol**, v. 145, n. 4, p. 336-44, Nov 2011.
- BECHMANN, I. et al. Presence of B7--2 (CD86) and lack of B7--1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. **FASEB J**, v. 15, n. 6, p. 1086-8, Apr 2001.
- BLAVIER, A. et al. Atypical forms of canine leishmaniasis. **Vet J**, v. 162, n. 2, p. 108-20, Sep 2001.
- BOGGIATTO, P. M. et al. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clin Vaccine Immunol**, v. 17, n. 2, p. 267-73, Feb 2010.

- BRACHELENTE, C. et al. Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Vet Pathol**, v. 42, n. 2, p. 166-75, Mar 2005.
- CARDINOT, C. B. et al. Detection of Ehrlichia canis, Babesia vogeli, and Toxoplasma gondii DNA in the Brain of Dogs Naturally Infected with Leishmania infantum. **J Parasitol**, v. 102, n. 2, p. 275-9, Apr 2016.
- CARRILLO E, MORENO J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol. Immunopathol.**, v. 128, n. 1, p. 67-70, 2009.
- CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 103, n. 1-2, p. 67-75, Jan 10 2005.
- CHATZIGEORGIOU, A. et al. CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. **Biofactors**, v. 35, n. 6, p. 474-83, Nov-Dec 2009.
- CLAY, G. M.; SUTTERWALA, F. S.; WILSON, M. E. NLR proteins and parasitic disease. **Immunol Res**, v. 59, n. 1-3, p. 142-52, Aug 2014.
- COLOMBO, F. A. Performance of a real time PCR for leishmaniasis diagnosis using a L. (L.) infantum hypothetical protein as target in canine samples. **Exp. Paras.**, v. 157, p. 156–162, 2015.
- CORREA, A. P. et al. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. **Vet Parasitol**, v. 143, n. 3-4, p. 267-74, Feb 28 2007.
- DOS SANTOS, J. C. et al. The NOD2 receptor is crucial for immune responses towards New World Leishmania species. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 15219, Nov 9 2017.
- DOTY, R. T.; CLARK, E. A. Two regions in the CD80 cytoplasmic tail regulate CD80 redistribution and T cell costimulation. **J Immunol**, v. 161, n. 6, p. 2700-7, Sep 15 1998.
- ELIA, G. et al. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. **J. of Vir. Met.**, v. 136, n. 1-2, p. 171-176, 2006.

- FALCÃO, S.A., JARAMILLO, T.M., FERREIRA, L.G., BERNARDES, D.M., SANTANA, J.M., FAVALI, C.B. Leishmania infantum and Leishmania braziliensis: Differences and Similarities to Evade the Innate Immune System. **Front. Immunol.**, v. 3, n. 7, p. 287, 2016.
- FARIA, M. S.; REIS, F. C.; LIMA, A. P. Toll-like receptors in leishmania infections: guardians or promoters? **J Parasitol Res**, v. 2012, p. 930257, 2012.
- FENG, D. et al. DC-SIGN reacts with TLR-4 and regulates inflammatory cytokine expression via NF-kappaB activation in renal tubular epithelial cells during acute renal injury. **Clin Exp Immunol**, v. 191, n. 1, p. 107-115, Jan 2018.
- FERRER, L.M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. From canine leishmaniasis update (Ed. R. Killick-Kendrick). **Proceedings of a canine leishmaniasis forum**, Barcelona, 28-31 January, pp 6-10, 1999.
- FIGUEIREDO, M. M. et al. 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, May 14 2013.
- FUKATA, M.; VAMADEVAN, A. S.; ABREU, M. T. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. **Semin Immunol**, v. 21, n. 4, p. 242-53, Aug 2009.
- FURUTA, P. I. et al. Comparison between a soluble antigen-based ELISA and IFAT in detecting antibodies against Babesia canis in dogs. **Rev. Bras. de Parasit. Vet.**, v. 18, n. 3, p. 41-45, 2009.
- GHOSH, M. et al. Leishmania donovani infection of human myeloid dendritic cells leads to a Th1 response in CD4+ T cells from healthy donors and patients with kala-azar. **J Infect Dis**, v. 194, n. 3, p. 294-301, Aug 1 2006.
- GRANO, F. G. et al. First detection of Leishmania infantum DNA within the brain of naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 204, n. 3-4, p. 376-80, Aug 29 2014.
- GRANO, F. G. et al. T lymphocyte immunophenotypes in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Vet. Parasit.**, v. 232, p. 12-20, 2016.

- GRANO, F. G. et al. Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with visceral leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 253, p. 30-38, 2018.
- HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 95-115, Jan 2017.
- HOU, M. S. et al. Down-Regulation of IRF6 Protects Cortical Neurons Against Traumatic Neuronal Injury Through Activating Akt-eNOS Pathway. **Cell Mol Neurobiol**, v. 37, n. 4, p. 587-594, May 2017.
- HUANG, R. et al. The transcription factor IRF6 co-represses PPAR γ -mediated cytoprotection in ischemic cerebrovascular endothelial cells. **Scient. Rep.**, v. 7, n. 1, p. 2150, 2017.
- IMITOLA, J. et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 α /CXC chemokine receptor 4 pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 52, p. 18117-22, Dec 28 2004.
- IVANOV, I. I. et al. The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17 $^+$ T helper cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121-1133, 2006.
- JIANG, S.; SUN, L. Tongue Sole CD209: A Pattern-Recognition Receptor that Binds a Broad Range of Microbes and Promotes Phagocytosis. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 9, Sep 4 2017.
- KONAT, G.W., KIELIAN, T., MARRIOTT, I. The role of Toll-like receptors in CNS response to microbial challenge. **J. Neurochem.**, v. 99, n. 1, p. 1-12, 2006.
- KWON, H. J.; CHOI, J. E.; BAE, Y. K. Interleukin-13 receptor alpha 2 expression in tumor cells is associated with reduced disease-free survival in patients with luminal subtype invasive breast cancer. **Tumour Biol**, v. 40, n. 6, p. 1010428318783657, Jun 2018.
- LIMA, V. M. et al. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 4, p. 485-9, Apr 2003.

