



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus Araçatuba

EDENILSON DONÁ FRIGERIO

**Alterações histopatológicas em hipófise de cães
naturalmente infectados por *Leishmania infantum* –
Imunomarcacão de amastigotas e de linfócitos TCD3**

Araçatuba

2023

EDENILSON DONÁ FRIGERIO

**Alterações histopatológicas em hipófise de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* –
Imunomarcacão de amastigotas e linfócitos TCD3**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

Orientadora: Prof.^a Adjunto Gisele Fabrino Machado

Araçatuba

2023

F912a	<p>Frigerio, Ednilson Doná</p> <p>Alterações histopatológicas em hipófise de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania infantum</i> – Imunomarcção de amastigotas e linfócitos TCD3 / Ednilson Doná Frigerio. -- Araçatuba, 2023</p> <p>91 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba</p> <p>Orientadora: Gisele Fabrino Machado</p> <p>1. Glândula pituitária. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Histopatologia. 4. Inflamação. 5. Imuno-histoquímica. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Alterações Histopatológicas em Hipófise de Cães Naturalmente Infectados por Leishmania infantum -
Imunomarcção de Amastigotas e de Linfócitos TCD3

AUTOR: EDENILSON DONÁ FRIGERIO

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal,
área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP


Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. CLAUDIA MOMO (Participação Virtual)
Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP

Araçatuba, 24 de janeiro de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Alterações Histopatológicas em Hipófise de Cães Naturalmente Infectados por *Leishmania infantum* -
Imunomarcção de Amastigotas e de Linfócitos TCD3

AUTOR: EDENILSON DONÁ FRIGERIO

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal,
área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE FABRINO MACHADO (Participação Presencial)

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. DANIELA BERNADETE ROZZA (Participação Presencial)

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Profa. Dra. CLAUDIA MOMO (Participação Virtual)

Departamento de Patologia / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP

Araçatuba, 24 de janeiro de 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida que me proporcionou e colocou em meu caminho pessoas maravilhosas que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nessa caminhada.

Aos meus pais Ednilson e Tânia, a minha irmã Jéssica, aos meus avós e tios, que diretamente interferiram nessa jornada, nos momentos bons e nos ruins, dando conselhos e ajuda.

Á todos meus amigos que conviveram ao meu lado nesses últimos anos, trocando conhecimento, apoio e amizade; a minha equipe e time de trabalho do Lapap e CPAV, em especial a Cecilia de Castro Guizelini, minha dupla, aluna e amiga que tive a honra de poder orientar.

Á Profa. Gisele Fabrino Machado, por aceitar em ser minha orientadora em mais uma etapa da minha formação profissional, a qual tenho como exemplo de pessoal e profissional, e pela forma de acolhimento durante essa caminhada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará a vida sem ver nada”

(Albert Einstein)

FRIGERIO, E. D. **Alterações histopatológicas em hipófise de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* – Imunomarcção de amastigotas e linfócitos TCD3**. 2023. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

A hipófise, ou glândula pituitária, é composta pela neuro-hipófise e adeno-hipófise, envolvidas pelo círculo arterial cerebral, é classificada como um órgão endócrino responsável por controlar as funções fisiológicas metabólicas, reprodutoras e de crescimento, auxiliando na manutenção da homeostase. A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, normalmente observados no interior das células do sistema mononuclear fagocitário e disseminado no organismo do hospedeiro. Ocasionalmente são observados sinais clínicos neurológicos, lesões inflamatórias e complicações vasculares no sistema nervoso central (SNC) de cães infectados, cuja patogênese não é totalmente compreendida. Esta revisão tem como objetivo descrever as características morfológicas e funções da hipófise, e os efeitos da leishmaniose visceral e de outras doenças sistêmicas que podem causar disfunção da glândula. Para isso foi realizada a análise e comparação de livros e artigos científicos sobre as infecções de *Leishmania infantum* (*Chagas*), alterações hipofisárias e endócrinas, publicados nas bases de dados informatizadas PubMed, LILACS, SciELO, Google Scholar e no Portal de Periódicos da CAPES em língua inglesa no período de 1976 a 2022. A hipófise apresenta função chave para a homeostase do organismo, e alterações inflamatórias nesta glândula podem influenciar em sua atividade endócrina. Conclui-se que a presença de inflamação na hipófise pode levar a uma disfunção, acarretando em distúrbios fisiológicos, e que isso precisa ser melhor investigado em cães infectados por *Leishmania* spp., uma vez que já foram observadas mudanças nas concentrações de hormônios e suas interferências no organismo, em paciente humano e em hamster como modelo experimental.

Palavras-chave: Glândula pituitária. Leishmaniose Visceral. Histopatologia. Inflamação. Imuno-histoquímica.

FRIGERIO, E. D. **Histopathological changes in pituitary glands of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* - Immunolabeling of amastigotes and TCD3 lymphocytes.** 2023. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The hypophysis, or pituitary gland, is composed of the neurohypophysis and the adenohypophysis, surrounded by the cerebral arterial circle, and is classified as an endocrine organ responsible for controlling the physiological metabolic, reproductive, and growth functions, helping to maintain homeostasis. Canine Visceral Leishmaniasis (CanL) is caused by the protozoan *Leishmania infantum*, normally observed within the cells of the mononuclear phagocytic system and disseminated in the host organism. Occasionally neurological clinical signs, inflammatory lesions, and vascular complications are observed in the central nervous system (CNS) of infected dogs, the pathogenesis of which is not totally understood. This review aims to describe the morphological characteristics and functions of the pituitary gland, and the effects of visceral leishmaniasis and other systemic diseases that can cause dysfunction of the gland. This was done by analyzing and comparing books and scientific articles about *Leishmania infantum* (*Chagasi*) infections, pituitary and endocrine changes, published in the computerized databases PubMed, LILACS, SciELO, Google Scholar, and the CAPES Periodical Portal in English from 1976 to 2022. The pituitary gland has a key function for the homeostasis of the organism, and inflammatory alterations in this gland may influence its endocrine activity. We conclude that the presence of inflammation in the pituitary gland may lead to dysfunction, resulting in physiological disorders, and that it needs to be better investigated in dogs infected by *Leishmania* spp., since changes in the concentrations of hormones and their interference in the body have already been observed in human patients and in hamsters as experimental models.

Keywords: Pituitary gland. Visceral leishmaniasis. Histopathology. Inflammation. Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
ADH	hormônio antidiurético
AP	área postrema
BHE	barreira hematoencefálica
CRH	hormônio liberador de corticotrofina
CVO	órgão circunventricular
CVOs	órgãos circunventriculares
EM	eminência mediana
FSH	hormônio estimulador de folículos
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
GH	hormônio do crescimento
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofina
GRF	fator de liberação de somatotrofina
HE	hematoxilina e eosina
HPF	high-power field
IFN- γ	interferon gama
IHQ	imuno-histoquímica
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-2	interleucina 2
IL-6	interleucina 6
LCR	líquido cefalorraquidiano
LH	hormônio luteinizante
LV	leishmaniose visceral
LVC	leishmaniose visceral canina
MSH	hormônio estimulador de melanócitos
MSHRF	fator de liberação de melanocortina
NO	óxido nítrico
OVLT	organum vasculosum da lâmina terminal
PBA	punção biopsia aspirativa
PBS	tampão fosfato-salino

PIF	fator de inibição de prolactina
ROS	espécies reativas de oxigênio
SCO	órgão subcomisural
SFO	órgão subfornical
SNC	sistema nervoso central
SST	somatostatina
T ₃	triiodotironina
T ₄	tiroxina
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
Th1	linfócitos T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 1
Th2	linfócitos T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 2
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
TRH	hormônio liberador de tireotrofina
TSH	hormônio tireoestimulante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1 Características hipofisárias gerais.....	13
1.2 Estrutura histológica hipofisária.....	16
1.3 Vascularização da hipófise	17
1.4 Papel dos órgãos Circunventriculares (CVOs)	20
1.5 Fisiologia hipofisária	22
1.5.1 Adeno-hipófise	22
1.5.2 Neuro-hipófise	23
1.6 Leishmaniose Visceral	24
1.6.1 Manifestações clínicas	26
1.6.2 Alterações no sistema nervoso central.....	27
1.6.3 Patogenia das lesões no encéfalo e permeabilidade das barreiras encefálicas	28
1.7 Alterações na hipófise durante doenças sistêmicas.....	29
1.7.1 Alterações na hipófise durante a leishmaniose	31
1.8 Justificativa.....	33
1.9 Objetivos	33
2 CAPÍTULO 1- HIPOFISITE LINFOCÍTICA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL.....	34
2.1 Resumo	34
2.2 Abstract	35
3 INTRODUÇÃO	36
3.1 Material e Métodos.....	38
3.1.1 Ética	38
3.1.2 Animais.....	38
3.1.3 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral.....	39
3.1.4 Delineamento experimental.....	39
3.1.5 Colheita do material.....	39
3.1.6 Imuno-histoquímica	40
3.1.7 Análise histopatológica e imuno-histoquímica	41
3.1.8 Análise estatística	42
3.2 Resultados	43
3.2.1 Detecção imuno-histoquímica de <i>L. infantum</i>	43
3.2.2 Estadiamento clínico	44
3.2.3 Caracterização histopatológica	44
3.2.4 Imunomarcagem para linfócitos TCD3 ⁺	47

3.3 Discussão.....	51
3.4 Conclusão	54
3.5 Informações de Apoio.....	55
3.6 Referências	55
APÊNDICE A - REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	64
APÊNDICE B - FIGURAS E TABELA SUPLEMENTARES	74
ANEXO A - COMISSÃO DE ÉTICA	79
ANEXO B - NORMAS DE SUBMISSÃO	80

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leishmaniose visceral é uma doença crônica e multissistêmica com apresentações clínicas variadas, cuja evolução depende diretamente da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro e dos órgãos acometidos (BANETH *et al.*, 2008). Em cães, o desenvolvimento de uma resposta imune celular Th1 é determinante para o controle e eliminação do parasita, enquanto que o desenvolvimento de resposta imune humoral Th2 é associado a suscetibilidade a infecção (HOSEIN *et al.*, 2017).

A etiopatogenia dos sinais clínicos está relacionada a formação e deposição de imunocomplexos, a presença do parasita associado à infiltrado inflamatório granulomatoso em diversos órgãos e ao desenvolvimento de autoanticorpos, o que explica a variabilidade de apresentações da doença (BANETH *et al.*, 2008). A ativação do sistema imune inato e adaptativo em resposta à infecção promove a produção de uma série de citocinas inflamatórias que refletem não só no tipo de resposta imune a ser desenvolvida, mas também na modulação de circuitos neuroendócrinos, que são diretamente relacionados a resposta imunológica (BOTASSO; MORALES-MONTOR, 2009).

A hipófise é um órgão neuroendócrino responsável pela interface na comunicação entre o hipotálamo e glândulas endócrinas periféricas, cuja regulação é essencial para a manutenção da homeostase dos organismos em situações fisiológicas e patológicas (PEREZ-CASTRO *et al.*, 2012). Não existem estudos avaliando alterações na hipófise durante a leishmaniose visceral canina, no entanto, existem evidências de que a doença pode promover distúrbios hormonais relacionados a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando em um aumento do cortisol sérico em animais infectados, que pode estar associado a uma progressão desfavorável da doença (BARROS-GONÇALVES *et al.*, 2021).

1.1 Características hipofisárias gerais

A hipófise ou glândula pituitária é um órgão neuroendócrino, responsável pela produção e secreção de hormônios que atuam regulando o funcionamento de outras glândulas endócrinas, fundamentais para a homeostase do organismo (POLLEDO *et al.*, 2018).

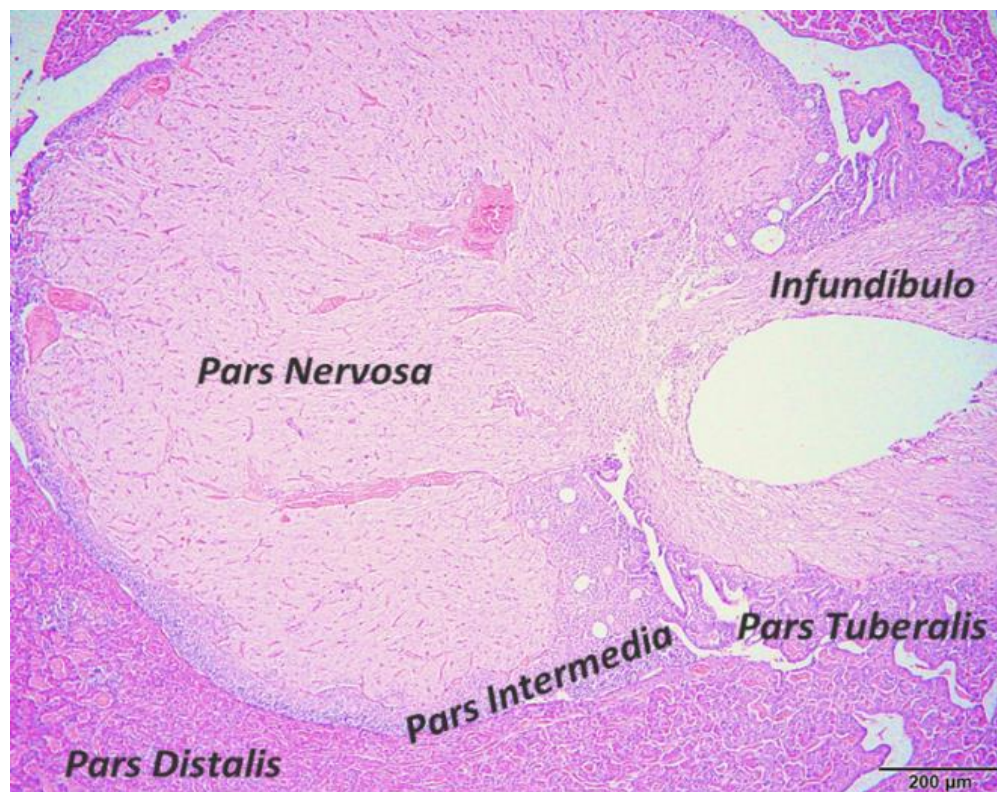
Localiza-se no processo ventral do assoalho do diencéfalo, na face superior do osso basisfenóide, em uma região chamada de fossa pituitária ou *sela túrcica*, logo abaixo do quiasma óptico e adjacente ao corpo mamilar (DANIEL, 1976; HONG; PAYNE; JANE JR, 2016). O teto e a base da fossa pituitária são delimitados por duas camadas de dura-máter, uma interna e outra externa, que formam o diafragma da *sela túrcica* e se conectam ao perióstio e a cápsula da glândula (VAN DER VLUGT-MEIJER; VOORHOUT; MEIJ, 2002). Na porção ventrolateral ao diafragma, circundando a hipófise, estão localizadas as veias dos seios cavernosos e a *rete mirabilis* carotídea (AIYAN *et al.*, 2019). O espaço subaracnóide recobre a parte dorsal da hipófise (VAN DER VLUGT-MEIJER; VOORHOUT; MEIJ, 2002).

Em cães adultos, a glândula pituitária é redonda, bilobada e seu tamanho varia individualmente e de acordo com a raça, sexo e peso do animal (KIPPENES *et al.*, 2001; VAN DER VLUGT-MEIJER; VOORHOUT; MEIJ, 2002).

A hipófise possui origem embriológica dupla, sendo subdividida em adeno-hipófise, de origem ectodermal, e em neuro-hipófise, originada do neuroectoderma, cada qual possuindo características histológicas e fisiológicas próprias e distintas (AMAR; WEISS, 2003).

A adeno-hipófise não tem conexão anatômica direta com o tecido nervoso e é subdividida em outras três porções: *pars distalis*, *pars tuberalis* e *pars intermedia* (HONG; PAYNE; JANE JR, 2016) (Figura 1). O lobo anterior da glândula hipófise é composto exclusivamente pela *pars distalis*, cuja origem embriológica remete ao tecido epitelial que compõe a orofaringe primitiva (Bolsa de Rathke).

Figura 1- Fotomicrografia da divisão histológica das regiões da hipófise. Bar= 200µm



Fonte: Elaborado pelo autor.