- LIU, Y. et al. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. **Nat Med**, v. 12, n. 5, p. 518-25, May 2006.
- 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. of the Nat. Acad. of Sci.**, v. 104, n. 22, p. 9375-9380, 2007.
- MAGNUS, T. et al. Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. **J Neurosci**, v. 25, n. 10, p. 2537-46, Mar 9 2005.
- MAIA, C. S. et al. Neurological disease in human and canine leishmaniasis--clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunol**, v. 37, n. 8, p. 385-93, Aug 2015.
- MANZILLO, V. F., RESTUCCI, B., PAGANO, A., GRADONI, L. AND OLIVA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **Vet. Rec.**, v. 158, p. 690–694, 2006.
- MARQUEZ, M. et al. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **J Vet Diagn Invest**, v. 25, n. 1, p. 142-6, Jan 2013.
- MARSH, B. et al. Systemic lipopolysaccharide protects the brain from ischemic injury by reprogramming the response of the brain to stroke: a critical role for IRF3. **Journ. of Neurosc.**, v. 29, n. 31, p. 9839-9849, 2009.
- MCCORMICK, S. M.; HELLER, N. M. Regulation of Macrophage, Dendritic Cell, and Microglial Phenotype and Function by the SOCS Proteins. **Front Immunol**, v. 6, p. 549, 2015.
- MCDOWELL, M. A. et al. *Leishmania* priming of human dendritic cells for CD40 ligand-induced interleukin-12p70 secretion is strain and species dependent. **Infect Immun**, v. 70, n. 8, p. 3994-4001, Aug 2002.
- MELO, G. D. et al. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 162, n. 3-4, p. 248-56, Jun 10 2009.

- MELO, G. D. et al. Unveiling Cerebral Leishmaniasis: parasites and brain inflammation in *Leishmania donovani* infected mice. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 8454, Aug 16 2017.
- MELO, G. D. et al. Blood–brain barrier disruption during spontaneous canine visceral leishmaniasis. **Par. Immun.**, v. 37, n. 12, p. 635-645, 2015.
- MELO, G. D. et al. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: a natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Vet. Parasit.**, v. 192, n. 1-3, p. 57-66, 2013.
- 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, n. 3, p. 293-304, Dec 2011.
- MELO, G. D.; MARCONDES, M.; MACHADO, G. F. Canine cerebral leishmaniasis: potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 148, n. 3-4, p. 260-6, Aug 15 2012.
- MELO, G. D.; MARCONDES, Mary; MACHADO, Gisele F. Canine cerebral leishmaniasis: potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. **Vet. Immun. and Immunop.**, v. 148, n. 3-4, p. 260-266, 2012.
- MENEZES-SOUZA, D., CORREA-OLIVEIRA, R., GUERRA-SA, R., GIUNCHETTI, R. C., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O. A., OLIVEIRA, G. C. AND REIS, A. B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Vet. Parasit.**, v. 177, p. 39–49, 2011.
- MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2004. 351p.
- MIRANDA, S. et al. Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. **Vet. Parasit.**, v. 144, n. 3-4, p. 251-260, 2007.

- MORENO, J.; ALVAR, J.. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **T. in Parasit.**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.
- MUKHERJEE, I.; CHAKRABORTY, A.; CHAKRABARTI, S. Identification of internalin-A-like virulent proteins in *Leishmania donovani*. **Paras. & Vec.**, v. 9, n. 1, p. 557, 2016.
- NASCIMENTO, M. S. L., ALBUQUERQUE, T. D. R., DO-VALLE-MATTA, M. A., CALDAS, I. S., DINIZ, L. F., TALVANI, A., BAHIA, M. T., ANDRADE, C. M., GALVAO, L. M. C., CAMARA, A. C. J. AND GUEDES, P.M.M. Naturally *Leishmania infantum*-infected dogs display an overall impairment of chemokine and chemokine receptor expression during visceral leishmaniasis. **Vet. Immun. and Immunop.**, v.153, p. 202–208, 2013.
- NIETO, C. G. et al. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Vet Rec**, v. 139, n. 14, p. 346-7, Oct 5 1996.
- ODA, K.; KITANO, H. A comprehensive map of the toll-like receptor signaling network. **Mol Syst Biol**, v. 2, p. 2006 0015, 2006.
- PAPADOGIANNAKIS E.I., KOUTINAS A.F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Vet Imm. Immun.**, v. 163, n. 3, p. 94-102, 2015.
- PAUN, A. et al. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 1, p. e1001246, Jan 6 2011.
- PHILPOTT, D. J. et al. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 1, p. 9-23, Jan 2014.
- PINELLI, E. et al. Infection of a canine macrophage cell line with *leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet Parasitol**, v. 92, n. 3, p. 181-9, Oct 1 2000.
- PROBST, P. et al. A *Leishmania* protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor- α production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. **Eur J Immunol**, v. 27, n. 10, p. 2634-42, Oct 1997.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, Mar 15 2009.

SAKAMOTO, K. P.; DE MELO, G. D.; MACHADO, G. F. T and B lymphocytes in the brains of dogs with concomitant seropositivity to three pathogenic protozoans: *Leishmania chagasi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. **BMC Res Notes**, v. 6, p. 226, Jun 8 2013.

SANKOWSKI, R.; MADER, S.; VALDES-FERRER, S. I. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 28, 2015.

SÃO PAULO (Estado). Superintendência de controle de endemias (SUCEN) e Coordenadoria de controle de doenças (CCD). Secretaria de estado da saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo**. São Paulo: A Secretaria, 2006. 161pp.

SCHLEICHER, U. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **Journ. of Experim. Med.**, v. 204, n. 4, p. 893-906, 2007.

SCHONBECK, U.; LIBBY, P. CD40 signaling and plaque instability. **Circ Res**, v. 89, n. 12, p. 1092-103, Dec 7 2001.

SHUGART, J. A. et al. A self-help program for memory CD8+ T cells: positive feedback via CD40-CD40L signaling as a critical determinant of secondary expansion. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64878, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet Parasitol**, v. 165, n. 1-2, p. 1-18, Oct 28 2009.

SRIVASTAV, S. et al. IRAK-M regulates the inhibition of TLR-mediated macrophage immune response during late in vitro *Leishmania donovani* infection. **Eur J Immunol**, v. 45, n. 10, p. 2787-97, Oct 2015.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 138-47, Feb-Mar 2007.

STILLMAN, B. A. et al. Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **J. of the Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 245, n. 1, p. 80-86, 2014.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet Res**, v. 38, n. 4, p. 547-64, Jul-Aug 2007.

TRAVI, B. L. et al. Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 81, n. 6, p. 994-1003, Dec 2009.

TURCHETTI, A. P. et al. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 163, n. 1-2, p. 67-76, Jan 15 2015.

VAN LANGELAAR, J. et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. **Brain**, v. 141, n. 5, p. 1334-1349, May 1 2018.

VENTURIN G.L., CHIKU V.M., SILVA K.L., DE ALMEIDA B.F., DE LIMA V.M. M1 polarization and the effect of PGE2 on TNF- α production by lymph node cells from dogs with visceral leishmaniasis. **Paras. Immunol.**, v. 38, n. 11, p. 698-704, 2016

VINUELAS, J. et al. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Vet Parasitol**, v. 101, n. 1, p. 23-7, Oct 31 2001.