A neuro-hipófise é composta pela *pars nervosa* e se desenvolve a partir de um crescimento descendente da base do diencefalo, mantendo continuidade com o sistema nervoso através de um pedículo chamado *infundíbulo* (DANIEL, 1976), o qual conecta a neuro-hipófise ao hipotálamo, permitindo a passagem de hormônios hipotalâmicos através do sistema porta-hipofisário e/ou do trato hipotálamo-hipofisário (VAN DER VLUGT-MEIJER; VOORHOUT; MEIJ, 2002). Junto a *pars intermedia*, região intermediária entre adeno-hipófise e a neuro-hipófise, separadas por uma fissura na bolsa de Rathke, compõem o lobo posterior da glândula (AMAR; WEISS, 2003). Durante o desenvolvimento embriológico, a bolsa epitelial oral avança circundando a evaginação neural, formando uma dupla camada que dá origem a hipófise (AMAR; WEISS, 2003).

A haste hipofisária conecta os lobos anterior e posterior na região da eminência mediana do hipotálamo, sendo composta pelo *infundíbulo* e *pars tuberalis* da adeno-hipófise, que se localiza ao redor do mesmo (DANIEL, 1976).

1.2 Estrutura histológica hipofisária

Histologicamente a hipófise é revestida por uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo e preenchida por uma rede de fibras reticulares que oferece suporte as células da glândula. Como todos os tecidos endócrinos, possui estroma esparso e altamente vascularizado, visando sustentar a intensa atividade metabólica do parênquima (ALRAHMAN; SHEHAN; SAUD, 2022).

A *pars distalis* da adeno-hipófise é constituída por cordões e ilhas de células epiteliais secretoras cuboidais que produzem hormônios que são armazenados em grânulos de secreção, para posteriormente serem liberados no interstício (ALRAHMAN; SHEHAN; SAUD, 2022). As células epiteliais glândulares são permeadas pelas células foliculo-estelares, cuja função não é bem determinada (HIGASHI *et al.*, 2021).

As células foliculo-estelares têm morfologia em forma de estrela e são conectadas umas às outras, formando uma rede que recobre a superfície luminal da fenda intraglandular. Podem ainda se aglomerar através de desmossomos, formando folículos que contém colóide em seu interior (HIGASHI *et al.*, 2021). Acredita-se que as células foliculo-estelares estejam envolvidas em diversos processos fisiológicos na hipófise, como na eliminação de resíduos, transporte de nutrientes, comunicação eletrofisiológica e suporte mecânico às células epiteliais secretoras (HIGASHI *et al.*, 2021).

Na coloração de hematoxilina-eosina, as células epiteliais secretoras podem ser classificadas em cromofóbas e cromófilas acidófilas ou basófilas, de acordo com sua afinidade com o corante (ALRAHMAN; SHEHAN; SAUD, 2022). As células acidófilas são as somatotrópicas e lactotrópicas, responsáveis por produzir o hormônio do crescimento (GH) e a prolactina, respectivamente. As células basófilas são as tireotróficas, corticotróficas e gonadotróficas, responsáveis pela produção dos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH), tireotrofina (TSH), hormônio estimulador de folículos (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (AMAR; WEISS, 2003). A determinação do tipo celular específico e seu produto de secreção não é possível através das colorações histológicas de rotina, sendo necessário a utilização de técnicas como a imuno-histoquímica para sua avaliação. As células cromofóbas não possuem

afinidade com corantes e podem ser células que degranularam ou células que ainda vão se diferenciar (VALA *et al.*, 2013).

A *pars intermedia* é caracterizada histologicamente por apresentar células epiteliais secretoras basófilas menores que as da *pars distalis*, difusamente distribuídas (ALRAHMAN; SHEHAN; SAUD, 2022) e que produzem o hormônio estimulador de melanócitos (MSH) e lipotropinas (VALA *et al.*, 2013).

A *pars tuberalis* é composta por células cuboidais fracamente basofílicas arranjadas em cordões, cuja função não é bem determinada (VALA *et al.*, 2013).

A neuro-hipófise é formada por axônios não mielinizados associados a pituícitos, um tipo específico de célula da glia que apresenta múltiplos prolongamentos, responsáveis por oferecer suporte às fibras nervosas. Os corpos celulares dos axônios localizados na neuro-hipófise têm origem nos núcleos supraópticos e paraventriculares do hipotálamo (AMAR; WEISS, 2003). O hipotálamo possui neurônios secretores caracterizados por possuírem corpos de Nissl muito desenvolvidos, resultando em habilidade secretora (PEREZ-CASTRO, 2012). A ocitocina é sintetizada pelos corpos celulares neuronais do núcleo paraventricular do hipotálamo, enquanto o hormônio antidiurético (ADH) é sintetizado nos corpos celulares neuronais do núcleo supraóptico. Ambos os hormônios são conjugados com sua proteína carreadora derivada de pró-hormônios (neurofisina) e são transportados em vesículas de secreção através dos axônios, passando pelo *infundíbulo* e acumulando-se na extremidade terminal axônica na *pars nervosa* (AMAR; WEISS, 2003). Os acúmulos intracelulares de secreção podem formar depósitos distinguíveis na histologia, denominados corpúsculos de Hering. Por fim, os hormônios são liberados por exocitose para adentrar nos capilares sanguíneos fenestrados abundantes na região, chegando à circulação sistêmica (AMAR; WEISS, 2003).

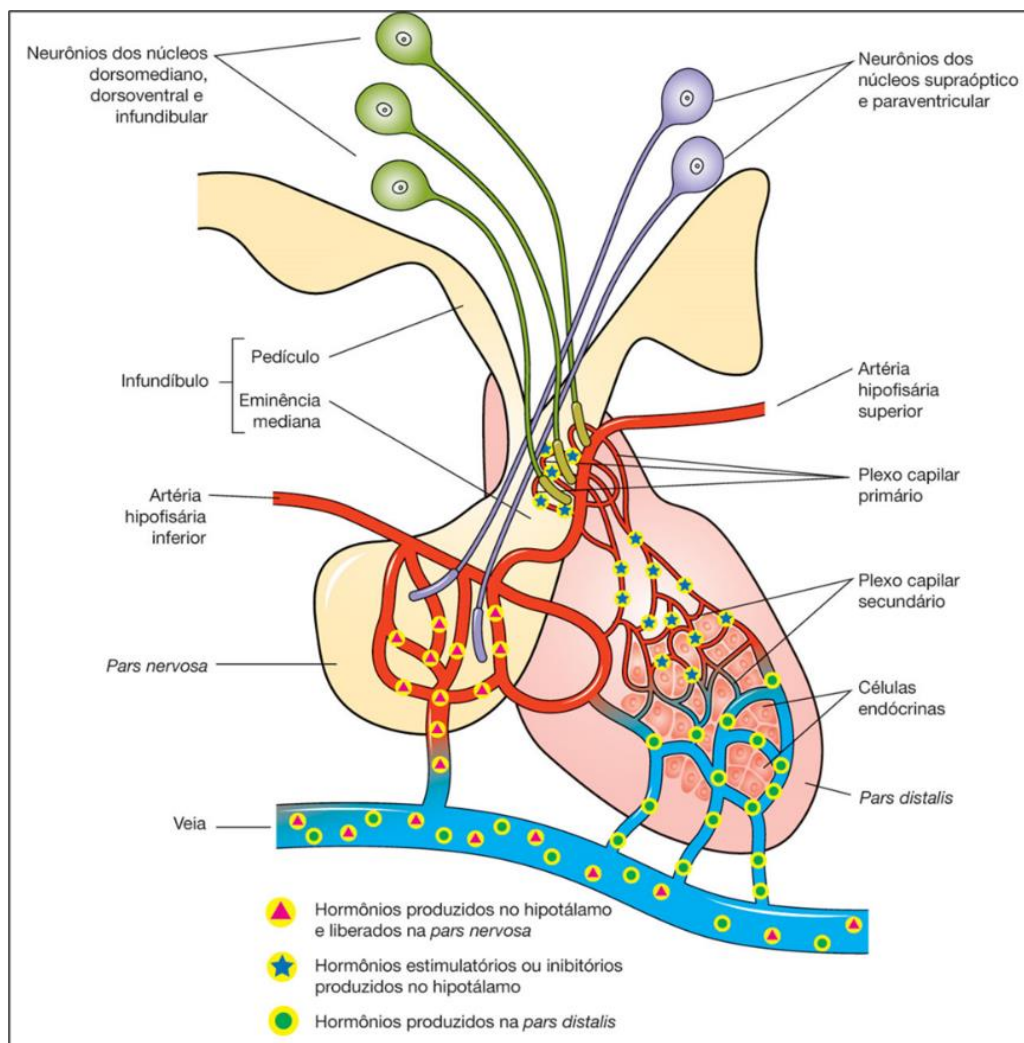
1.3 Vascularização da hipófise

O suprimento vascular da glândula pituitária ocorre a partir da artéria carótida interna caudal e rostral, que formam um círculo arterial ao redor da hipófise, localizado no espaço subaracnoide (EVANS, 1993; FLETCHER, 1993). No cão, este círculo é suprido por meio da artéria basilar e do sistema arterial carotídeo, que é formado por uma série de artérias aferentes anastomosadas que acumulam sangue em uma rede

denominada *rete mirabilis*, considerada a principal fornecedora de sangue ao círculo de Willis (AIYAN *et al.*, 2019; BAKER, 1979). A *rete mirabilis* é um sistema responsável pelo acúmulo e reserva de sangue, redução da pressão sanguínea encefálica nas artérias aferentes e redução da temperatura do sangue que atinge o encéfalo (BAKER, 1979; KIELTYKA-KURC; FRACKOWIAK; BRUDNICKI, 2015; ZGUIGAL, 1988).

A partir da artéria carótida interna caudal, ramifica-se a artéria hipofisária superior, responsável por suprir o lobo anterior da hipófise e o pedúnculo hipofisário (Figura 2) (VAN DER VLUGT-MEIJER; VOORHOUT; MEIJ, 2002). Da porção medial da artéria hipofisária superior saem múltiplas pequenas artérias, que se anastomosam e formam um plexo primário de capilares fenestrados, localizado na eminência mediana e porção superior do pedúnculo hipofisário (AMAR; WEISS, 2003). Este plexo primário é fundamental, pois a eminência mediana recebe as terminações das células hipotalâmicas, que produzem fatores envolvidos no controle da função adeno-hipofisária (PEREZ-CASTRO, 2012). Assim, os capilares do plexo convergem em vênulas, formando as veias hipofisárias portais, que percorrem do pedúnculo para a *pars distalis*, onde se origina um segundo plexo de capilares sinusóides, responsável pela difusão dos fatores reguladores hipotalâmicos. Os capilares se reconstituem em veias hipofisárias laterais eferentes, que drenam para os seios cavernosos (AMAR; WEISS, 2003). O fluxo pode ser inverso, de forma que os hormônios liberados pela adeno-hipófise refluem para a eminência mediana. Este sistema é chamado sistema porta-hipofisário e garante a modulação hipotalâmica da produção de hormônios pelas células epiteliais hipofisárias, por meio de feedback (PEREZ-CASTRO, 2012).

Figura 2- Vascularização do eixo hipotálamo-hipofisário, e locais de produção, transporte, armazenamento e liberação dos hormônios



Fonte: JUNQUEIRA; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2017

O lobo posterior é irrigado pela artéria hipofisária inferior, que se origina de um ramo cavernoso do tronco meningo-hipofisário, que é um ramo da artéria carótida interna rostral (AMAR; WEISS, 2003). A artéria hipofisária inferior se forma abaixo do diafragma da *sela túrcica*, fluindo para o sulco entre a *pars distalis* e *pars nervosa*, dividindo-se em ramos ascendentes e descendentes que suprem toda a *pars nervosa*, recebendo os hormônios liberados nos terminais axônicos. A drenagem venosa do lobo posterior também é feita para os seios cavernosos, culminando na veia jugular interna (PEREZ-CASTRO, 2012).

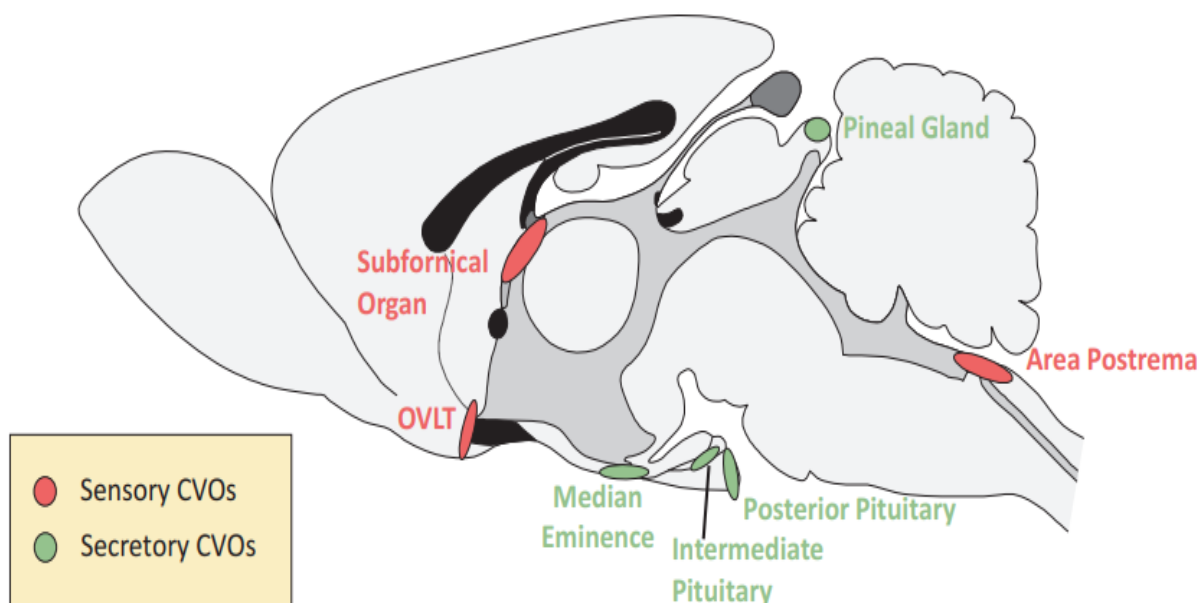
1.4 Papel dos órgãos Circunventriculares (CVOs)

Existem quatro formas principais pelas quais a comunicação entre o sistema imune e o SNC é possibilitada: pelo transporte por meio da BHE, pela síntese e secreção de substâncias por células endoteliais vasculares, pelos nervos vagal e simpático, e pela estimulação dos órgãos circunventriculares (CVOs) (KELLEY; SHIMADA, 2020), os quais são compartimentos do SNC posicionados próximos ao terceiro e quarto ventrículos, cuja presença é essencial para que haja comunicação entre este sistema e a circulação sanguínea. Os CVOs são estruturas intensamente vascularizadas, com funções homeostáticas e neurosecretoras, desprovidas de BHE, uma vez que possuem endotélio sem zônulas de oclusão e por isso, a vasculatura é fenestrada, e apresentam núcleos secretores e integrativos no hipotálamo e no tronco encefálico envolvidos na regulação imunológica (BLACK; CANCELLIERE; FERGUSON, 2017; JOHNSON; GROSS, 1993). Devido à sua estrutura, os CVOs são suscetíveis à exposição de componentes presentes na circulação, tais como citocinas, endotoxinas e patógenos, representando um ponto de acesso que influencia diretamente o SNC, sendo capazes de atuar na iniciação e modulação da inflamação local, com possível elevada vigilância de células T para manter tais compartimentos livres de infecções (BENTIVOGLIO; KRISTENSSON; ROTTENBERG, 2018; BLACK; CANCELLIERE; FERGUSON, 2017; MASTORAKOS; MCGAVERN, 2019).

Os CVOs possuem divisões e são classificados como sensoriais ou secretores (Figura 3). Os sensoriais compreendem o órgão subfornical (SFO), a área postrema (AP) e o organum vasculosum da lâmina terminal (OVLT), conhecidos por transmitirem informações sobre a circulação periférica ao SNC. Já os secretores compreendem a glândula pineal, o órgão subcomisural (SCO), a eminência mediana (EM) e a neuro-hipófise, os quais secretam substâncias diretamente na circulação (BLACK; CANCELLIERE; FERGUSON, 2017; MORITA *et al.*, 2016). Os CVOs sensoriais são compostos estruturalmente por neurônios, células da glia, células endimárias, astrócitos, micróglia, macrófagos e oligodendrócitos (DELLMAN, 1998). Dentre esses, destaca-se a atuação de astrócitos GFAP positivos presentes no SFO, que expressam aquaporina-4 e endotelina, ambas envolvidas no processo de inflamação e disfunção da BHE, respectivamente (LI *et al.*, 2011; LO *et al.*, 2005; PÓCSAI; KÁLMÁN, 2015). Além disso, já foram relatadas conexões para o SNC por

meio de inervações do SFO e por entradas multissinápticas entre OVLT e AP (KROUT *et al.*, 2002).