WALKER, D. G.; LUE, L. F. Immune phenotypes of microglia in human neurodegenerative disease: challenges to detecting microglial polarization in human brains. **Alzheimers Res Ther**, v. 7, n. 1, p. 56, Aug 19 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of neglected tropical diseases. **Stat. of endem. of visc. Leishm., worldwide, 2015**. World Health Organization, 2015. Disponível em:

<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf> Acesso em 28 de junho de 2018.

ZANETTE, M. F. et al. Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum* chagasi tests in dogs. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 1, p. 105-7, Jan-Feb 2014.

ZEINSTRA, E.; WILCZAK, N.; DE KEYSER, J. Reactive astrocytes in chronic active lesions of multiple sclerosis express co-stimulatory molecules B7-1 and B7-2. **J Neuroimmunol**, v. 135, n. 1-2, p. 166-71, Feb 2003.

2.1.10. Arquivos Adicionais

Tabela adicional 01 - Cães *controle* e infectados naturalmente por *L. infantum*. Diagnóstico molecular e sorológico por teste ELISA, de acordo com Lima et al., 2005, sendo consideradas amostras positivas com densidade óptica acima de 0,270. A letra (N) indica negatividade no teste realizado, e letra (P) indica positividade no teste realizado. A letra (F) indica sexo fêmea, e a letra (M) indica sexo macho.

Cão	Idade	Sexo	Teste ELISA <i>Leishmania spp.</i>		Teste qPCR
			Densidade Óptica	Positividade	<i>Leishmania spp.</i> Positividade
Infectado 01	Adulto	F	0,347	P	P
Infectado 02	Adulto	F	0,904	P	P
Infectado 03	Adulto	M	0,582	P	P
Infectado 04	Adulto	F	0,656	P	P
Infectado 05	Adulto	M	1,336	P	P
Infectado 06	Adulto	F	0,818	P	P
Infectado 07	Adulto	M	0,492	P	P
Infectado 08	Adulto	F	1,569	P	P
Infectado 09	Adulto	F	1,578	P	P
Infectado 10	Adulto	M	1,421	P	P
Infectado 11	Adulto	M	1,350	P	P
Controle 01	Adulto	M	0,039	N	N
Controle 02	Adulto	M	0,069	N	N
Controle 03	Adulto	M	0,124	N	N
Controle 04	Adulto	M	0,138	N	N

Destacados em cinza os cães do grupo controle

Tabela adicional 02 - Cães *controle* e infectados naturalmente por *L. infantum*. Perfil hematológico por exame de eritrograma.

Cão	Eritrócitos x10 ⁶ /µl	Hemoglobina g/dl	Volume Globular %	VCM fl	CHCM %
Infectado 01	6,92	15,34	47	67,92	32,63
Infectado 02	5,20	11,34	35	67,31	32,39
Infectado 03	7,04	15,00	46	65,34	32,62
Infectado 04	4,24	09,00	28	66,04	32,15
Infectado 05	6,77	14,00	43	63,52	32,56
Infectado 06	4,23	11,00	33	78,01	33,33
Infectado 07	9,01	19,10	53	58,82	36,04
Infectado 08	7,93	16,30	50	63,05	32,60
Infectado 09	4,42	10,40	34	76,92	30,59
Infectado 10	3,04	06,80	20	65,79	34,00
Infectado 11	5,08	11,00	35	68,90	31,43
Controle 01	6,92	15,67	48	69,36	32,64
Controle 02	6,87	14,34	44	64,05	32,58
Controle 03	8,08	17,00	48	59,40	35,42
Controle 04	7,43	15,40	47	63,26	32,77

Destacados em cinza os valores obtidos superiores/inferiores aos valores de referência consultada. VCM = volume corpuscular médio; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média.

Tabela adicional 03 - Cães *controle* e infectados naturalmente por *L. infantum*. Perfil hematológico por exames de leucograma, contagem de plaquetas e quantificação de proteínas plasmáticas totais.

Cão	Leucócitos /µl	Segmentados /µl	Linfócitos /µl	Monócitos /µl	Eosinófilos /µl	Plaquetas x10 ³ /µl	PPT g/dl
Infectado 01	20200	17170	606	1212	1212	220	6,8
Infectado 02	14600	12848	1168	428	156	380	8,6
Infectado 03	14500	10440	2900	879	290	320	7,7
Infectado 04	16800	11928	3528	840	504	200	11,3
Infectado 05	15900	11130	3180	318	1272	260	9,2
Infectado 06	6900	6279	414	207	0	240	7,1
Infectado 07	20200	9696	4242	606	5656	300	7,1
Infectado 08	12800	9472	1024	384	1920	300	8,8
Infectado 09	7900	4977	2765	158	0	140	9,5
Infectado 10	10900	8066	2725	109	0	200	9,4
Infectado 11	13200	12144	528	396	132	200	11,2
Controle 01	13800	10626	2622	276	276	240	6,7
Controle 02	16000	11135	2590	1110	1165	300	7,0
Controle 03	13360	9486	2295	459	1120	170	7,3
Controle 04	8556	6156	1230	162	1008	320	7,6

Destacados em cinza os valores obtidos superiores/inferiores aos valores de referência consultada. PPT = Proteína plasmática total.

Tabela adicional 04 - Cães *controle* e infectados naturalmente por *L. infantum*. Perfil bioquímico sérico para a avaliação de função hepática e renal.

Cão	ALT (U/L)	FA (U/L)	PT (mg/dL)	Albumina (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Uréia (mg/dL)
Infectado 01	47	38	8,0	3,03	1,82	15
Infectado 02	46	50	8,1	1,22	2,31	73
Infectado 03	15	19	5,4	1,82	0,94	21
Infectado 04	204	837	11,5	1,12	1,38	50
Infectado 05	26	27	8,2	2,90	0,86	36
Infectado 06	43	123	6,4	1,50	0,68	46
Infectado 07	43	38	7,3	3,13	1,31	26
Infectado 08	37	95	8,9	3,04	1,29	56
Infectado 09	21	53	9,4	2,52	0,77	40
Infectado 10	15	69	8,2	2,84	1,12	65
Infectado 11	31	36	11,3	2,88	2,30	200
Controle 01	31	33	6,8	3,10	1,00	43
Controle 02	40	28	5,8	2,66	0,93	24
Controle 03	72	21	6,7	2,70	1,03	26
Controle 04	42	23	7,0	2,98	1,13	27

Destacados em cinza os valores obtidos superiores/inferiores aos valores de referência consultada.