Figura 3 - Localização anatômicas dos órgãos circumventriculares sensoriais (sensory CVOs) e secretórios (secretory CVOs), representado em corte médio-sagital do cérebro de rato



Legenda: Area prostema (área postrema), intermediate pituitary (*pars intermedia*), median eminence (eminência mediana), OVLT (organum vasculosum da lâmina terminal), pineal gland (glândula pineal), posterior pituitary (neuro-hipófise) e subfornical organ (órgão subfornical)

Fonte: BLACK; CANCELLIERE; FERGUSON, 2017

Todos os CVOs possuem micróglia e macrófagos no parênquima e nos espaços perivasculares, os quais são responsáveis pela expressão de MHC de classes I e II, sugerindo a capacidade destas células na apresentação de antígenos aos linfócitos T e servindo como primeira linha de defesa contra patógenos invasores (KAUR; LING, 2017). A EM é uma estrutura fundamental para a comunicação entre os sistemas neurais e endócrinos, localizada na base do hipotálamo, acima da haste hipofisária, e que através desta, faz conexão com a neuro-hipófise (KAUR; LING, 2017). A neuro-hipófise possui pericitos, fibroblastos e mastócitos nos espaços perivasculares (SEYAMA; PEARL; TAKEI, 1980), além de células semelhantes à glia chamadas pituícitos, as quais se localizam em contato íntimo com o espaço perivascular dos capilares e possui natureza astrocítica caracterizada pela expressão de marcadores específicos de astrócitos (GFAP) envolvidos no controle da secreção neuro-hipofisária (HATTON, 1988; REDECKER, 1987; WITTKOWSKI, 1998). Neste

CVO secretor também há micróglia e macrófagos próximos aos capilares, capazes de influenciar a vasculatura neuro-hipofisária (POW *et al.*, 1989).

Considerando que os CVOs não possuem barreiras efetivas e permitem o contato entre o sangue e o líquido cefalorraquidiano, facilitando a comunicação entre o sistema nervoso central, o sangue periférico e a resposta imune periférica, nossa hipótese é de que o acometimento destas regiões pode contribuir para os mecanismos desencadeantes das lesões observadas no encéfalo dos animais, quer pela ação direta do parasito ou pela produção local de mediadores inflamatórios.

1.5 Fisiologia hipofisária

1.5.1 Adeno-hipófise

A secreção hormonal pela adeno-hipófise é um processo regulado por mecanismos dinâmicos, que envolvem fatores estimulantes e inibitórios hipotalâmicos e sinais de feedback derivados de órgãos-alvo periféricos. Esses fatores ainda interagem com a regulação parácrina e autócrina da glândula, induzindo assim a resposta transcricional, tradução e secreção de hormônios (PEREZ-CASTRO, 2012).

Os hormônios produzidos pela adeno-hipófise são liberados para a circulação sistêmica e órgãos-alvo em “pulsos” a partir do estímulo hipotalâmico. A frequência dos pulsos associada a dificuldade da depuração metabólica determina a manutenção dos picos plasmáticos (AMAR; WEISS, 2003).

Os fatores de regulação produzidos pelo hipotálamo chegam na adeno-hipófise através do sistema porta-hipofisário, controlando a produção de hormônios pelas células epiteliais secretoras especializadas (HONG; PAYNE; JANE JR, 2016). Entre os fatores de regulação hipotalâmicos, incluem-se: o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH); hormônio liberador de tireotrofina (TRH); hormônio liberador de corticotrofina (CRH); fator de liberação de somatotrofina (GRF); somatostatina (SST); fator de inibição de prolactina (PIF); fator de liberação de melanocortina (MSHRF), entre muitos outros peptídeos (AMAR; WEISS, 2003; PEREZ-CASTRO, 2012).

Em síntese, as células somatróficas constituem de 40% a 50% da população de células secretoras da adeno-hipófise, sendo responsáveis pela produção de GH,

hormônio relacionado principalmente ao estímulo do crescimento das epífises ósseas (VALA *et al.*, 2003). Reguladores da síntese de GH incluem múltiplos fatores que interagem com a produção de GnRH, incluindo as concentrações de hormônios tireoidianos, glicocorticóides, grelina e insulina na circulação sistêmica (PEREZ-CASTRO, 2012).

As células tireotróficas são responsáveis pela produção de TSH, uma glicoproteína cuja ligação em seu receptor nas células da tireoide promove a síntese de triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄) (VALA *et al.*, 2003). Mecanismos inibidores da produção de TSH incluem as somatostatinas e principalmente a relação de feedback com os hormônios tireoidianos (AMAR; WEISS, 2003).

As células corticotróficas são responsáveis pela produção de corticotropina (ACTH), que age regulando a liberação de glicocorticóides e aldosterona pela glândula adrenal (AMAR; WEISS, 2003). Alterações fisiológicas como o estresse e injúria produzem impulsos aferentes que estimulam a produção de CRH e ACTH, enquanto o aumento de glicocorticóides na circulação promove o bloqueio da sua produção em nível hipotalâmico e hipofisário (PEREZ-CASTRO, 2012).

As células lactotróficas são responsáveis pela produção de prolactina, hormônio relacionado principalmente ao desenvolvimento da glândula mamária e lactação. Sua regulação envolve múltiplos fatores, incluindo uma íntima relação com as células gonadotróficas, que produzem LH e FSH, visto que estas estão associadas a hormônios gonadais como estradiol, testosterona, progesterona e inibina (PEREZ-CASTRO, 2012).

1.5.2 Neuro-hipófise

A neuro-hipófise tem como principal função o armazenamento e secreção de ocitocina e hormônio antidiurético (ADH), que são sintetizados nos corpos celulares neuronais dos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo, respectivamente (AMAR; WEISS, 2003). Este sistema de integração neuroendócrino é denominado eixo hipotalâmico-hipofisário.

A ocitocina e o ADH são liberados no hipotálamo como pró-hormônios, sendo dependentes de proteínas carreadoras co-secretadas denominadas neurofisinas. As

neurofisinas atuam no processamento pós-traducional dos hormônios e no seu transporte em vesículas através dos axônios (AMAR; WEISS, 2003).

Os hormônios são liberados nos terminais axônicos através de exocitose, em resposta a potenciais de ação dependentes de cálcio que atingem suas terminações nervosas (AMAR; WEISS, 2003). Os terminais axônicos da neuro-hipófise estão intimamente relacionados a capilares sanguíneos fenestrados, facilitando a difusão dos mesmos para circulação sistêmica (HONG; PAYNE; JANE JR, 2016).

A ocitocina é um hormônio cujos principais alvos de ação são a glândula mamária e o útero, nos quais promove estímulos contráteis nas células mioepiteliais e musculatura lisa uterina (PEREZ-CASTRO, 2012). A vasopressina ou hormônio antidiurético (ADH) atua em receptores acoplados à proteína G que promovem a formação de segundos mensageiros em resposta à ligação. Esses receptores estão localizados nas células dos ductos coletores renais, endotélio e musculatura lisa vascular, principalmente (HONG; PAYNE; JANE JR, 2016).

Nos túbulos renais, o ADH atua aumentando a permeabilidade dos ductos, de forma a permitir que a água penetre no interstício hipertônico da pirâmide renal, diminuindo o volume final de urina e conseqüentemente aumentando sua concentração. Esse mecanismo é ativado e útil em uma série de situações relacionadas a diminuição do volume plasmático circulante e/ou aumento da pressão osmótica, afetando diretamente a pressão arterial sistêmica, na qual também atua através da promoção da vasoconstrição (AMAR; WEISS, 2003). A vasopressina também atua de forma parácrina em receptores específicos localizados na hipófise anterior, que promovem o aumento da produção de corticotropina (PEREZ-CASTRO, 2012).

1.6 Leishmaniose Visceral

As leishmanioses são doenças de caráter zoonótico, amplamente distribuídas pelos continentes, cujos transmissores apresentam vasta disseminação em regiões tropicais e em zonas temperadas, afetando humanos e animais domésticos e silvestres (DESJEUX, 1992). Tem como agente etiológico os protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastidae*, família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania* (LAINSON; SHAW, 1987), os quais são transmitidos por fêmeas de

dípteros do gênero *Lutzomyia*, popularmente conhecidos como “mosquito-palha” (DESJEUX, 1992; GRIMALDI; TESH; McMAHON-PRATT, 1989) que albergam a forma promastigota de *Leishmania* spp. em seu organismo. A transmissão das formas promastigotas no hospedeiro vertebrado ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor infectado (LAINSON; SHAW, 1987).

Conforme dados emitidos pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 2020), em 2019 o Brasil se enquadrava como o país com a maior taxa de letalidade dentre os cinco países que apresentaram os maiores números de casos de leishmaniose em humanos, demonstrando o impacto desta doença na saúde pública. Por este aspecto, levando em consideração os reservatórios naturais da mesma, os cães têm a maior importância epidemiológica no âmbito doméstico, pois atuam como a fonte de infecção que apresenta maior proximidade com humanos (BRASIL, 2002).

O agente causador da leishmaniose visceral canina (LVC) no Brasil, listada como uma das doenças tropicais mais letais e negligenciadas do mundo (OMS, 2010), é o protozoário *Leishmania infantum*, anteriormente denominado *Leishmania chagasi* (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000). O acompanhamento da infecção causada por este protozoário nas populações canina e humana é dificultado devido subnotificação da doença e de casos subclínicos (SHIMOZAKO; WU; MASSAD, 2017), os quais podem chegar à margem de 40 a 60% dos cães infectados (BRASIL, 2014). Em um estudo realizado a partir de dados do município de Araçatuba, estado de São Paulo, foi demonstrado que a introdução e manutenção da LVC estão interligadas aos flebotomíneos presentes na região e aos cães latentes e clinicamente enfermos, com destaque para os primeiros, uma vez que por estarem aparentemente saudáveis, atuam como fonte de infecção contribuindo para o aumento de animais e humanos infectados (SHIMOZAKO; WU; MASSAD, 2017).

Os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* sp, ao picarem um hospedeiro vertebrado infectado por *L. infantum*, ingerem macrófagos parasitados pelo protozoário na forma amastigota, a qual é transformada em promastigota no tubo digestivo destes vetores, possibilitando a transmissão para outros hospedeiros suscetíveis (NOLI, 1999). As formas promastigotas são inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo, sendo fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário, onde perdem o flagelo e se transformam em amastigotas, que por sua vez iniciam um processo intenso de divisão binária com posterior ruptura dessas células e liberação dos protozoários na circulação, os quais

serão fagocitados novamente ou ingeridos pelo vetor (LAINSON; SHAW, 1987). Dessa forma, as amastigotas são capazes de infectar sistemicamente o organismo do hospedeiro, sendo encontrados nos macrófagos e em outras células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente dos órgãos hemolinfáticos, como medula óssea, linfonodos e baço (TAYLOR; COOP; WALL, 2007).

1.6.1 Manifestações clínicas

É reconhecida a diversidade de tropismo de *L. infantum*, o qual permite o desenvolvimento de diversas manifestações clínicas nos hospedeiros (DEDET; PRATLONG, 2009), uma vez que a gravidade de tais sinais está diretamente relacionada com a resposta imunológica do animal. Animais resistentes desencadeiam respostas imunes eficazes por células Th1 pró-inflamatórias, com produção de interleucina-12 (IL-12) e interferon-gama (IFN- γ), além de promover a ativação de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio dos macrófagos. Os cães suscetíveis, por sua vez, produzem resposta Th2, com alta produção de anticorpos e de IgG, associados à superprodução de interleucina-10 (IL-10), em detrimento da produção de IFN- γ e da resposta de células T CD4+, o que leva à progressão da doença (BOGGIATTO *et al.*, 2010; MÜLLER *et al.*, 1989; TIZARD, 2014).

A princípio, a infecção é inaparente; à medida que evolui, podem ser observados sinais clínicos que incluem febre, perda de peso, anemia, poliúria, polidipsia, vômito, hepatomegalia, atrofia muscular generalizada, dermatopatias, como ulceração nas pinas e no nariz, epistaxe e onicogribose. Além disso, a proliferação celular de linfócitos B, citada anteriormente, resulta em linfadenomegalia, esplenomegalia e hiperglobulinemia, levando à formação e deposição de imunocomplexos nas paredes dos vasos sanguíneos, os quais podem acarretar em vasculite, poliartrite, uveíte, glomerulonefrite e no acometimento do sistema nervoso (BANETH, 2006).

Ocasionalmente, manifestações clínicas neurológicas e lesões no sistema nervoso central (SNC) são observadas em cães com LVC. Em estudos, foram relatadas alterações que demonstraram envolvimento do SNC, como telencéfalo, tronco encefálico, cerebelo e nervos cranianos, em cães positivos para a doença, os

quais apresentaram sinais clínicos de alterações no movimento, como incoordenação motora, hipermetria, quedas, tremores de intenção, mioclonia, andar em círculos, episódios de perseguição à cauda, monoparesia, paraparesia, tetraparesia e tetraplegia, além de alterações oculares, incluindo cegueira, anisocoria, midríase bilateral, estrabismo e nistagmo, e outros, como convulsão, ptose facial, disfagia, cabeça inclinada lateralmente, vocalização, déficit proprioceptivo, depressão leve a severa, hipertonicidade dos músculos extensores e dor na região cervical (GIANNUZZI *et al.*, 2017; IKEDA *et al.*, 2007).

1.6.2 Alterações no sistema nervoso central

Estudos sobre a patogênese das manifestações clínico-patológicas neurológicas causadas por *L. infantum* ainda são escassos. Os principais achados patológicos neurológicos são as lesões inflamatórias e complicações vasculares (GIANNUZZI *et al.*, 2017). Em cães naturalmente infectados que apresentavam ou não sinais clínicos neurológicos, foram descritas alterações histológicas, como degeneração neuronal, neuronofagia, meningoencefalite, congestão vascular, infiltrado inflamatório linfoplasmocítico perivascular, focos de micro-hemorragia, radiculoneurite, mielite, plexo coróide, depósitos amiloides e depósitos de imunocomplexos nos vasos sanguíneos do plexo coróide (GARCIA-ALONSO *et al.*, 1996; IKEDA *et al.*, 2007; MACAU *et al.*, 2017; MÁRQUEZ *et al.*, 2012). As alterações foram mais intensas e frequentes nos cães que manifestaram sinais clínicos neurológicos (IKEDA *et al.*, 2007).

Há poucos relatos da identificação de formas amastigotas de *L. infantum* no SNC, embora tenham sido detectadas no tronco encefálico (OLIVEIRA, 2016) e plexo coróide (GRANO *et al.*, 2019). Tal identificação também ocorreram nos espaços extra e intracelular do parênquima da medula espinhal, no telencéfalo, tálamo, plexo coróide, vasos sanguíneos das leptomeninges e em nervos espinhais de um cão naturalmente infectado que recebia glicocorticóides, sugerindo ruptura da barreira sangue-líquido cefalorraquidiano (LCR) e da barreira hematoencefálica (BHE), devido à possível exacerbação da infecção pelo uso deste fármaco (MÁRQUEZ *et al.*, 2012). Entretanto, em cães infectados sem histórico de uso de medicamentos corticosteróides ou anti-*Leishmania* também foram visualizadas formas viáveis do

parasito no citoplasma de macrófagos localizados no espaço perivascular da substância cinzenta do tronco encefálico, na substância branca da medula espinhal cervical e no LCR, corroborando o fato de que *L. infantum* é capaz de penetrar a BHE, disseminar por meio do LCR e infectar o encéfalo e a medula espinhal de cães (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Por outro lado, a presença de DNA do parasita no SNC e LCR usando qPCR é mais frequentemente reportada (CARDINOT *et al.*, 2016; GRANO *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2015).