Tabela adicional 05 - Cães *controle* e infectados naturalmente por *L. infantum*. Diagnóstico citológico por teste parasitológico dos tecidos linfonodo, baço e medula óssea. O símbolo (+) indica positividade no teste, o símbolo (-) indica negatividade no teste realizado.

Cão	Exame Parasitológico		
	Linfonodo	Baço	Medula Óssea
Infectado 01	+	-	-
Infectado 02	+	+	+
Infectado 03	+	-	+
Infectado 04	+	+	+
Infectado 05	+	-	-
Infectado 06	+	+	-
Infectado 07	-	+	-
Infectado 08	+	-	-
Infectado 09	+	-	-
Infectado 10	+	-	-
Infectado 11	+	-	+
Controle 01	-	-	-
Controle 02	-	-	-
Controle 03	-	-	-
Controle 04	-	-	-

Destaques em cinza representam a positividade no teste realizado

Tabela adicional 06 - Cães *controle* e infectados naturalmente para *L. infantum*. Avaliação da quantidade e da concentração de RNA de amostras de SNC em espectrofotômetro (NanoDrop®) e respectivos valores de absorvância.

Cão	Quantificação de RNA	
	260-280	ng/ μ L
Infectado 01	2,09	201,2
Infectado 02	2,03	66,1
Infectado 03	2,08	158,7
Infectado 04	2,07	348,8
Infectado 05	2,06	260,7
Infectado 06	2,04	186,7
Infectado 07	2,10	203,0
Infectado 08	2,06	337,5
Infectado 09	2,08	272,1
Infectado 10	2,08	446,8
Infectado 11	2,10	336,6
Controle 01	2,09	101,4
Controle 02	2,09	280,7
Controle 03	2,09	210,9
Controle 04	2,07	193,8

Tabela adicional 07 - Cães *controle* e infectados naturalmente para *L. infantum*. Número de integridade de RNA (RIN) de amostras de extraídas de SNC.

Cão	RIN <i>RNA Integrity Number</i>
Infectado 01	7,0
Infectado 02	7,1
Infectado 03	7,0
Infectado 04	7,7
Infectado 05	7,5
Infectado 06	7,3
Infectado 07	7,6
Infectado 08	7,0
Infectado 09	7,7
Infectado 10	7,1
Infectado 11	7,3
Controle 01	7,9
Controle 02	7,3
Controle 03	7,6
Controle 04	7,2

Tabela adicional 08 - Composição de genes da placa de *PCR Profiler* RT² Profiler™ PCR Array Dog Innate & Adaptive Immune Responses

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	APCS	C3	C5AR1	CAMP	CASP4	CCL2	CCL3	CCL5	CCR4	CCR5	CCR6	CCR8
B	CD14	CD1A6	CD209	CD28	CD4	CD40	CD40LG	CD80	CD86	CD8A	CRP	CSF2
C	CXCL10	CXCR3	FASLG	FOXP3	GATA3	ICAM1	IFNB1	IFNG	IL10	IL13	IL15	IL17A
D	IL18	IL1A	IL1B	IL1R1	IL2	IL4	IL5	IL6	CXCL8	IRAK1	IRF3	IRF6
E	ITGAM	JAK2	LBP	LY96	LYZ	MAPK1	MAPK8	MPO	MX1	MYD88	NFKB1	NFKBIA
F	NLRP3	NOD1	NOD2	RAG1	RORC	SLC11A1	STAT1	STAT3	STAT4	STAT6	TBX21	TICAM1
G	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TNF	TRAF6	TYK2
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

HK = Housekeeping genes; GDC = Genomic DNA control; RTC = Reverse-transcription controls; PPC = Positive PCR controls. Destaques em cinza dos genes em aumento de expressão comparados ao grupo controle.

Tabela adicional 09 - Sinais clínicos observados em exame clínico geral inicial de cães naturalmente infectados para *L. infantum*.

Sinais Clínicos	Cães										
	INF01	INF02	INF03	INF04	INF05	INF06	INF07	INF08	INF09	INF10	INF11
Lesão Ponta Orelha	N	S	N	S	S	N	S	S	N	N	S
Alopecia Difusa	N	S	N	N	N	S	S	N	N	S	S
Dermatite Generalizada	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N
Lesões Ulcerativas/Pele	N	S	S	N	S	S	N	N	N	S	S
Seborreia Seca	N	S	S	N	S	S	N	S	N	S	S
Onicogribose	N	S	N	S	N	S	N	N	S	S	S
Atrofia M. Temporal	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	S
Atrofia Generalizada	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	S
Mucosa Hipocorada	N	N	N	S	N	N	N	N	N	S	N
Linfoadenomegalia Focal	S	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N
Linfoadenomegalia Generalizada	N	S	N	N	S	N	N	S	S	S	N
Hepatomegalia	S	S	N	N	S	N	N	S	S	N	S
Esplenomegalia	S	S	S	S	S	S	N	S	S	N	S
Epistaxe/Secreção nasal	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N
Secreção Ocular	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N

Destaques em cinza representam a presença do sinal clínico. S = sim; N = não.

Tabela adicional 10 - Escore de sinais clínicos baseado nas alterações clínicas compatíveis com leishmaniose visceral canina.

Escore Sinais Clínicos	Alterações
1	Sinais pouco evidentes, linfadenopatia, sinais dermatológicos
2	Onicogribose, úlceras, epistaxe, emagrecimento
3	Uveíte, artrite, caquexia, sinais drc (estomatite, hálito urêmico)

Tabela adicional 11 - Cães *controle* e infectados naturalmente por *L. infantum*. Estadiamento clínico (SOLANO-GALLEGO et al., 2009) baseado em escore de sinais clínicos, valores de exames bioquímicos de creatinina e albumina séricos, e presença de anemia e hiperproteinemia em hemograma.

Cão	Sorologia	Escore Sinais Clínicos	Creatinina (mg/dL)	Anemia	Hiperproteinemia	Albumina (mg/dL)	Estadiamento Clínico
Infectado 01	0,347	1	1,82	N	N	3,03	1
Infectado 02	0,904	3	2,31	S	S	1,22	4
Infectado 03	0,582	2	0,94	N	N	1,82	2
Infectado 04	0,656	1	1,38	S	S	1,12	1
Infectado 05	1,336	1	0,86	N	S	2,90	1
Infectado 06	0,818	2	0,68	S	N	1,50	2
Infectado 07	0,492	2	1,31	N	N	3,13	1
Infectado 08	1,569	1	1,29	N	S	3,04	1
Infectado 09	1,578	1	0,77	S	S	2,52	1
Infectado 10	1,421	1	1,12	S	S	2,84	1
Infectado 11	1,350	1	2,30	S	S	2,88	3

Destacados em cinza os valores obtidos superiores/inferiores aos valores de referência consultada. S = sim; N = não.

Tabela adicional 12 - Estadiamento clínico da leishmaniose canina baseado no *status* sorológico, sinais clínicos, achados laboratoriais, tipo de terapia e prognóstico de cada estágio. Adaptado de Solano-Galego et al., 2009.

Estágios Clínicos	Sorologia	Sinais Clínicos	Achados Laboratoriais
Estágio 1	Negativo a baixos níveis de anticorpos	Cães com poucos sinais clínicos como linfadenomegalia periférica ou dermatite papular	Geralmente sem anormalidades clinicopatológicas observadas Perfil renal normal: Creatinina < 1,4 mg/dL, não proteinúrico: UPC < 0,5
Estágio 2	Baixos a altos níveis de anticorpos	Cães com sinais clínicos do estágio 1 e/ou lesões cutâneas difusas ou simétricas como dermatite esfoliativa/onicogrifose, ulcerações (plano nasal, coxins, proeminências ósseas, junções mucocutâneas), anorexia, perda de peso, febre e epistaxe	Anormalidade clinicopatológicas como anemia não regenerative leve, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade sérica Subestágios a) Perfil renal normal: Creatinina < 1,4 mg/dl; não proteinúrico: UPC < 0,5 b) Creatinina < 1,4 mg/dl; UPC = 0,5-1
Estágio 3	Médios a altos níveis de anticorpos	Cães com sinais clínicos do estágio 2 e/ou sinais originários das lesões por imuno-complexo: vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite	Anormalidade clinicopatológicas listadas no estágio 2 Doença renal crônica: Estágio IRIS 1 com UPC > 1 ou estágio 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl)
Estágio 4	Médios a altos níveis de anticorpos	Cães com sinais clínicos do estágio 3 e/ou tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica e insuficiência renal	Anormalidade clinicopatológicas listadas no estágio 2 Doença renal crônica: Estágio IRIS 3 (creatinina 2-5 mg/dl) e estágio 4 (creatinina > 5 mg/dl). Síndrome nefrótica: marcada proteinúria UPC > 5

Tabela adicional 13 - Cães *controle* e infectados naturalmente para *L. infantum*. Valores de C_T dos genes de interesse (critério de seleção de *fold change* ≥ 1,5 e p-valor ≤ 0,05) em cérebros.

Genes	C01	C02	C03	C04	INF01	INF02	INF03	INF04	INF05	INF06	INF07	INF08	INF09	INF10	INF11
CCL3	33,44	33,76	33,19	34,50	34,00	34,30	34,80	31,96	33,23	32,87	33,20	34,75	33,57	33,88	33,59
CCR4	36,34	36,13	35,47	37,78	38,78	36,58	36,87	33,75	35,96	UD	36,77	37,71	NC	36,47	35,97
CCR6	34,30	35,43	37,67	38,10	36,24	UD	37,73	UD	39,45	37,73	34,75	38,13	36,43	UD	UD
CCR8	36,14	36,41	38,14	37,54	UD	UD	38,29	34,02	UD	UD	UD	UD	UD	38,4	UD
CD14	28,94	27,90	28,62	28,91	28,95	29,37	29,10	28,13	28,90	28,35	27,48	29,04	28,07	29,2	28,32
CD209	34,31	33,64	34,49	34,48	34,71	35,05	33,70	33,59	34,69	33,86	34,53	34,26	33,62	35,64	34,61
CD4	35,06	33,07	33,89	34,41	34,59	33,93	32,90	32,34	34,22	33,94	32,62	34,35	32,81	34,36	32,87
CD40LG	32,13	32,88	34,47	34,03	33,23	33,22	32,57	32,61	33,01	32,63	32,23	33,59	32,55	33,19	32,94
CD80	29,91	28,45	29,70	30,39	29,88	30,63	29,87	28,77	30,04	29,41	28,54	30,25	29,33	30,49	29,8
CD86	28,76	27,93	29,45	29,81	29,58	31,42	28,59	28,54	28,96	28,74	28,25	29,69	28,93	29,3'	28,79
IFNB1	36,49	UD	UD	UD	UD	35,70	34,94	34,58	UD	35,80	UD	37,68	UD	36,33	35,51
IFNG	UD	UD	UD	37,98	UD	UD	37,56	34,41	36,32	UD	UD	37,58	39,85	35,07	35,88
IL13	UD	37,85	38,74	37,67	36,74	37,44	36,15	34,77	36,95	36,48	35,57	37,09	36,9	38,95	38,57
IRF3	27,84	26,38	27,82	27,56	27,81	28,23	27,54	25,74	27,84	27,41	26,70	27,98	27,09	27,81	27,43
IRF6	33,97	30,60	32,37	31,96	31,46	32,54	31,93	30,33	31,43	30,81	31,00	32,99	31,04	32,25	31,7
NOD1	31,00	30,66	31,48	31,93	32,13	31,76	31,61	30,78	31,84	31,83	30,56	31,86	31,07	31,9	31,89
RORC	33,79	34,31	35,67	35,09	35,68	36,02	35,36	33,99	34,84	34,97	34,28	36,38	34,99	35,2	34,75
STAT3	25,65	26,10	26,84	27,28	27,10	27,72	26,83	26,21	27,27	26,44	25,76	27,50	26,54	27,12	26,65
TLR4	28,89	27,89	28,07	28,62	28,55	30,01	28,41	27,07	28,74	28,30	27,98	28,94	28,41	29,03	28,1
TLR5	34,57	34,16	33,93	34,35	34,41	38,07	34,38	32,55	34,97	33,84	32,88	34,30	33,92	35,61	34,38
TLR6	33,74	32,76	34,60	34,55	34,29	33,65	33,78	32,05	33,87	33,46	32,70	33,42	33,82	34,09	33,88