1.6.3 Patogenia das lesões no encéfalo e permeabilidade das barreiras encefálicas

As alterações histopatológicas descritas no SNC na leishmaniose visceral podem ser decorrentes do efeito direto de *L. infantum* no mesmo, de lesões imunomediadas, de complicações vasculares induzidas por efeitos indiretos, da imunossupressão induzida pelo parasito ou do tratamento farmacológico (GIANNUZZI *et al.*, 2017). Sabe-se que durante uma infecção ativa, células do sistema imunológico são mobilizadas por tecidos linfóides periféricos; para que estas adentrem o parênquima do SNC, são selecionadas e reguladas por barreiras existentes (MASTORAKOS; MCGAVERN, 2019), como a BHE, que protege o SNC de forma anatômica e fisiológica e é constituída por membrana basal, células endoteliais, pericitos, glia limitante e micróglia. Além disso, possui zônulas de oclusão (“*tight junctions*”) entre as células, que não possuem fenestrações (MARCHETTI; ENGELHARDT, 2020).

Devido a estas características, a BHE foi por muito tempo considerada impermeável. No entanto, seu papel na comunicação entre o corpo e o encéfalo durante eventos fisiológicos ou patológicos demonstra que a BHE atua como unidade funcional neurovascular, uma vez que sua composição de células interage em consonância com os neurônios, sendo capazes de responder a estímulos inflamatórios e transmitir esses sinais entre a periferia e o SNC, atuando mais como “interface” entre os sistemas, do que como “barreira” (BANKS, 2016). As células TCD4+ e TCD8+ ativadas possuem passagem limitada através da BHE: entram no espaço perivascular, porém são incapazes de penetrar a membrana basal astrocítica e a glia limitans (ENGELHARDT; SOROKIN, 2009). Alguns fatores astrocíticos já são

conhecidos por promoverem permeabilidade da BHE, entre eles NO, IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (CHEN *et al.*, 2000; LAU; YU, 2001). Além disso, já foi demonstrado que a ação crônica do IFN- γ inibe a via que mantém a integridade estrutural dos pericitos, células envolvidas na formação e manutenção da BHE, o que acarreta em disfunção da mesma, sinalizando um possível mecanismo que correlaciona a inflamação crônica à disfunção da BHE (JANSSON *et al.*, 2016).

1.7 Alterações na hipófise durante doenças sistêmicas

A glândula pituitária tem um papel central na manutenção da homeostase corporal, respondendo a diversos sinais complexos derivados de sistemas centrais e periféricos. Dessa forma, alterações patológicas sistêmicas podem levar a sua desregulação e disfunções no sistema neuro-endócrino (PEREZ-CASTRO *et al.*, 2012). As principais desordens pituitárias são de origem proliferativa (MILLER *et al.*, 2018), porém alterações inflamatórias também são reportadas, sendo a hipofisite linfocítica a mais comum (BELLASTELA *et al.*, 2003).

A hipofisite é uma desordem inflamatória crônica que ocorre na glândula pituitária, de origem primária ou secundária. A hipofisite primária é um distúrbio autoimune de etiologia desconhecida, caracterizado por uma inflamação restrita a glândula pituitária, que não pode ser associada a outros distúrbios inflamatórios sistêmicos (BELLASTELA *et al.*, 2003). Uma série de auto anticorpos contra células hipofisárias já foram descritos na literatura, no entanto, mais pesquisas são necessárias para compreensão dos mecanismos patogênicos na hipofisite primária (LANGLOIS; VARLAMOV; FLESERIU, 2022).

A hipofisite secundária é relacionada a processos inflamatórios locais, induzidos por tumores ou cistos, ou sistêmicos, como outras endocrinopatias autoimunes, utilização de medicamentos, doenças infecciosas, entre outras condições (BELLASTELA *et al.*, 2003; LANGLOIS; VARLAMOV; FLESERIU, 2022).

A inflamação pode acometer todas as porções da hipófise e se estender ao hipotálamo, sendo que a adeno-hipófise é a porção mais frequentemente envolvida e/ou que concentra maior presença de células inflamatórias (LANGLOIS; VARLAMOV; FLESERIU, 2022). Quanto às manifestações clínicas, as hipofisites podem ser subclínicas ou causar disfunções neurológicas e/ou endócrinas,

envolvendo hipofunção ou hiperfunção das células acometidas, devido a compressão ou destruição do tecido adjacente ao infiltrado inflamatório (CATUREGLI *et al.*, 2005; RAO *et al.*, 2016).

Dentre os padrões histopatológicos de hipofisite reconhecidos na literatura, incluem-se: a hipofisite linfocítica, a granulomatosa, a xantomatosa, a relacionada a IgG-4, a necrotizante e as formas mistas, que podem ocorrer tanto na hipofisite primária como secundária, embora o padrão linfocítico seja o mais relatado (LANGLOIS; VARLAMOV; FLESERIU, 2022).

A hipofisite granulomatosa é caracterizada pela presença de granulomas necrosantes formados por histiócitos e plasmócitos que circundam áreas de necrose no parênquima da glândula pituitária (BELLASTELA *et al.*, 2003). Na hipofisite xantomatosa, há infiltrado de histiócitos contendo lipídios em seu citoplasma, associados a moderada quantidade de linfócitos dispersos (BELLASTELA *et al.*, 2003). A hipofisite linfocítica é caracterizada por um infiltrado predominante de linfócitos difusos no interstício da glândula pituitária e/ou multifocal na região dos ácinos da adeno-hipófise (RAO *et al.*, 2016). Os linfócitos ainda podem se apresentar agregados em folículos linfóides com centros germinativos e estarem acompanhados de plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos em discreta quantidade (GUBBI *et al.*, 2019). Os linfócitos T CD3⁺ são o principal tipo celular envolvido (RAO *et al.*, 2016) seguidos pelos linfócitos B CD20⁺ (GUBBI *et al.*, 2019). Na hipofisite relacionada a IgG-4 há predomínio de linfócitos B, sendo considerada uma condição rara (BAPTISTA *et al.*, 2017). Com a evolução da inflamação, todos os padrões histológicos podem promover a fibrose da glândula pituitária (GUBBI *et al.*, 2019).

Existem alguns relatos de hipofisite primária ou secundária promovendo ou não distúrbios endócrinos ou neurológicos em cães, no entanto, por ser considerado um quadro esporádico, há muitas limitações e divergências nos relatos (ADISSU; HAMEL-JOLETTE; FOSTER, 2010; BLOMQVIST *et al.*, 2020; MEIJI *et al.*, 2012; MILLER *et al.*, 2018; POLLEDO *et al.*, 2018; WOLFESBERGER *et al.*, 2011).

Em estudos avaliando alterações histopatológicas na glândula pituitária de cães, a prevalência de alterações inflamatórias foi baixa em detrimento de alterações proliferativas (MILLER *et al.*, 2018; POLLEDO *et al.*, 2018). São citadas hipofisites linfocíticas de provável origem autoimune primária (ADISSU; HAMEL-JOLETTE; FOSTER, 2010; MILLER *et al.*, 2018; POLLEDO *et al.*, 2018), bem como hipofisites secundárias a processos infecciosos que podem cursar com meningoencefalite, como

na infecção pelo vírus da cinomose (POLLEDO *et al.*, 2018) e na blastomicose sistêmica (MILLER *et al.*, 2018). A hipofisite em cães é descrita associada a quadros de hipo e hiperadrenocorticismo (ADISSU; HAMEL-JOLETTE; FOSTER, 2010; WOLFESBERGER *et al.*, 2011), hipotireoidismo (ADISSU; HAMEL-JOLETTE; FOSTER, 2010) e diabetes insipidus (MEIJI *et al.*, 2012), demonstrando que, assim como nos humanos, a infiltração linfocítica acentuada afeta a arquitetura hipofisária, podendo levar a sua insuficiência (MEIJI *et al.*, 2012). O eixo hipófise-adrenal parece ser o mais sensível à infiltração inflamatória, estando relacionado a maioria das alterações clínicas observadas em cães (ADISSU; HAMEL-JOLETTE; FOSTER, 2010; BLOMQUIST *et al.*, 2020; MEIJI *et al.*, 2012; WOLFESBERGER *et al.*, 2011).

As hipofisites relacionadas a processos infecciosos bacterianos, fúngicos, virais ou por protozoários são pouco estudadas, mas há relatos em cães (MILLER *et al.*, 2018; POLLEDO *et al.*, 2018), humanos (BEN ABID *et al.*, 2017) e outros animais (ANYOUGU; SHOYINKA; IHEDIOHA, 2022).

Em humanos, há relatos de hipofisite granulomatosa associados a tuberculose, com ou sem envolvimento de outros órgãos e promovendo alterações endócrinas significativas, como diabetes insipidus e hiperprolactinemia (BEN ABID *et al.*, 2017). A tuberculose na glândula pituitária é considerada uma condição extremamente rara e de difícil diagnóstico, que costuma ser identificada através do aumento da hipófise visualizado através de ressonância magnética (BEN ABID *et al.*, 2017). Os protozoários *Trypanosoma brucei* e *T. congolense* também já foram detectados por análise molecular no cérebro e glândula pituitária de ovelhas durante infecção experimental, sendo associados a aumento de cortisol plasmático e hiperplasia da glândula adrenal (ANYOUGU; SHOYINKA; IHEDIOHA, 2022).

1.7.1 Alterações na hipófise durante a leishmaniose

Até o momento, a literatura é inexistente a respeito alterações histopatológicas hipofisárias na leishmaniose, no entanto, a presença de distúrbios endócrinos de origem primária hipofisária já foi relatada em humanos (VERDE *et al.*, 2011) e modelos experimentais (BARROS-GONÇALVES *et al.*, 2021).

É sabido que a resposta imune através da produção de diversas citocinas interage na ativação e inibição de eixos hipofisários (PEREZ-CASTRO *et al.*, 2012;

VERDE *et al.*, 2011). O aumento da produção de corticoides em resposta ao estresse crônico, por exemplo, ocorre a partir da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α , que também são responsáveis pela inibição da liberação de tireotropina e gonadotrofinas nessas condições (HELMREICH *et al.*, 2005). As infecções crônicas sistêmicas, portanto, como causas de estresse crônico, têm potencial para promover distúrbios na produção hormonal da hipófise e conseqüentemente de todos os seus órgãos-alvo.

Estudos em pacientes humanos com leishmaniose crônica identificaram sinais de disfunção hipofisária relacionada à produção de ADH, ACTH, TSH e hormônios sexuais (VERDE *et al.*, 2011). A secreção inapropriada de ADH foi relacionada à ocorrência de hiponatremia, considerado um distúrbio eletrolítico associado a mortalidade na leishmaniose humana (DAHER *et al.*, 2017).

Em estudo conduzido com hamsters infectados com *Leishmania infantum*, foi observado aumento significativo de cortisol sérico pós-infecção, que foi ainda correlacionado positivamente ao aumento da expressão gênica de transcritos pró-inflamatórios, como IL-10, fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e IL-6 (BARROS-GONÇALVES *et al.*, 2021).

Considerando a suscetibilidade e exposição da hipófise à componentes presentes na circulação, tais como citocinas e agentes infecciosos, a investigação de alterações morfológicas e funcionais na glândula durante a leishmaniose é relevante, visto o tropismo do agente por diversos tecidos e sua capacidade de promover uma resposta imune órgão-específica.

1.8 Justificativa

O desenvolvimento de doença clínica progressiva na Leishmaniose Visceral (LV), por acometer vários tecidos, acarreta em desordem da homeostasia local ou sistêmica. A hipófise é uma glândula responsável pela produção e liberação dos principais hormônios que controlam as demais glândulas do sistema endócrino, e semelhante a outros tecidos pode ser acometida. Portanto, a ausência de literatura sobre alterações hipofisárias durante a LV em cães, reforçam a importância deste estudo.

1.9 Objetivos

Investigar a presença de amastigotas de *Leishmania* spp. e caracterizar alterações inflamatórias destacando o envolvimento de linfócitos T CD3⁺ em diferentes regiões da hipófise de cães.

2 CAPÍTULO 1- HIPOFISITE LINFOCÍTICA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

2.1 Resumo

O comprometimento morfológico de glândulas endócrinas, como a hipófise, é pouco investigado em cães acometidos pela leishmaniose visceral canina (LVC). Formas amastigotas foram identificadas por meio de imuno-histoquímica na hipófise de dois cães (9,52%). A avaliação histopatológica em cortes corados por Hematoxilina e Eosina demonstrou a presença de inflamação em 76,19% das regiões hipofisárias analisadas das amostras dos cães infectados (G1). A maior frequência de inflamação foi observada na região de *pars distalis* e *pars intermedia* de cães do G1. Houve correlação entre a intensidade de inflamação e a quantidade de linfócitos TCD3⁺ imunomarcados nas regiões hipofisárias analisadas, caracterizando a ocorrência de hipofisite linfocítica. Esses dados indicam que a presença de inflamação e/ou do parasito na região hipofisária pode resultar em disfunção da glândula, acarretando no agravamento do estado clínico do paciente, comprometendo a eficiência do tratamento e do prognóstico.

Palavras-chave: Glândula pituitária. Inflamação. Linfócito T. *Leishmania infantum*.

2.2 Abstract

The morphological involvement of endocrine glands, such as the pituitary gland, is poorly investigated in dogs affected by canine visceral leishmaniasis (CanL). Amastigote forms were identified by immunohistochemistry in the pituitary glands of two dogs (9.52%). Histopathological evaluation in sections stained by Hematoxylin and Eosin showed the presence of inflammation in 76.19% of the analyzed pituitary regions of the samples from infected dogs (G1). The highest frequency of inflammation was observed in the *pars distalis* and *pars intermedia* region of G1 dogs. There was a correlation between the intensity of inflammation and the amount of immunolabeled TCD3+ lymphocytes in the analyzed pituitary regions, characterizing the occurrence of lymphocytic hypophysitis. These data indicate that the presence of inflammation and/or the parasite in the pituitary region can result in dysfunction of the gland, worsening the clinical condition of the patient, compromising the efficiency of treatment and prognosis.

Keywords: Pituitary gland. Inflammation. T lymphocyte. *Leishmania infantum*.

3 INTRODUÇÃO¹

As leishmanioses são doenças de caráter zoonótico, amplamente distribuídas pelos continentes, acometendo os animais domésticos e silvestres (Desjeux, 1992). O agente etiológico da leishmaniose visceral canina (LVC), listada como uma das doenças tropicais mais letais e negligenciadas do mundo (World Health Organization, 2010), é o protozoário *Leishmania infantum* (Maurício *et al.*, 2000). As formas amastigotas infectam sistemicamente o hospedeiro, ocasionando a estimulação crônica do sistema mononuclear fagocitário, e conferindo um caráter imunomediado à patogênese das lesões (Taylor *et al.*, 2007), o qual está diretamente relacionado às manifestações clínicas (Baneth, 2006; Tizard, 2014).

Os cães infectados podem apresentar a doença na forma subclínica ou sistêmica, e os sinais clínicos incluem frequentemente a anorexia, hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia e lesões cutâneas (Baneth, 2006). Outros órgãos e tecidos podem ser acometidos como a glândula tireoide (Cortese *et al.*, 1999), o coração (Rosa *et al.*, 2014), o fígado (Madeira *et al.*, 2016), os rins (Baneth *et al.*, 2008) entre outros, incluindo o sistema nervoso central (SNC) (Giannuzzi *et al.*, 2017).