TLR7	31,11	30,80	31,70	31,87	32,14	32,39	31,46	30,45	31,65	31,39	30,71	32,34	31,57	32,06	31,31
TNF	39,84	UD	35,16	37,45	36,22	35,38	36,06	36,27	34,83	38,49	38,57	35,24	35,18	34,78	35,54
TRAF6	27,19	25,96	26,06	27,24	26,87	28,20	26,97	25,76	27,23	26,54	26,16	27,13	26,26	27,27	26,6
HK1	23,11	23,09	22,95	23,64	24,63	26,20	24,47	23,64	25,19	24,14	22,94	24,92	23,87	24,55	24,35
HK2	21,56	21,38	22,43	23,65	24,06	23,87	23,13	22,08	22,66	22,82	22,83	23,45	22,72	22,11	22,89
HK3	19,49	18,58	18,78	20,10	20,24	21,21	20,72	19,87	20,58	19,98	19,25	20,71	19,67	20,45	20,31
HK4	23,84	23,08	23,11	24,66	24,81	26,32	25,00	24,29	25,02	24,46	23,61	25,06	24,38	25,08	24,91
HK5	20,46	20,32	20,35	21,59	21,95	21,30	21,55	20,88	21,92	21,68	20,89	21,74	20,89	21,92	21,34
GDC	35,00	35,00	35,00	35,00	36,16	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	31,57	32,93	32,01
RTC	21,80	20,97	21,46	22,62	22,61	21,71	23,10	22,13	23,00	22,60	21,98	22,92	21,54	22,94	22,95
RTC	21,90	21,02	21,53	22,75	22,71	21,76	23,28	22,15	23,07	22,79	22,05	23,09	21,65	23,03	22,99
RTC	21,83	20,91	21,37	22,62	22,55	21,68	23,10	22,01	22,94	22,60	21,95	22,97	21,49	22,93	22,86
PPC	21,53	20,07	21,45	22,08	21,62	20,48	21,84	20,38	22,45	21,54	20,70	21,74	20,47	21,72	21,68
PPC	21,36	19,97	21,46	21,90	21,53	20,47	21,84	20,24	22,33	21,45	20,58	21,69	20,47	21,58	21,66
PPC	21,40	19,93	21,50	21,91	21,57	20,38	21,72	20,22	22,29	21,37	20,58	21,58	20,48	21,53	21,55

Destacados em cinza os cães do grupo controle. HK = Housekeeping genes; GDC = Genomic DNA control; RTC = Reverse-transcription controls; PPC = Positive PCR controls; UD = Undetermined; C = Controle; INF = Infectados.

Tabela adicional 14 - Valores de referência utilizados nos exames hematológicos do presente trabalho. MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. **Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 2004. 351p.

	Valores de Referência	Unidade
Eritrócitos	5,50 – 8,50	$\times 10^6/\mu\text{L}$
Hemoglobina	12,00 – 18,00	g/dL
Volume Globular	37,00 – 55,00	%
VCM	60,00 – 77,00	fL
CHCM	32,00 – 36,00	%
Leucócitos	6.000 – 17.000	/ μL
Segmentados	3.000 – 11.500	/ μL
Linfócitos	1.000 – 4.800	/ μL
Monócitos	150 – 1.350	/ μL
Eosinófilos	150 – 1.250	/ μL
Plaquetas	160 – 430	$\times 10^3/\mu\text{L}$
PPT	6 – 8	g/dL
ALT	21 – 73	U/L
FA	20 – 156	U/L
PT	5,40 – 7,10	g/dL
Albumina	2,6 – 3,3	g/dL
Creatinina	0,5 – 1,5	mg/dL
Ureia	21,40 – 59,92	mg/dL

Tabela adicional 15 - Cães infectados naturalmente para *L. infantum*. Valores de C_T de amostras de baço no teste qPCR para investigação de *Leishmania sp.*

Cão	C_T / Baço
Infectado 01	29,86
Infectado 02	29,15
Infectado 03	29,21
Infectado 04	27,93
Infectado 05	28,75
Infectado 06	29,66
Infectado 07	31,12
Infectado 08	29,77
Infectado 09	30,23
Infectado 10	28,85
Infectado 11	30,6

Tabela adicional 16 - Vias canônicas relacionadas com genes em aumento de expressão de cérebros de cães naturalmente infectados para *L. infantum* quando comparados ao grupo controle, seus respectivos -log p-valor e taxas de relevância.

Vias Canônicas	-log(p-valor)	Relevância	Genes
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	2,03E01	12/95 (13%)	IFNG, TLR4, CD40LG, CD80, TLR5, CCL3L3, CD4, TLR6, IFNB1, TLR7, CD86, TNF
Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	1,64E01	11/137 (8%)	TRAF6, IFNG, TLR4, TLR5, TLR6, IFNB1, TLR7, NOD1, IRF3, IL13, TNF
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	1,4E01	9/90 (10%)	IFNG, TLR4, CD40LG, CD80, TLR5, TLR6, TLR7, CD86, TNF
Neuroinflammation Signaling Pathway	1,28E01	11/311 (4%)	TRAF6, IFNG, TLR4, CD80, TLR5, TLR6, IFNB1, TLR7, CD86, IRF3, TNF
T Helper Cell Differentiation	1,28E01	8/73 (11%)	IFNG, CD40LG, CD80, CD86, STAT3, RORC, IL13, TNF
TREM1 Signaling	1,28E01	8/75 (11%)	TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, CD86, NOD1, STAT3, TNF
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	1,22E01	8/89 (9%)	IFNG, TLR4, CD40LG, CD80, IFNB1, TLR7, CD86, TNF
Th1 and Th2 Activation Pathway	1,16E01	9/185 (5%)	IFNG, CD40LG, CCR4, CD80, CD4, CCR8, CD86, STAT3, IL13
Toll-like Receptor Signaling	1,07E01	7/76 (9%)	TRAF6, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, CD14, TNF
Th2 Pathway	8,65E00	7/150 (5%)	IFNG, CCR4, CD80, CD4, CCR8, CD86, IL13
NF-κB Signaling	8,12E00	7/181 (4%)	TRAF6, TLR4, CD40LG, TLR5, TLR6, TLR7, TNF
Dendritic Cell Maturation	7,94E00	7/194 (4%)	TRAF6, TLR4, CD40LG, CD80, IFNB1, CD86, TNF
Th1 Pathway	7,27E00	6/135 (4%)	IFNG, CD40LG, CD80, CD4, CD86, STAT3
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	7,27E00	7/248 (3%)	IFNG, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, STAT3, TNF
Hepatic Cholestasis	6,86E00	6/160 (4%)	TRAF6, IFNG, TLR4, CD14, IL13, TNF
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	6,63E00	7/313 (2%)	TRAF6, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, STAT3, TNF
Allograft Rejection Signaling	6,62E00	5/85 (6%)	IFNG, CD40LG, CD80, CD86, TNF
Role of PKR in Interferon Induction and Antiviral Response	6,08E00	4/41 (10%)	TRAF6, IFNG, IFNB1, TNF
Type I Diabetes Mellitus Signaling	6,08E00	5/111 (5%)	TRAF6, IFNG, CD80, CD86, TNF

iNOS Signaling	5,96E00	4/45 (9%)	TRAF6,IFNG,TLR4,CD14
Graft-versus-Host Disease Signaling	5,86E00	4/48 (8%)	IFNG,CD80,CD86,TNF
Role of Cytokines in Mediating Communication between Immune Cells	5,68E00	4/54 (7%)	IFNG,IFNB1,IL13,TNF
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	5,57E00	5/146 (3%)	TRAF6,IFNG,TLR4,CD40LG,TNF
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	5,44E00	4/63 (6%)	TRAF6,IFNB1,IRF3,TNF
IL-10 Signaling	5,3E00	4/69 (6%)	TRAF6,CD14,STAT3,TNF
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	5,09E00	5/187 (3%)	IFNG,TLR4,CD40LG,CD14,TNF
Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F	4,97E00	3/23 (13%)	IFNG,IL13,TNF
Role of JAK1, JAK2 and TYK2 in Interferon Signaling	4,92E00	3/24 (13%)	IFNG,IFNB1,STAT3
Systemic Lupus Erythematosus Signaling	4,73E00	5/227 (2%)	CD40LG,CD80,TLR7,CD86,TNF
Airway Inflammation in Asthma	4,46E00	2/4 (50%)	IL13,TNF
LXR/RXR Activation	4,42E00	4/121 (3%)	TLR4,CD14,IRF3,TNF
IL-6 Signaling	4,33E00	4/128 (3%)	TRAF6,CD14,STAT3,TNF
Phagosome Formation	4,31E00	4/131 (3%)	TLR4,TLR5,TLR6,TLR7
HMGB1 Signaling	4,29E00	4/133 (3%)	IFNG,TLR4,IL13,TNF
Role of Hypercytokinemia/hyperchemokineemia in the Pathogenesis of Influenza	4,24E00	3/43 (7%)	IFNG,IFNB1,TNF
Role of RIG1-like Receptors in Antiviral Innate Immunity	4,22E00	3/44 (7%)	TRAF6,IFNB1,IRF3
Autoimmune Thyroid Disease Signaling	4,12E00	3/48 (6%)	CD40LG,CD80,CD86
Glucocorticoid Receptor Signaling	4	5/339 (1%)	TRAF6,IFNG,STAT3,IL13,TNF
Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza	3,62E00	3/72 (4%)	IFNG,IFNB1,TNF
MSP-ROn Signaling Pathway	3,62E00	3/72 (4%)	IFNG,TLR4,TNF
CD40 Signaling	3,53E00	3/79 (4%)	TRAF6,CD40LG,STAT3
Role of PI3K/AKT Signaling in the Pathogenesis of Influenza	3,53E00	3/79 (4%)	IFNG,IFNB1,IRF3

LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	3,52E00	4/222 (2%)	TRAF6,TLR4,CD14,TNF
Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F	3,22E00	2/18 (11%)	IL13,TNF
Role of Lipids/Lipid Rafts in the Pathogenesis of Influenza	3,01E00	2/23 (9%)	IFNG,IFNB1
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	3	3/123 (2%)	CD40LG,CD80,CD4
Atherosclerosis Signaling	2,96E00	3/127 (2%)	IFNG,CD40LG,TNF
CD28 Signaling in T Helper Cells	2,92E00	3/132 (2%)	CD80,CD4,CD86
IL-15 Production	2,88E00	2/28 (7%)	IFNB1,IRF3
PKC θ Signaling in T Lymphocytes	2,7E00	3/159 (2%)	CD80,CD4,CD86
MIF-mediated Glucocorticoid Regulation	2,7E00	2/35 (6%)	TLR4,CD14
B Cell Development	2,69E00	2/36 (6%)	CD80,CD86
Interferon Signaling	2,69E00	2/36 (6%)	IFNG,IFNB1
Acute Phase Response Signaling	2,66E00	3/170 (2%)	TRAF6,STAT3,TNF
Tec Kinase Signaling	2,66E00	3/170 (2%)	TLR4,STAT3,TNF
MIF Regulation of Innate Immunity	2,56E00	2/43 (5%)	TLR4,CD14
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	2,56E00	3/186 (2%)	CD80,CD4,CD86
IL-9 Signaling	2,54E00	2/45 (4%)	STAT3,TNF
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	2,53E00	3/194 (2%)	IFNG,TLR4,TNF
Primary Immunodeficiency Signaling	2,48E00	2/49 (4%)	CD40LG,CD4
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	2,33E00	2/59 (3%)	CD80,CD86
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	2,32E00	3/233 (1%)	TRAF6,IFNG,TNF
Retinoic acid Mediated Apoptosis Signaling	2,3E00	2/62 (3%)	IFNG,IFNB1
IL-15 Signaling	2,13E00	2/76 (3%)	STAT3,TNF
Role of Wnt/GSK-3 β Signaling in the Pathogenesis of Influenza	2,13E00	2/77 (3%)	IFNG,IFNB1
VDR/RXR Activation	2,13E00	2/78 (3%)	IFNG,CD14
IL-17A Signaling in Airway Cells	2,13E00	2/78 (3%)	TRAF6,STAT3

LPS-stimulated MAPK Signaling	2,04E00	2/87 (2%)	TLR4,CD14
PPAR Signaling	1,97E00	2/95 (2%)	TRAF6,TNF
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	1,94E00	2/99 (2%)	CD80,CD86
Fc Epsilon RI Signaling	1,8E00	2/119 (2%)	IL13,TNF
Gai Signaling	1,8E00	2/120 (2%)	CCR4,STAT3
p38 MAPK Signaling	1,8E00	2/120 (2%)	TRAF6,TNF
Renin-Angiotensin Signaling	1,79E00	2/122 (2%)	STAT3,TNF
Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	1,73E00	1/8 (13%)	TNF
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	1,48E00	2/181 (1%)	CCL3L3,TNF
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	1,43E00	2/193 (1%)	CCL3L3,TNF
3-phosphoinositide Biosynthesis	1,4E00	2/201 (1%)	CD80,CD86
Osteoarthritis Pathway	1,37E00	2/212 (1%)	TLR4,TNF
Inflammasome pathway	1,37E00	1/20 (5%)	TLR4
cAMP-mediated signaling	1,32E00	2/228 (1%)	CCR4,STAT3
IL-22 Signaling	1,3E00	1/24 (4%)	STAT3
Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	1,3E00	2/236 (1%)	CD80,CD86
IL-17A Signaling in Gastric Cells	1,3E00	1/25 (4%)	TNF
Role of JAK family kinases in IL-6-type Cytokine Signaling	1,3E00	1/25 (4%)	STAT3
TNFR2 Signaling	1,23E00	1/30 (3%)	TNF
Protein Ubiquitination Pathway	1,23E00	2/265 (1%)	TRAF6,IFNG
G-Protein Coupled Receptor Signaling	1,2E00	2/277 (1%)	CCR4,STAT3
Oncostatin M Signaling	1,19E00	1/34 (3%)	STAT3
Role of JAK2 in Hormone-like Cytokine Signaling	1,19E00	1/34 (3%)	STAT3
IL-17A Signaling in Fibroblasts	1,18E00	1/35 (3%)	TRAF6
Sirtuin Signaling Pathway	1,17E00	2/292 (1%)	STAT3,TNF
Antigen Presentation Pathway	1,16E00	1/38 (3%)	IFNG
April Mediated Signaling	1,15E00	1/39 (3%)	TRAF6