Alterações na hipófise de cães, por diferentes etiologias, apresentam relatos limitados e com divergências sobre as terminologias e classificações (Polledo *et al.*, 2018). Normalmente espera-se que linfócitos não sejam observados na histologia normal da glândula pituitária (Blomqvist *et al.*, 2020). Tal glândula integra os circuitos formados pela interação do eixo hipotalâmico-hipofisário com as glândulas endócrinas secundárias, as quais são funcionalmente inter-relacionadas, auxiliando na função

¹ Normas da Revista Veterinary Parasitology (Anexo B).

dos órgãos-alvo e manutenção da homeostase, de modo que, a disfunção de uma glândula acarretará em alteração na secreção de outras (Eiler, 2007; Greco and Stabenfeldt, 2004; Guyton e Hall, 2011). As hipofisites pode ser de origem idiopática ou secundária às doenças sistêmicas, incluindo as infecciosas, autoimunes e imunomediadas (Basaria *et al.*, 2000; Polledo *et al.*, 2018; Prete e Salvatori, 2000; Schaefer *et al.*, 2008). Os achados histopatológicos são caracterizados pela infiltração de linfócitos em diferentes regiões da glândula, alterando seu parênquima, o que acarreta nas alterações subclínicas e disfunções hormonais (Caturegli *et al.*, 2005; Polledo *et al.*, 2018). Em cães, as hipofisites primárias de origem imunomediada e secundária a doenças sistêmicas e infecciosas são relatadas em casos esporádicos com a presença de infiltrado inflamatório compostos por linfócitos T CD3+ (Adissu *et al.*, 2010; Blomqvist *et al.*, 2020; Miller *et al.*, 2018; Polledo *et al.*, 2018; Wolfesberger *et al.*, 2011). Na LVC, a diversidade de tropismo por diferentes tecidos do protozoário ocasiona uma variabilidade na resposta imune (Dedet; Pratlong, 2009), sendo que os linfócitos T CD4+ são relacionados à resposta imune contra a infecção (Barbière, 2006; Michalick; Genaro, 2007; Marcondes, 2008; Day, 2007; Tizard, 2014; Boggiatto *et al.*, 2010).

Os órgãos circunventriculares (CVOs) e o plexo coróide são estruturas que podem servir como rota de entrada para parasitos e outros patógenos ao tecido nervoso como demonstrado por infecções com o parasita *Trypanosoma brucei* (Bentivoglio *et al.*, 2018). Essas estruturas são desprovidas da barreira hematoencefálica (BHE), mas possuem a barreira hemato-liquórica formada por junções ocludentes entre as células epiteliais do plexo coróide, e entre os tanicitos especializados que revestem as cavidades ventriculares que delineiam os CVOs (Duvernoy e Risold, 2007). A neuro-hipófise é classificada como um órgão

circunventricular (CVO) e desprovida de barreiras efetivas, uma vez que possuem vasos fenestrados, estão suscetíveis à exposição de componentes presentes na circulação, tais como citocinas, endotoxinas e patógenos, representando um ponto de acesso que influencia diretamente o SNC. Assim como outros CVO, a neuro-hipófise é capaz de atuar na iniciação e modulação da inflamação local (Bentivoglio *et al.*, 2018; Kaur e Ling, 2017; Mastorakos e McGavern, 2019; Taylor *et al.*, 2007).

A literatura que aborda o comprometimento da hipófise na LVC é inexistente. Uma vez que a barreira hematoencefálica é permeável na região hipofisária e que existem relatos de acometimento do tecido nervoso em cães com LVC com descrição do envolvimento de linfócitos T CD3⁺ (Grano *et al.*, 2019; Márquez *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2009; Oliveira, 2016), o objetivo deste estudo foi investigar a presença de amastigotas de *Leishmania* spp. e caracterizar alterações inflamatórias destacando o envolvimento de linfócitos T CD3⁺ em diferentes regiões da hipófise de cães com LVC.

3.1 Material e Métodos

3.1.1 Ética

Todos os procedimentos e métodos utilizados no estudo foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da FOA, UNESP, Araçatuba/SP, e aprovado sob nº0354-2021.

3.1.2 Animais

Vinte e seis cães, quinze machos e onze fêmeas, com idade entre 1 e 7 anos, foram selecionados do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba-UNESP e do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, Estado de São Paulo, Brasil.

3.1.3 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral

O diagnóstico sorológico foi obtido por ensaio imunoenzimático (D.O > 0,270), de acordo com Lima *et al.* (2003), e/ou pesquisa citológica direta de aspirado de linfonodo poplíteo (punção biopsia aspirativa).

3.1.4 Delineamento experimental

Vinte e um cães infectados naturalmente por *Leishmania* ssp., não vacinados ou tratados para LVC, foram incluídos no grupo infectado (G1). Estes animais foram eutanasiados seguindo o Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral Canina do Ministério da Saúde (Saúde, 2006) e a Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012) após o diagnóstico ser confirmado por exame parasitológico e/ou ensaio sorológico. Cinco cães não infectados, sem histórico de comprometimento neurológico, cuja eutanásia foi realizada "*in extremis*", foram incluídos no grupo controle (G2).

3.1.5 Colheita do material

As necropsias foram realizadas em seguida à confirmação da morte do animal. Foram avaliadas no exame macroscópico, a ausência ou presença de alterações para determinar o estadiamento clínico da doença. Desta forma o G1 foi composto por cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, conforme proposto por Mancianti *et al.* (1988), e descrito por Reis *et al.* (2009) (Tabela S1). Conforme procedimento padrão, foram colhidas amostras de vários órgãos, incluindo a hipófise. Todas as amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% e processadas rotineiramente para inclusão em parafina. Cortes histológicos com 5µm foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e submetidos a reações de imuno-histoquímica (IHQ) (Carson e Hladik, 2009).

3.1.6 Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas para detecção de linfócitos TCD3 e para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* spp. utilizando os anticorpos primários, conforme descrito na Tabela 1. Foi utilizado soro hiperimune heterólogo de camundongo experimentalmente infectado com *Leishmania (V.) shawi* (cepa 15789) como anticorpo primário para detecção de *Leishmania* spp. (cedido gentilmente pela Professora Dra. Márcia Dalastra Laurenti, Laboratório de Patologia de Moléstias infecciosas da FM-USP), e o anticorpo anti-CD3 (A0452, Dako) para marcação de linfócitos T. Para controle positivo das reações, cortes histológicos de tecido linfoide (linfonodo poplíteo) de cão positivo para LVC (Fig. S1), e ainda tonsila humana para linfócito TCD3+ para controle da reação. Para o controle negativo das reações, foi adicionado o diluente de anticorpo sem o anticorpo primário.

Para a desparafinização e hidratação, os cortes histológicos foram submetidos a banhos consecutivos, de 5 minutos em cada etapa, em xilol I, II e III, seguidos pela hidratação em álcool com concentrações decrescentes (100, 95, 70 e 50%) e água destilada. Em seguida, para pesquisa de formas amastigotas, foi realizada a recuperação antigênica (Tabela 1), seguida de lavagem por 3 vezes em PBS a 1% pH 7,4. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com imersão dos cortes por 30 minutos em solução composta por peróxido de hidrogênio 30V diluído em metanol 50% (v/v) com PBS 1% pH 7,4. Para a detecção dos linfócitos TCD3+ foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, e em seguida recuperação antigênica. Após lavagem por 3 vezes em PBS a 1% pH 7,4, os cortes foram incubados em temperatura ambiente com um tampão de bloqueio contendo 3% (p/v) de leite em pó desnatado (Molico®) em PBS pH 7,4 por 30 min, para bloquear sítios de ligação inespecíficos. Os anticorpos primários foram utilizados diluídos em tampão de PBS pH 7,2 + soro

fetal bovino 1%. A diluição padronizada dos anticorpos primários foi descrita na Tabela 1.

Tabela 1- Lista de anticorpos, concentração, método de recuperação antigênica e cromógeno utilizados nas reações de imuno-histoquímica.

Célula/ Parasita	Anticorpo	Diluição	Recuperação antigênica	Substrato Cromógeno
Linfócitos T CD3⁺	Anti-CD3, (A0452, Dako)	1:100	Tripsina, pH 7,8, 37°C por 30 min em estufa	3,3'-diaminobezidine (K3468, Dako)
<i>Leishmania</i> spp.	Soro hiperimune de Camundongo	1:1000	Citrato pH 6,0, 100°C por 30 min no vapor	3,3'-diaminobezidine (K3468, Dako)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os anticorpos primários foram incubados sobre os cortes histológicos durante a noite, por 12 a 14 horas, à 4 °C em câmara úmida. Para o controle negativo das reações, foi adicionado o diluente sem anticorpo primário. Em seguida, foram incubados com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (EnVision™ FLEX – HRP; Dako, K8010) por 40 minutos à temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS pH 7,4 foi realizada a incubação com DAB (K3468, Dako). Após lavagem em água corrente e contra coloração com hematoxilina de Harris, os cortes foram desidratados, diafanizados e montados com resina transparente (Entelan®) e lamínulas de vidro.

3.1.7 Análise histopatológica e imuno-histoquímica

Os cortes histológicos da hipófise corados com HE foram observados em microscopia de luz, para avaliar a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. e de células inflamatórias nas regiões da *pars nervosa*, *pars intermedia*, e *pars distalis*. A quantificação de células inflamatórias foi feita por método semi quantitativo,

utilizando uma escala de quatro graus (grau 0-3) modificada de Grano *et al.* (2018), para representar a intensidade da inflamação em escore ausente (0), discreto (1), moderado (2) e acentuado (3) em cada região analisada. Os cortes histológicos foram avaliados por dois observadores, e os resultados quando divergentes, foram reavaliados por um terceiro observador.

A avaliação imuno-histoquímica para linfócitos TCD3⁺ foi realizada com o auxílio de um microscópio Olympus BX 50 acoplado à câmera e ao computador. Foram capturadas imagens de cinco high-power field (HPF; *hot spot*) das regiões da *pars intermedia*, *pars distalis* e *pars nervosa*, com ampliação final de 400x. Para a contagem manual das células imunomarcadas, com morfologia consistente com linfócitos, foi utilizado o *software* Image J 1.52^a (Fig. S2). Marcação de células intravasculares foram excluídas da contagem. A pesquisa de amastigotas de *Leishmania* spp. imunomarcadas foi realizada em microscopia de luz, em objetiva de 40x e 100x com ampliação final de 400x e 1000x em todas as regiões acima citadas.

3.1.8 Análise estatística

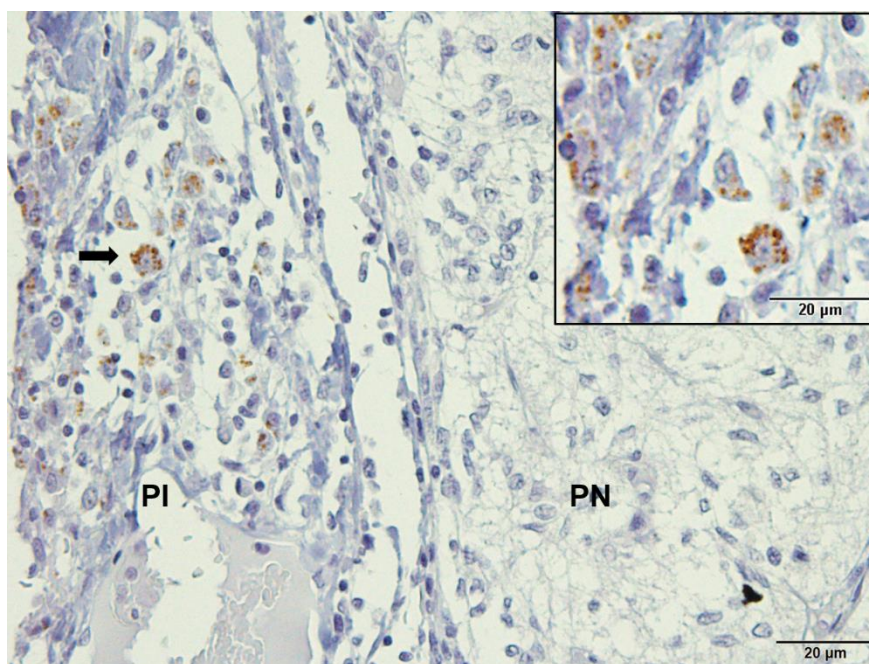
O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. As diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste de Mann Whitney, para dados não paramétricos. O Teste de correlação de Spearman foi utilizado para correlação do escore de inflamação com o estadiamento clínico, e a mediana da contagem de linfócitos TCD3⁺, por região. Valores de P <0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *software* Prism (v8.0.1, GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

3.2 Resultados

3.2.1 Detecção imuno-histoquímica de *L. infantum*

A imunodeteção de *Leishmania* spp. nos cortes de hipófise demonstrou marcação positiva em 9,52% (2/21) dos casos. Formas amastigotas típicas foram localizadas no citoplasma de macrófagos e no interstício da *pars intermedia* dos cães infectados (Fig. 1).

Fig. 1. Fotomicrografia de hipófise de cão infectado com *Leishmania* spp. Imuno-histoquímica para detecção de amastigotas (setas). Observar imunomarcação positiva e a presença de amastigotas livres e no citoplasma de macrófagos em *pars intermedia* (PI) da adeno-hipófise, na zona marginal com *pars nervosa* (PN). (Soro hiperimune de camundongo + 3,3'-diaminobezidina- DAKO; barra de escala = 20µm).

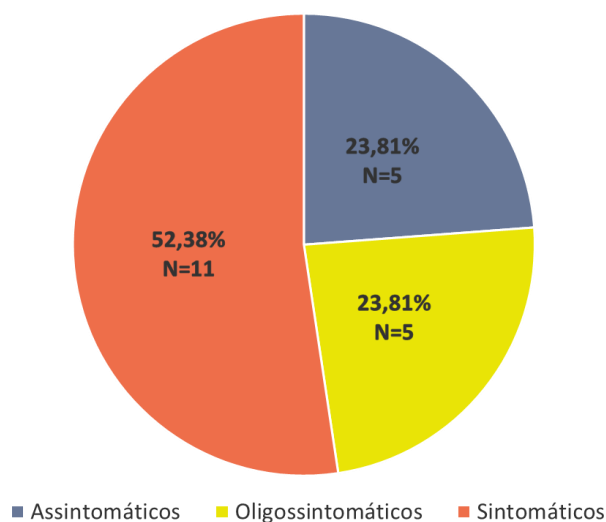


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.2 Estadiamento clínico

Entre os cães do grupo infectado 52,38% foram classificados como sintomáticos, apresentando ao menos três lesões macroscópicas graves da doença, como alterações cutâneas difusas (alopecia, úlceras, dermatite furfurácea), oculares (blefarite, ceratoconjuntivite), emagrecimento acentuado, e outros sinais clínicos característicos da LVC, como linfadenomegalia e onicogrifose (Fig. 2). Cães classificados como assintomáticos, que não apresentavam lesões evidentes, e oligossintomáticos com lesões cutâneas e emagrecimento discreto, linfadenomegalia, representaram 23,81% dos cães, respectivamente (Tabela S2).

Fig. 2. Porcentagem (%) de cães infectados (G1) de acordo com o estadiamento clínico



Fonte: Elaborado pelo autor.

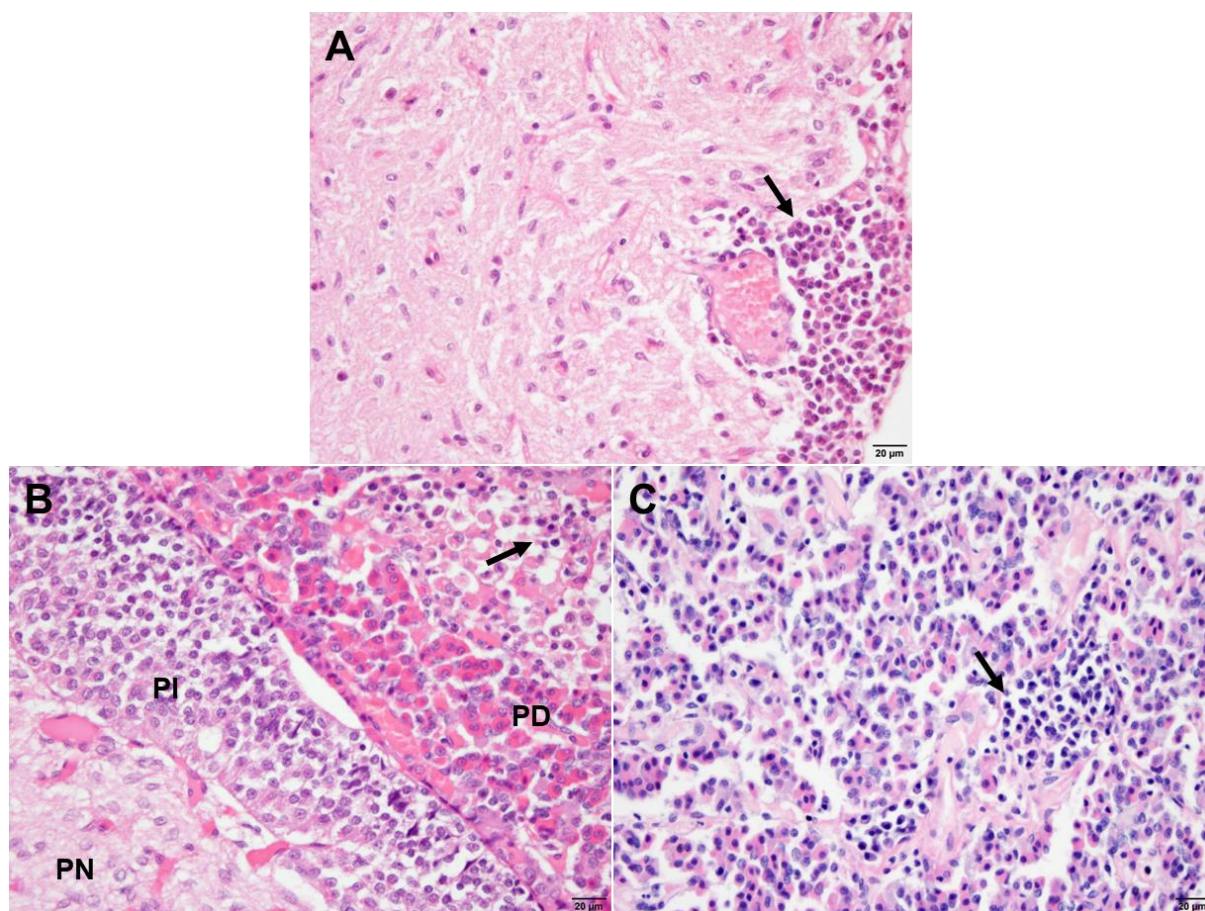
3.2.3 Caracterização histopatológica

O grupo de animais infectados (G1), apresentou infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e raros macrófagos, nas regiões hipofisárias avaliadas (Fig. 3) (Tabela S3). Células mononucleares foram observadas na *pars*

intermedia em 11 animais (11/21), sendo a intensidade da inflamação classificada como discreta em 28,87% (6/21), moderada em 14,29% (3/21) e acentuada em 9,52% (2/21). Na *pars distalis* a presença de células inflamatórias foi evidenciada em 13 animais (13/21), sendo a intensidade discreta em 28,57% (6/21), moderada 23,80% (5/21) e acentuada em 9,52% (2/21). Na *pars nervosa* a inflamação foi evidenciada em 9 animais (9/21), sendo a intensidade discreta em 33,33% (7/21) e moderada em 9,52% (2/21) (Fig. 4). Não houve correlação entre o estadiamento clínico da leishmaniose e o escore de inflamação em nenhuma das regiões hipofisárias do grupo infectado (G1) (Fig. S3).

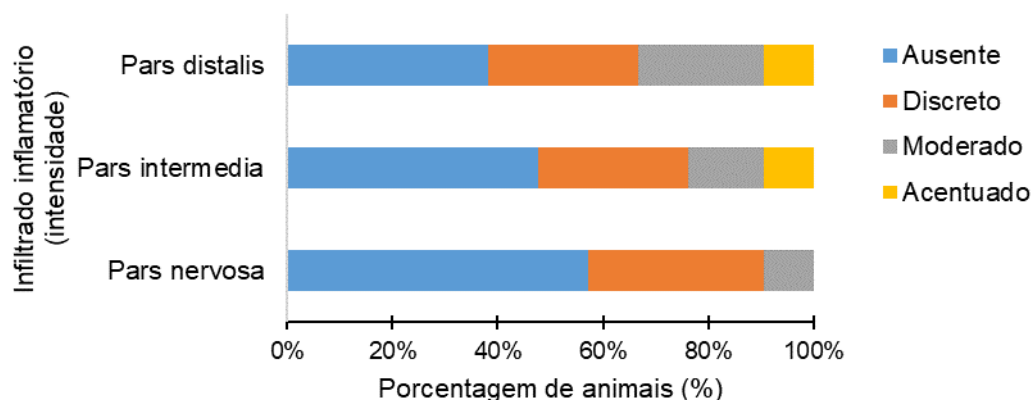
O grupo de animais não infectados (G2) apresentou mínimas alterações, com a presença discreta de grupos de células mononucleares focais na *pars distalis* em 40% (2/5) dos animais, e 20% (1/5) na *pars intermedia*. A *pars nervosa* apresentou ausência de inflamação em 100% (5/5) dos animais do grupo controle.

Fig. 3. Fotomicrografia das regiões hipofisárias dos cães (G1), demonstrando a distribuição e intensidade da inflamação composta por células mononucleares (setas). (A) Observar células inflamatórias com distribuição focal e perivascular na *pars nervosa*, com intensidade moderada. (B) Observar células inflamatórias entremeadas às células cromófilas, acidófilas e basófilas com distribuição focal e intensidade discreta em *pars distalis* (PD), e ausência de inflamação em *pars intermedia* (PI) e *pars nervosa* (PN). (C) Observar inflamação com distribuição focal e moderada no parênquima em *pars distalis*. (Coloração HE, barra = 20µm).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Fig. 4. Porcentagem (%) de cães infectados (G1) de acordo com a intensidade de células inflamatórias mononucleares observadas na *pars distalis*, *pars intermedia* e *pars nervosa*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.4 Imunomarcção para linfócitos TCD3⁺

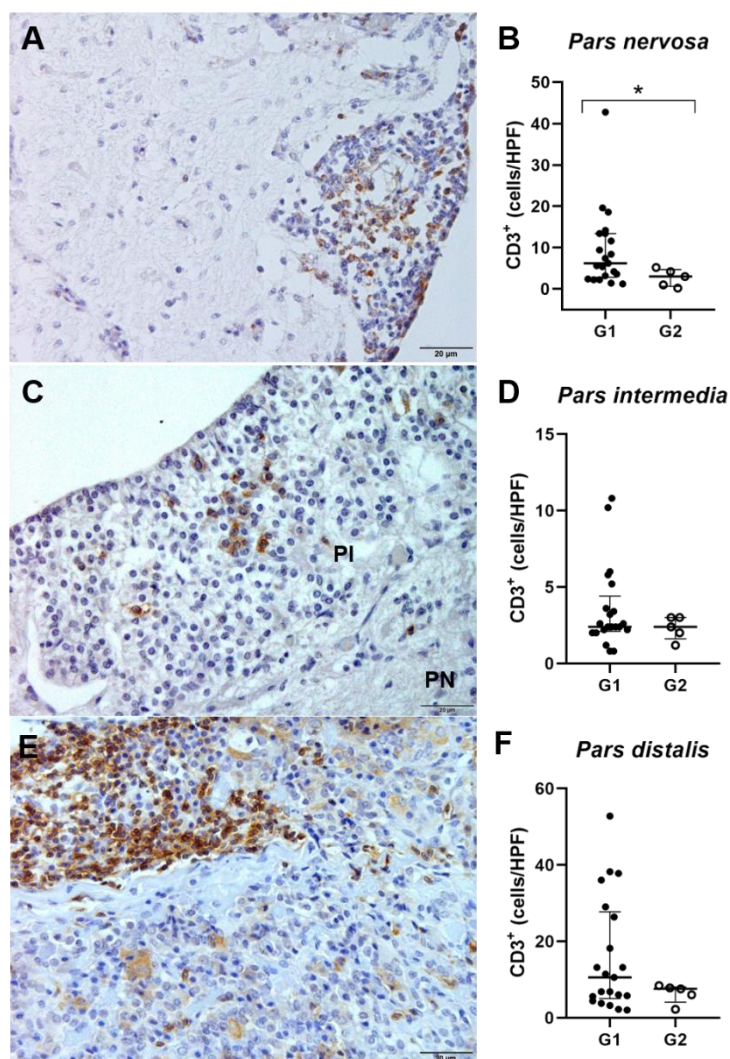
A identificação e quantificação de linfócitos TCD3⁺ imunomarcados foi realizada em todas as regiões analisadas da hipófise dos cães infectados (n=21) e controle (n=5). A diferença entre os grupos foi determinada por região, sendo que houve diferença entre os grupos G1 e G2 na *pars nervosa* ($P = 0,0357$) e não houve diferença entre G1 e G2 na *pars intermedia* ($P = 0,4935$) e *pars distalis* ($P = 0,4000$) (Fig. 5).

Por se tratar de animais naturalmente infectados, é esperado observar variações na distribuição e quantidade dessas células dentre os indivíduos, considerando que o tempo decorrente da infecção é desconhecido. Ainda, visando homogeneizar as amostras em relação à quantidade de linfócitos T CD3⁺ encontrada nos animais controle, nós determinamos a mediana da quantidade de CD3⁺ nas respectivas regiões da hipófise dos cães controle, estabelecendo um “*cut-off*”. Dessa forma, selecionamos um subgrupo de 10 animais dentro dos animais infectados que continham uma quantidade de CD3⁺ acima da mediana dos animais controle, sendo

para a *pars intermedia* e *pars distalis*. Esta subpopulação de animais do grupo G1 quando comparados com G2, apresentou diferença significativa em relação a G2 na quantidade de linfócitos TCD3+ observada na *pars intermedia* ($P = 0,0070$) e na *pars distalis* ($P = 0,0007$). Na *pars nervosa* dos cães infectados, a diferença entre G1 e G2 se manteve ($P = 0,0441$), mesmo com a retirada de um único cão que apresentava o maior número de TCD3+ ($n=20$) (Fig. 6).

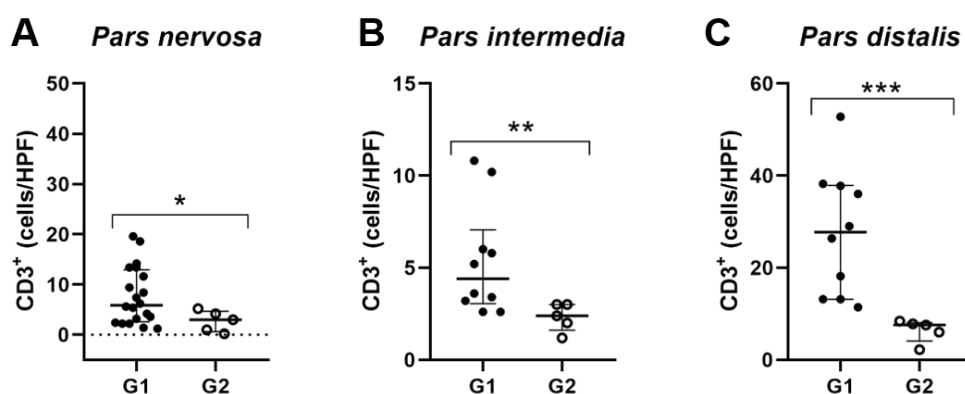
Para avaliar se a intensidade da inflamação está associada com o aumento de linfócitos TCD3+, realizamos teste de correlação; sendo encontrada correlação entre esses parâmetros nas três regiões hipofisárias, sendo o valor de P na *pars nervosa* ($P= 0,0033$), *pars intermedia* ($P= 0,0223$) e na *pars distalis* ($P= 0,0154$) (Fig. 7).

Fig. 5. (A), (C) e (E) Fotomicrografia representativa das regiões *pars nervosa* (PN), *pars intermedia* (PI) e *pars distalis* de hipófise de cão infectado com *Leishmania* spp., de imuno-histoquímica para detecção de linfócitos T CD3+ revelado com DAB DAKO (barra de escala = 20µm). (B), (D) e (F) Gráficos de dispersão mostrando o número de linfócitos TCD3+ nas regiões hipofisárias de cães do grupo G1 (n= 21) e G2 (controle n=5). As linhas horizontais representam os valores da mediana e do intervalo interquartil. (B) O número de células TCD3+ foi maior na *pars nervosa* (*P=0,0357). (D) e (F) Não houve diferença na *pars intermedia* (P=0,4935) e *pars distalis* (P=0,4000).



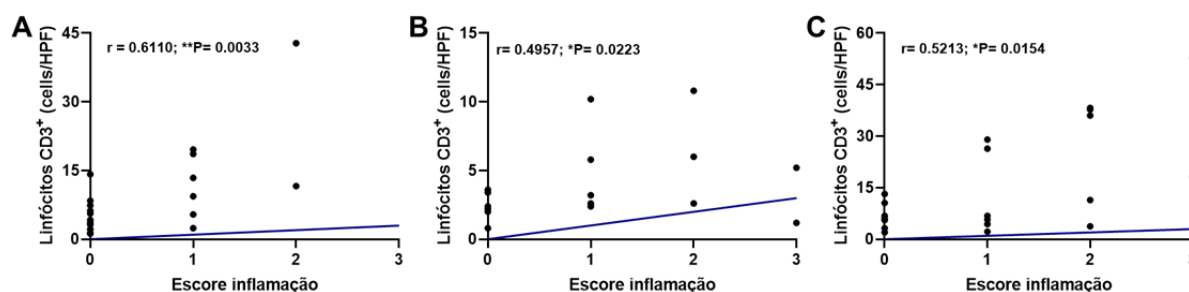
Fonte: Elaborado pelo autor.

Fig. 6. Gráficos de dispersão mostrando o número de linfócitos TCD3+ nas regiões hipofisárias de subpopulações do G1, as linhas horizontais representam os valores da mediana e do intervalo interquartil. (A) Na avaliação da *pars nervosa* foi retirado animal com maior número de células TCD3+, entre os cães infectados (G1; n=20), e quando comparado com o grupo controle (G2; n=5), a diferença estatística foi mantida (* P= 0,0441); (B) e (C) Na avaliação da *pars intermedia* e *pars distalis*, foi selecionada uma subpopulação de dez cães infectados (G1; n=10) com maior número de células TCD3+ em relação ao grupo controle (G2; n=5). Esta subpopulação de cães apresentou aumento significativo de células TCD3+, respectivamente (** P=0,0070) e (***) P=0,0007).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Fig. 7. Gráficos de dispersão demonstrando correlação positiva entre o escore de inflamação e a mediana da contagem de Linfócitos TCD3+ por região hipofisária do grupo infectado (G1) pelo teste de Spearman. (A) *Pars nervosa* ($r= 0,6110$; **P= 0,0033). (B) *Pars intermedia* ($r= 0,4957$; *P= 0,0223). (C) *Pars distalis* ($r= 0,5213$; *P= 0,0154).



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Discussão

Embora a LVC seja reconhecida como uma doença grave e sistêmica, há poucos estudos descrevendo as lesões neurológicas e suas complicações, incluindo o envolvimento da hipófise.

A avaliação imuno-histoquímica da hipófise de cães com LVC revelou a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em dois animais. Devido ao número reduzido de amastigotas no tecido hipofisário, a pesquisa do parasito não foi efetiva em cortes corados com HE. Entretanto, com a utilização da imuno-histoquímica, formas amastigotas imunomarcadas foram observadas dentro e fora do citoplasma de macrófagos na região da *pars intermedia* de dois cães. Este é o primeiro relato de amastigotas de *Leishmania* spp. na hipófise de cães e, semelhante ao encéfalo, existem poucos relatos da identificação por imuno-histoquímica das formas amastigotas de *L. infantum*, no plexo coróide e meninge, de cães naturalmente infectados (Font *et al.*, 2004; Grano *et al.*, 2019; Macau *et al.*, 2017; Márquez *et al.*, 2013; Oliveira, 2016).

Também, semelhante ao observado em estudos realizados no encéfalo de cães com LVC, a presença de inflamação não foi relacionada com a presença de formas amastigotas no tecido (Ikeda *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2009; Revest *et al.*, 2008; Santarém *et al.*, 2007). No entanto, o tecido nervoso também é acometido em cães com LVC, com ativação das células da glia, que pode estar diretamente relacionada à modulação da resposta inflamatória local e alteração da permeabilidade das barreiras (Melo e Machado, 2011).

Além de formas amastigotas do parasito, também observamos a presença de infiltrado inflamatório composto por células mononucleares (linfócitos, plasmócitos e macrófagos). Houve correlação entre a intensidade da inflamação e a quantidade de

linfócitos TCD3⁺ nas regiões hipofisárias analisadas, conforme demonstrado pela detecção imuno-histoquímica. O aumento da quantidade de linfócitos TCD3⁺ foi observado em todas as regiões hipofisárias do grupo infectado.