B Cell Activating Factor Signaling	1,13E00	1/41 (2%)	TRAF6
Role of IL-17F in Allergic Inflammatory Airway Diseases	1,09E00	1/46 (2%)	TRAF6
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	1,08E00	1/48 (2%)	CD4
TNFR1 Signaling	1,06E00	1/50 (2%)	TNF
Transcriptional Regulatory Network in Embryonic Stem Cells	1,03E00	1/54 (2%)	STAT3
Induction of Apoptosis by HIV1	9,87E-01	1/61 (2%)	TNF
CNTF Signaling	9,73E-01	1/64 (2%)	STAT3
PXR/RXR Activation	9,73E-01	1/65 (2%)	TNF
Thrombopoietin Signaling	9,73E-01	1/65 (2%)	STAT3
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	9,71E-01	1/66 (2%)	CD4
Lymphotoxin β Receptor Signaling	9,69E-01	1/67 (1%)	TRAF6
EGF Signaling	9,67E-01	1/68 (1%)	STAT3
ErbB2-ErbB3 Signaling	9,65E-01	1/69 (1%)	STAT3
Role of JAK1 and JAK3 in γ c Cytokine Signaling	9,57E-01	1/71 (1%)	STAT3
Melatonin Signaling	9,55E-01	1/72 (1%)	RORC
GM-CSF Signaling	9,53E-01	1/73 (1%)	STAT3
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	9,32E-01	1/80 (1%)	IFNG
Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes	9,32E-01	1/80 (1%)	CD80
Macropinocytosis Signaling	9,32E-01	1/81 (1%)	CD14
IL-3 Signaling	9,32E-01	1/83 (1%)	STAT3
Prolactin Signaling	9,32E-01	1/83 (1%)	STAT3
JAK/Stat Signaling	9,32E-01	1/83 (1%)	STAT3
IL-17 Signaling	9,32E-01	1/85 (1%)	TRAF6
Growth Hormone Signaling	9,32E-01	1/85 (1%)	STAT3
Small Cell Lung Cancer Signaling	9,32E-01	1/85 (1%)	TRAF6
Leptin Signaling in Obesity	9,32E-01	1/86 (1%)	STAT3
NF- κ B Activation by Viruses	9,32E-01	1/87 (1%)	CD4
FLT3 Signaling in Hematopoietic Progenitor	9,32E-01	1/87 (1%)	STAT3

Cells			
TGF- β Signaling	9,32E-01	1/87 (1%)	TRAF6
Apoptosis Signaling	9,32E-01	1/90 (1%)	TNF
PDGF Signaling	9,32E-01	1/90 (1%)	STAT3
OX40 Signaling Pathway	9,32E-01	1/91 (1%)	CD4
FGF Signaling	9,32E-01	1/91 (1%)	STAT3
IL-7 Signaling Pathway	9,32E-01	1/91 (1%)	IFNG
IL-1 Signaling	9,32E-01	1/92 (1%)	TRAF6
Ceramide Signaling	9,32E-01	1/93 (1%)	TNF
Acute Myeloid Leukemia Signaling	9,32E-01	1/93 (1%)	STAT3
Death Receptor Signaling	9,32E-01	1/93 (1%)	TNF
CCR5 Signaling in Macrophages	9,26E-01	1/95 (1%)	CD4
STAT3 Pathway	9,21E-01	1/97 (1%)	STAT3
Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling	9,1E-01	1/101 (1%)	TNF
PAK Signaling	9,1E-01	1/101 (1%)	TNF
RANK Signaling in Osteoclasts	9,09E-01	1/102 (1%)	TRAF6
Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency	0,9	1/106 (1%)	STAT3
IGF-1 Signaling	0,9	1/106 (1%)	STAT3
Antioxidant Action of Vitamin C	8,95E-01	1/108 (1%)	TNF
T Cell Receptor Signaling	8,95E-01	1/109 (1%)	CD4
HGF Signaling	8,76E-01	1/115 (1%)	STAT3
Neuroprotective Role of THOP1 in Alzheimer's Disease	8,65E-01	1/119 (1%)	IFNG
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	8,64E-01	1/120 (1%)	STAT3
NGF Signaling	8,64E-01	1/121 (1%)	TRAF6
Role of NANOG in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	8,64E-01	1/122 (1%)	STAT3
FXR/RXR Activation	8,53E-01	1/126 (1%)	TNF
PI3K Signaling in B Lymphocytes	8,44E-01	1/130 (1%)	TLR4
14-3-3-mediated Signaling	8,43E-01	1/131 (1%)	TNF
Iron homeostasis signaling pathway	8,4E-01	1/133 (1%)	STAT3

Adipogenesis pathway	8,4E-01	1/134 (1%)	TNF
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	8,22E-01	1/141 (1%)	TNF
Type II Diabetes Mellitus Signaling	7,9E-01	1/154 (1%)	TNF
CXCR4 Signaling	7,65E-01	1/165 (1%)	CD4
Tight Junction Signaling	7,63E-01	1/167 (1%)	TNF
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	7,52E-01	1/173 (1%)	TNF
Ephrin Receptor Signaling	7,5E-01	1/175 (1%)	STAT3
Sertoli Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	7,46E-01	1/178 (1%)	TNF
PPAR α /RXR α Activation	7,44E-01	1/180 (1%)	TRAF6
Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway	7,28E-01	1/189 (1%)	STAT3
Adrenomedullin signaling pathway	7,2E-01	1/194 (1%)	TNF
IL-8 Signaling	7,19E-01	1/197 (1%)	TRAF6
ILK Signaling	7,19E-01	1/197 (1%)	TNF
ERK/MAPK Signaling	7,16E-01	1/200 (1%)	STAT3
Actin Cytoskeleton Signaling	6,69E-01	1/227 (0%)	CD14
Xenobiotic Metabolism Signaling	5,79E-01	1/290 (0%)	TNF

Destques em cinza em vias canônicas com p-valor < 0,001