A presença de linfócitos na hipófise foi descrita em cães que apresentavam doenças concomitantes, como linfoma multicêntrico, osteoartrite, hiperplasia nodular em *pars distalis* e adenoma hipofisário. A resposta celular composta com predomínio de células TCD3⁺ pode caracterizar hipofisite linfocítica subclínica (Blomqvist *et al.*, 2020). Em seres humanos, a causa de hipofisite linfocítica permanece desconhecida, mas com base na natureza da inflamação, os linfócitos T são cruciais para o desenvolvimento da doença, e portanto, a hipótese é de que esta afecção seja de origem imunomediada (Bellastella *et al.*, 2003; Caturegli *et al.*, 2005; Falorni *et al.*, 2014; Grau-Roma *et al.*, 2017).

Na hipófise dos cães deste estudo, a maior intensidade de inflamação foi observada em *pars distalis* e *pars intermedia* da adeno-hipófise. Em seres humanos com hipofisite linfocítica, a adeno-hipófise também foi a área mais afetada (Fehn *et al.*, 1998). O processo autoimune ou imunomediado, possivelmente tem como alvo subtipos específicos de células hipofisárias, podendo causar danos em células secretoras de ACTH, FSH/LH ou TSH, localizadas na adeno-hipófise (Falorni *et al.*, 2014; Fehn *et al.*, 1998; Grau-Roma *et al.*, 2017).

Em seres humanos, são observados casos semelhantes de hipofisite linfocítica, destacando o fato de que a presença destas células inflamatórias na *pars distalis* e *pars nervosa* deve ser considerada patológica (Caturegli *et al.*, 2005; Gubbi *et al.*, 2019; Milligan *et al.*, 1984). A hipofisite linfocítica foi associada ao hipopituitarismo e hipoadrenocorticismo secundário, além da deficiência na produção do hormônio corticotrófico (ACTH) e cortisol, em cães (Wolfesberger *et al.* 2011). Também foi

considerada a provável causa determinante de morte súbita do cão (Adissu *et al.*, 2010; Blomqvist *et al.*, 2020; Miller *et al.*, 2018; Polledo *et al.*, 2018).

Plasmócitos também foram observados compondo a inflamação na hipófise dos cães. Este tipo celular foi observado na coloração HE das amostras de tecido hipofisário e, embora a presença de plasmócitos seja descrita em casos de hipofisite em humanos, em cães, aparentemente, este número é menor quando comparado ao de linfócitos TCD3⁺. Estas células não foram caracterizadas com auxílio da imunohistoquímica em nosso estudo, mas é uma célula típica da resposta inflamatória durante a LVC (Baneth *et al.*, 2008). Semelhante às avaliações realizadas nas hipofisites de seres humanos, mais estudos serão necessários para auxiliar no entendimento da função destas células nos casos de hipofisite linfocítica (Blomqvist *et al.*, 2020; Fehn *et al.*, 1998).

Não foi observada relação entre os estadiamentos clínicos de LVC apresentados pelos cães, segundo Mancianti *et al.* (1988), e a intensidade da inflamação no tecido hipofisário. Esses dados indicam que a inflamação da hipófise não está relacionada ao estadiamento clínico da LVC. Nossos achados corroboram com outros estudos realizados que analisaram alterações no encéfalo em animais com LVC, os quais também não houve correlação entre o estadiamento clínico da doença e a intensidade de inflamação no tecido nervoso (Grano *et al.*, 2018; Ikeda *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2009; Melo e Machado, 2009). Os cães avaliados foram naturalmente infectados e, portanto, um grupo heterogêneo em relação à fase da infecção, o que dificulta a compreensão da evolução das alterações inflamatórias da hipófise.

A resposta imune anti-*Leishmania* inclui a produção de várias citocinas (Baneth *et al.*, 2008), como o TNF- α , que pode regular o sistema endócrino, sendo capaz de

inibir a secreção de hormônios da hipófise, como o TSH (Pang *et al.*, 1989) e hormônio gonadotrófico (Walton e Cronin, 1989). Um caso de hipotireoidismo primário associado a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. foi relatado em um cão, associado com concentração alta de TNF- α , e possível influência na função do eixo hipotalâmico-hipofisário (Cortese *et al.*, 1999).

Em seres humanos com leishmaniose visceral, existem relatos de anormalidades endócrinas, como disfunção na secreção do hormônio antidiurético (ADH) e alterações no eixo hipotalâmico-hipofise-adrenal, hipofise-tireoide e hipofise-gonadas (Lima Verde *et al.*, 2011), que ainda precisam ser melhor investigadas no cão. Podemos inferir que a ocorrência de hipofisite na LVC também pode resultar na produção de citocinas, como o TNF- α , que podem ter ação local ou sistêmica, podendo interferir direta ou indiretamente na produção de hormônios hipofisários e contribuir para a modulação positiva ou negativa da resposta do hospedeiro à infecção (Lima Verde *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2013; Pang *et al.*, 1989; Walton e Cronin, 1989). Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos e a patogenia da LVC na hipófise e suas consequências para o quadro clínico do paciente.

3.4 Conclusão

Este é o primeiro relato da presença de amastigotas de *Leishmania* spp. na hipófise e o primeiro relato de hipofisite linfocítica em cães com LVC com imunomarcagem para linfócitos TCD3+. A presença de linfócitos TCD3+ e/ou do parasito na região hipofisária pode resultar em disfunção da glândula, e determinar o agravamento do estado clínico do paciente, comprometendo a eficiência do tratamento e do prognóstico.

3.5 Informações de Apoio

Fig. S1. Fotomicrografia representativa do controle positivo das reações de imunohistoquímica de cortes histológicos de tecido linfoide (linfonodo poplíteo) de cão positivo para LVC.

Fig. S2. Demonstração da contagem de células TCD3⁺ imunomarcadas com revelador 3,3'-diaminobezidina (DAKO) no software ImageJ 1.52^a.

Tabela S1. Classificação estabelecida de acordo com estadiamento clínico da LVC conforme Mancianti *et al.* (1988).

Tabela S2. Estadiamento clínico dos cães infectados (G1), em assintomáticos oligossintomáticos e sintomáticos.

Tabela S3. Porcentagem dos cães infectados (G1) e controle (G2) que apresentaram inflamação nas regiões hipofisárias, graduadas pela presença e intensidade.

Tabela S4. Dados brutos do experimento.

3.6 Referências

- Adissu, H.A., Hamel-Jolette, A., Foster, R.A., 2010. Lymphocytic adenohipophysitis and adrenalitis in a dog with adrenal and thyroid atrophy. *Vet. Pathol.* 47, 1082–1085. <https://doi.org/10.1177/0300985810382520>
- Baneth, G., 2006. Leishmaniasis, in: Greene, C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders, pp. 686–698.
- Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>

- Basaria, S., Ayala, A.R., Guerin, C., Dobs, A.S., 2000. A rare pituitary lesion. *J. Endocrinol. Invest.* 23, 189–192. <https://doi.org/10.1007/BF03343705>
- Bellastella, A., Bizzarro, A., Coronella, C., Bellastella, G., Sinisi, A.A., De Bellis, A., 2003. Lymphocytic hypophysitis: A rare or underestimated disease? *Eur. J. Endocrinol.* 149, 363–376. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1490363>
- Bentivoglio, M., Kristensson, K., Rottenberg, M.E., 2018. Circunventricular organs and parasite neurotropism: Neglected gates to the brain? *Front. Immunol.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02877>
- Blomqvist, M.A., Ley, C., Karlsson, H.K., Hanson, J.M., 2020. Presence of CD3+ and CD79a+ Lymphocytes in the Pituitary Gland of Dogs at Post-mortem Examination. *J. Comp. Pathol.* 176, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2020.02.010>
- Boggiatto, P.M., Ramer-Tait, A.E., Metz, K., Kramer, E.E., Gibson-Corley, K., Mullin, K., Hostetter, J.M., Gallup, J.M., Jones, D.E., Petersen, C.A., 2010. Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. *Clin. Vaccine Immunol.* 17, 267–273. <https://doi.org/10.1128/CVI.00456-09>
- Carson, F.L., Hladik, C., 2009. *Histotechnology – A self-Instructional Text*, 3rd ed. ASCP Press, Chicago.
- Caturegli, P., Newschaffer, C., Olivi, A., Pomper, M.G., Burger, P.C., Rose, N.R., 2005. Autoimmune hypophysitis. *Endocr. Rev.* 26, 599–614. <https://doi.org/10.1210/er.2004-0011>
- Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV [WWW Document], 2012. . Resolução nº 1000, 11 Maio 2012 - Dispõe sobre procedimentos e métodos eutanásia em outras Provid. URL <http://ts.cfmv.gov.br/manual/arquivos/resolucao/1000.pdf> (accessed 9.3.22).
- Cortese, L., Oliva, G., Ciaramella, P., Persechino, A., Restucci, B., 1999. Primary

- Hypothyroidism Associated with Leishmaniasis in a Dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 487–492. <https://doi.org/10.5326/15473317-35-6-487>
- Desjeux, P., 1992. Human leishmaniasis: Epidemiology and public health aspects. *World Heal. Stat. Q.* 45, 267–275.
- Duvernoy, H.M., Risold, P.Y., 2007. The circumventricular organs: An atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain Res. Rev.* 56, 119–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.06.002>
- Eiler, H., 2007. Endocrinologia, reprodução e lactação: Glândulas endócrinas, in: Reece, W.O. (Ed.), *Dukes - Fisiologia Dos Animais Domésticos*. Guanabara Koogan, pp. 577–643.
- Falorni, A., Minarelli, V., Bartoloni, E., Alunno, A., Gerli, R., 2014. Diagnosis and classification of autoimmune hypophysitis. *Autoimmun. Rev.* 13, 412–416. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.021>
- Fehn, M., Sommer, C., Lüdecke, D.K., Plöckinger, U., Saeger, W., 1998. Lymphocytic hypophysitis: Light and electron microscopic findings and correlation to clinical appearance. *Endocr. Pathol.* 9, 71–78. <https://doi.org/10.1007/BF02739954>
- Font, A., Mascort, J., Altimira, J., Closa, J.M., Vilafranca, M., 2004. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* 45, 199–201. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00224.x>
- Giannuzzi, A.P., Ricciardi, M., De Simone, A., Gernone, F., 2017. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *J. Small Anim. Pract.* 58, 125–138. <https://doi.org/10.1111/jsap.12650>
- Grano, F.G., José, J.E., Melo, G.D., de Souza, M.S., Lima, V.M.F., Machado, G.F., 2018. Toll-like receptors and cytokines in the brain and in spleen of dogs with

visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 253, 30–38.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.030>

Grano, F.G., Silva, J.E. dos S., Melo, G.D. de, Machado, G.F., 2019. Leishmania hide-and-see: Parasite amastigotes in the choroid plexus of a dog with neurological signs in an endemic municipality in Brazil. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Reports* 17, 100291. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100291>

Grau-Roma, L., Peckham, R., Paton, J., Stahel, A., de Brot, S., 2017. Occurrence of primary lymphocytic hypophysitis in two horses and presence of scattered T-lymphocytes in the normal equine pituitary gland. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 29, 115–121. <https://doi.org/10.1177/1040638716676292>

Greco, D., Stabenfeldt, G.H., 2004. Endocrinologia: O sistema endócrino, in: Cunningham, J.G. (Ed.), *Tratado de Fisiologia Veterinária*. Guanabara Koogan, pp. 333–349.

Gubbi, S., Hannah-Shmouni, F., Verbalis, J.G., Koch, C.A., 2019. Hypophysitis: An update on the novel forms, diagnosis and management of disorders of pituitary inflammation. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 33, 101371. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.101371>

Guyton, A.C., Hall, J.E. (Eds.), 2011. *Endocrinologia e reprodução: Hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo*, in: Guyton & Hall - *Tratado de Fisiologia Médica*. Elsevier, Rio de Janeiro, pp. 941–953.

Ikeda, F.A., Laurenti, M.D., Corbett, C.E., Feitosa, M.M., Machado, G.F., Perri, S.H.V., 2007. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 44, 5–11. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26653>

- Kaur, C., Ling, E.A., 2017. The circumventricular organs. *Histol. Histopathol.* 32, 879–892. <https://doi.org/10.14670/HH-11-881>
- Lima, V.M.F., Gonçalves, M.E., Ikeda, F.A., Luvizotto, M.C.R., Feitosa, M.M., 2003. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 36, 485–489. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2003000400010>
- Lima Verde, F.A., Lima Verde, F.A.A., Saboia Neto, A., Almeida, P.C., Lima Verde, E.M., 2011. Hormonal disturbances in visceral leishmaniasis (kala-azar). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84, 668–673. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.09-0171>
- Macau, W.L., Cortez de Sá, J., da Silva, A.P. de C., Rocha, A.L., Mondêgo-Oliveira, R., de Andrade, F.H.E., Cunha, C.M., Calabrese, K. da S., Abreu-Silva, A.L., 2017. Main lesions in the central nervous system of dogs due to *Leishmania infantum* infection. *BMC Vet. Res.* 13, 1–4. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1174-5>
- Madeira, I.M.V.M., Pereira, D.M.O., Sousa, A.A., Vilela, C.A., Amorim, I.F.G., Caliari, M. V., Souza, C.C., Tafuri, W.L., 2016. Immunohistochemical study of hepatic fibropoiesis associated with canine visceral leishmaniasis. *Int. J. Exp. Pathol.* 97, 139–149. <https://doi.org/10.1111/iep.12179>
- Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., 1988. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566–567. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(88\)90510-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90510-X)
- Márquez, M., Pedregosa, J.R., López, J., Marco-Salazar, P., Fondevila, D., Pumarola, M., 2013. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 25, 142–146. <https://doi.org/10.1177/1040638712466728>

- Mastorakos, P., McGavern, D., 2019. The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. *Sci. Immunol.* 4, 1–15. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aav0492>
- Maurício, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol. Today* 16, 188–189. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01637-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01637-9)
- Melo, G.D., Machado, G.F., 2011. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: Correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. *Cell Tissue Res.* 346, 293–304. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1290-7>
- Melo, G.D., Machado, G.F., 2009. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral leishmaniasis : a histopathological investigation. *Brazilian J. Vet. Pathol.* 2, 69–74.
- Melo, G.D., Marcondes, M., Vasconcelos, R.O., Machado, G.F., 2009. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.* 162, 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.002>
- Melo, G.D., Seraguci, T.F., Schweigert, A., Silva, J.E.S., Grano, F.G., Peiró, J.R., Lima, V.M.F., Machado, G.F., 2013. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. *Vet. Parasitol.* 192, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.002>
- Miller, M.A., Bruyette, D.S., Scott-Moncrieff, J.C., Owen, T.J., Ramos-Vara, J.A., Weng, H.Y., Vanderpool, A.L., Chen, A. V., Martin, L.G., DuSold, D.M., Jahan, S., 2018. Histopathologic Findings in Canine Pituitary Glands. *Vet. Pathol.* 55, 871–879. <https://doi.org/10.1177/0300985818766211>

- Milligan, S.A., Katz, M.S., Craven, P.C., Strandberg, D.A., Russell, I.J., Becker, R.A., 1984. Toxoplasmosis presenting as panhypopituitarism in a patient with the acquired immune deficiency syndrome. *Am. J. Med.* 77, 760–764. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(84\)90381-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(84)90381-4)
- Nolli, C., 1999. Canine leishmaniasis, in: *The World's Leading Authority on Pet Care and Nutrition*. Itália, pp. 23–24.
- Oliveira, V., 2016. Ocorrência de *Leishmania infantum* em sistema nervoso central de cães naturalmente infectados: lesões associadas e isolamento parasitológico de tecidos e líquido.
- Pang, X.P., Hershman, J.M., Mirell, C.J., Pekary, A.E., 1989. Impairment of hypothalamic-pituitary-thyroid function in rats treated with human recombinant tumor necrosis factor- α (cachectin). *Endocrinology* 125, 76–84. <https://doi.org/10.1210/endo-125-1-76>
- Petito, C.K., Adkins, B., 2005. Choroid plexus selectively accumulates T-lymphocytes in normal controls and after peripheral immune activation. *J. Neuroimmunol.* 162, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.12.020>
- Polledo, L., Grinwis, G.C.M., Graham, P., Dunning, M., Baiker, K., 2018. Pathological Findings in the Pituitary Glands of Dogs and Cats. *Vet. Pathol.* 55, 880–888. <https://doi.org/10.1177/0300985818784162>
- Prete, A., Salvatori, R., 2000. Hypophysitis., in: Feingold, K.R., Anawalt, B., Boyce, A., Chrousos, G., de Herder, W.W., Dhatariya, K., Dungan, K., Hershman, J.M., Hofland, J., Kalra, S., Kaltsas, G., Koch, C., Kopp, P., Korbonits, M., Kovacs, C.S., Kuohung, W., Laferrère, B., Levy, M., McGee, E.A., McLachlan, R., Morley, J.E., New, M., Purnell, J., Sahay, R., Singer, F., Sperling, M.A., Stratakis, C.A., Trencé, D.L., Wilson, D.P. (Eds.), . South Dartmouth (MA).

- Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Corrêa-Oliveira, R., 2009. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>
- Revest, M., Donaghy, L., Cabillic, F., Guiguen, C., Gangneux, J.P., 2008. Comparison of the immunomodulatory effects of *L. donovani* and *L. major* excreted-secreted antigens, particulate and soluble extracts and viable parasites on human dendritic cells. *Vaccine* 26, 6119–6123. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.005>
- Rosa, F.A., Leite, J.H.A., Braga, E.T., Moreira, P.R.R., Baltazar, F.H., Biondo, A.W., Padua, P.P.M., Vasconcelos, R.O., Camacho, A.A., Ferreira, W.L., Machado, G.F., Marcondes, M., 2014. Cardiac Lesions in 30 Dogs Naturally Infected With *Leishmania infantum chagasi*. *Vet. Pathol.* 51, 603–606. <https://doi.org/10.1177/0300985813493914>
- Santarém, N., Silvestre, R., Tavares, J., Silva, M., Cabral, S., Maciel, J., Cordeiro-Da-Silva, A., 2007. Immune response regulation by *Leishmania* secreted and nonsecreted antigens. *J. Biomed. Biotechnol.* 2007, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2007/85154>
- Saúde, M. da, 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.
- Schaefer, S., Boegershausen, N., Meyer, S., Ivan, D., Schepelmann, K., Kann, P.H., 2008. Hypothalamic-pituitary insufficiency following infectious diseases of the central nervous system. *Eur. J. Endocrinol.* 158, 3–9. <https://doi.org/10.1530/EJE-07-0484>

- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2007. Parasites of dogs and cats: Parasites of the liver, in: Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. (Eds.), *Veterinary Parasitology*. Blackwell Pub, pp. 980–983.
- Tizard, I.R., 2014. Linfócitos T auxiliares e sua resposta aos antígenos: O receptor de antígeno do linfócito T, in: Tizard, I.R. (Ed.), *Imunologia Veterinária*. Elsevier Ltda, Rio de Janeiro, pp. 304–333.
- Walton, P.E., Cronin, M.J., 1989. Tumor necrosis factor- α inhibits growth hormone secretion from cultured anterior pituitary cells. *Endocrinology* 125, 925–929. <https://doi.org/10.1210/endo-125-2-925>
- Wolfesberger, B., Fuchs-Baumgartinger, A., Schwendenwein, I., Zeugswetter, F., Shibly, S., 2011. Sudden Death in a Dog with Lymphoplasmacytic Hypophysitis. *J. Comp. Pathol.* 145, 231–234. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.004>
- World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniasis. World Health Organ. Tech. Rep. Ser. 22–26.

APÊNDICE A - REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ADISSU, H. A.; HAMEL-JOLETTE, A.; FOSTER, R. A. Lymphocytic adenohypophysitis and adrenalitis in a dog with adrenal and thyroid atrophy. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 47, n. 6, p. 1082-1085, 2010. DOI: 10.1177/0300985810382520. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985810382520>. Acesso em: 3 fev. 2022.

AIYAN, A. A.; MENON, P.; ALDARWICH, A.; ALMUHAIRI, F.; ALNUAIMI, S.; BULSHAWAREB, A.; QABLAN, M.; SHEHAB, S. Descriptive analysis of cerebral arterial vascular architecture in dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Frontiers in Neuroanatomy**, Lausanne, v. 13, artigo 67, 13 p., 2019. DOI: 10.3389/fnana.2019.00067. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2019.00067/full>. Acesso em: 24 fev. 2022.

ALRAHMAN, H. M. A.; SHEHAN, N. A.; SAUD, Z. A. H. Anatomical and histological characteristics of pituitary gland in domestic animals. **Multidisciplinary Reviews**, Mossoró, v. 5, n. 2, artigo e2022010, 6 p., 2022. DOI: 10.31893/multirev.2022010. Disponível em: <https://malque.pub/ojs/index.php/mr/article/view/299>. Acesso em: 24 fev. 2022.

AMAR, A. P.; WEISS, M. H. Pituitary anatomy and physiology. **Neurosurgery Clinics of North America**, Philadelphia, v. 14, n. 1, p. 11-23, 2003. DOI: 10.1016/s1042-3680(02)00017-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12690976/>. Acesso em: 5 jan. 2021.

ANYOGU, D. C.; SHOYINKA, S. V. O.; IHEDIOHA, J. I. Brain and pituitary-adrenal lesions of *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma congolense* infections in the West African Dwarf rams: Is trypanotolerance overrated? **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 59, n. 5, p. 773-781, 2022. DOI: 10.1177/03009858221100432. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/03009858221100432>. Acesso em: 7 set. 2022.

BAKER, M. A. A brain-cooling system in mammals. **Scientific American**, New York, v. 240, n. 5, p. 130-139, 1979. DOI: 10.1038/scientificamerican0579-130. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/451531/>. Acesso em: 23 abr. 2021.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L.; BORDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008. DOI: 10.1016/j.pt.2008.04.001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18514028/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

BANETH, G. Leishmaniasis. *In*: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2006. Cap. 73, p. 686-698.

BANKS, W. A. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 15, n. 4, p. 275-292, 2016. DOI: 10.1038/nrd.2015.21. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd.2015.21>. Acesso em: 23 abr. 2021.

BAPTISTA, B.; CASIAN, A.; GUNAWARDENA, H.; D'CRUZ, D.; RICE, CM. Neurological manifestations of IgG4-related disease. **Current Treatment Options in Neurology**, Philadelphia, v. 19, n. 4, artigo 14, 25 p., 2017. DOI: 10.1007/s11940-017-0450-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28374231/>. Acesso em: 20 set. 2022.

BARROS-GONÇALVES, T. D.; SAAVEDRA, A. F.; SILVA-COUTO, L.; RIBEIRO-ROMÃO, R. P.; BEZERRA-PAIVA, M.; GOMES-SILVA, A.; CARVALHO, V. F.; CRUZ, A. M.; PINTO, E. F. Increased levels of cortisol are associated with the severity of experimental visceral leishmaniasis in a leishmania (L.) infantum hamster model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 15, n. 11, artigo e0009987, 17 p., 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009987. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0009987>. Acesso em: 23 abr. 2021.

BELLASTELLA, A.; BIZARRO, A.; CORONELLA, C.; BELLASTELLA, G.; SINISI, A. A.; BELLIS, A. Lymphocytic hypophysitis: a rare or underestimated disease? **European Journal of Endocrinology**, Oslo, v. 149, n. 5, p. 363-376, 2003. DOI: 10.1530/eje.0.1490363. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14585081/>. Acesso em: 15 ago. 2021.

BEN ABID, F.; ABUKHATTAB, M.; KARIM, H.; AGAB, M.; AL-BOZOM, I.; IBRAHIM, W. H. Primary pituitary tuberculosis revisited. **American Journal of Case Reports**, Smithtown, v. 18, p. 391-394, 2017. DOI: 10.12659/ajcr.903233. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28400550/>. Acesso em: 20 set. 2020.

BENTIVOGLIO, M.; KRISTENSSON, K.; ROTTENBERG, M. E. Circumventricular organs and parasite neurotropism: neglected gates to the brain? **Frontiers in Immunology**, Lasanne, v. 9, artigo 2877, 9 p., 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02877. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30619260/>. Acesso em: 10 out. 2020.

BLACK, E. A. E.; CANCELLIERE, N. M.; FERGUSON, A. V. Regulation of nervous system function by circumventricular organs. In: IKEZU, T.; GENDELMAN, H. E. (Eds.). **Neuroimmune pharmacology**. 2. ed. [Heidelberg]: Springer, 2017. p. 25-37. DOI: 10.1007/978-3-319-44022-4_3. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/311857873_Regulation_of_Nervous_System_Function_by_Circumventricular_Organs. Acesso em: 15 nov. 2022.

BLOMQVIST, M. A.; LEY, C.; KARLSSON, H. K.; HANSON, J. M. Presence of CD3+ and CD79a+ lymphocytes in the pituitary gland of dogs at post-mortem examination. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 176, p. 116-121, 2020. DOI: 10.1016/j.jcpa.2020.02.010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32359623/>. Acesso em: 3 out. 2021.

BOGGIATTO, P. M.; RAMER-TAIT, A. E.; METZ, K.; KRAMER, E. E.; GIBSON-CORLEY, K.; MULLIN, K.; HOSTETTER, J. M.; GALLUP, J. M.; JONES, D. E.; PETERSEN, C. A. Immunologic indicators of clinical progression during Canine *Leishmania infantum* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, DC, v. 17, n. 2, p. 267-273, 2010. DOI: 10.1128/CVI.00456-09. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20032217/>. Acesso em: 15 out. 2020.

BOTTASSO, O.; MORALES-MONTOR, J. Neuroimmunomodulation during infectious diseases: Mechanisms, causes and consequences for the host. **NeuroImmunoModulation**, Basel, v. 16, n. 2, p. 65–67, 2009. DOI: 10.1159/000180260. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19212125/>. Acesso em: 18 set. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Boletim eletrônico Epidemiológico: Leishmanioses**, Brasília-DF, v. 2, n. 6, 13 dez. 2002. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano02_n06.pdf. Acesso em: 28 nov. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF, 2014.

CARDINOT, C. B.; SILVA, J. E. S.; YAMATOJI, R. S.; NUNES, C. M.; BIONDO, A. W.; VIEIRA, R. F. C.; ARAUJO JUNIOR, J. P. A.; MARCONDES, M. Detection of Ehrlichia canis, Babesia vogeli, and Toxoplasma gondii DNA in the brain of dogs naturally infected with Leishmania infantum. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 102, n. 2, p. 275-279, 2016. DOI: 10.1645/15-821. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26765523/>. Acesso em: 5 set. 2020.

CATUREGLI, P.; NEWSCHAFFER, C.; OLIVI, A.; POMPER, M. G.; BURGER, P. C.; ROSE, N. R. Autoimmune hypophysitis. **Endocrine Reviews**, Chevy Chase, v. 26, n. 5, p. 599-614, 2005. DOI: 10.1210/er.2004-0011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15634713/>. Acesso em: 10 set. 2021.

CHEN, Y.; McCARRON, R. M.; AZZAM, N.; BEMBRY, J.; REUTZLER, C.; LENZ, F. A.; SPATZ, M. Endothelin-1 and nitric oxide affect human cerebrovascular endothelial responses and signal transduction. **Acta Neurochirurgica. Supplementum**, Wien, v. 76, p. 131-135, 2000. DOI: 10.1007/978-3-7091-6346-7_27. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11449992/>. Acesso em: 13 set. 2022.

DAHER, E. F.; SOARES, D. S.; PARENTE FILHO, S. L. A.; MENESES, G. C.; FREITAS, T. V. S.; LEITE, T. T.; SILVA JUNIOR, G. B. S. Hyponatremia and risk factors for death in human visceral leishmaniasis: New insights from a cross-sectional study in Brazil. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 17, n. 1, artigo 168, 8 p., 2017. DOI: 10.1186/s12879-017-2257-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28231825/>. Acesso em: 20 set. 2021.

DANIEL, P. M. Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. **Journal of Clinical Pathology. Supplement (Association of Clinical Pathologists)**, London, v. 7, 7 p.,

1976. DOI: 10.1136/jcp.s1-7.1.1. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1073162/>. Acesso em: 15 ago. 2022.

DEDET, J. P.; PRATLONG, F. Protozoan infections: Leishmaniasis. *In*: COOK, G. C.; ZUMLA, A. I. **Manson's tropical diseases**. 22. ed. Amsterdam: Elsevier, 2009. Cap. 77, p. 1341-1366.

DELLMAN, H. D. Structure of the subfornical organ: a review. **Miscroscopy Research and Technique**, New York, v. 41, n. 2877, p. 85-97, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19980415)41:2<85::AID-JEMT1>3.0.CO;2-P. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9579597/>. Acesso em: 15 ago. 2022.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics Quarterly**, Genève, v. 45, n. 2-3, p. 267-275, 1992.

ENGELHARDT, B.; SOROKIN, L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. **Seminars in Immunopathology**, Berlin, v. 31, n. 4, p. 497-511, 2009. DOI: 10.1007/s00281-009-0177-0. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19779720/>. Acesso em: 15 ago. 2022.

EVANS, H. E. The heart and arteries. *In*: EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 586-682.

FLETCHER, T. F. Spinal cord and meninges. *In*: EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 559-585.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, C. G.; BLANCO, A.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 18, n. 11, p. 539-546, 1996. DOI: 10.1046/j.1365-3024.1996.d01-28.x. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3024.1996.d01-28.x>. Acesso em: 18 set. 2021.

GIANNUZZI, A. P.; RICCIARDI, M.; SIMONE, A.; GERNONE, F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 125-138, 2017. DOI: doi: 10.1111/jsap.12650. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsap.12650>. Acesso em: 18 set. 2021.

GRANO, F. G.; SILVA, J. E. S.; MELO, G. D.; MACHADO, G. F. Leishmania hide-and-see: parasite amastigotes in the choroid plexus of a dog with neurological signs in an endemic municipality in Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, Amsterdam, v. 17, artigo 100291, 4 p., ago. 2019. DOI: 10.1016/j.vprsr.2019.100291. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405939019300383>. Acesso em: 18 set. 2021.

GRANO, F. G.; MELO, G. D.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; GÓMEZ-NIETO, L. C.; MACHADO, G. F. First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of

naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 204, n. 3-4, p.376-380, 2014. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.05.015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714002945>. Acesso em: 15 set. 2021.

GRIMALDI, J. R.; TESH, R. B.; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 41, n. 6, p. 687-725, 1989. DOI: 10.4269/ajtmh.1989.41.687. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2701633/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

GUBBI, S.; HANNAH-SHMOUNI, F.; VERBALIS, J. G.; KOCH, C. A. Hypophysitis: an update on the novel forms, diagnosis and management of disorders of pituitary inflammation. **Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism**, Amsterdam, v. 33, n. 6, artigo 101371, 26 p., 2019. DOI: 10.1016/j.beem.2019.101371. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31866206/>. Acesso em: 2 nov. 2021.

HATTON, G. I. Pituicytes, glia and control of terminal secretion. **Journal of Experimental Biology**, London, v. 139, p. 67-79, 1988. DOI: 10.1242/jeb.139.1.67. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3062122/>. Acesso em: 2 nov. 2021.

HELMREICH, D. L.; PARFITT, D. B.; LU, X.-Y.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Relation between the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) axis and the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis during repeated stress. **Neuroendocrinology**, Basel, v. 81, n. 3, p. 183-192, 2005. DOI: 10.1159/000087001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16020927/>. Acesso em: 2 nov. 2021.

HIGASHI, A. Y.; HIGASHI, T.; FURUSE, K.; OZEKI, K.; FURUSE, M.; CHIBA, H. Claudin-9 constitutes tight junctions of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, artigo 21642, 14 p., 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-01004-z. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-01004-z>. Acesso em: 2 nov. 2021.

HONG, G. K.; PAYNE, S. C.; JANE JR, J. A. Anatomy, physiology, and laboratory evaluation of the pituitary gland. **Otolaryngologic Clinics of North America**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 21-32, 2016. DOI: 10.1016/j.otc.2015.09.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26614827/>. Acesso em: 15 ago. 2022.

HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniasis. **Parasitology**, London, v. 144, n. 1, p. 95-115, 2017. DOI: 10.1017/S003118201600055X. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27094260/>. Acesso em: 28 jul. 2021.

IKEDA, F. A.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; FEITOSA, M. M.; MACHADO, G. F.; PERRI, S. H. V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 5-11, 2007. DOI: 10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2007.26653. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26653>. Acesso em: 15 set. 2021.

JANSSON, D.; SCOTTER, E. L.; RUSTENHOVEN, J.; COPPIETERS, N.; SMYTH, L. C. D.; OLDFIELD, R. L.; BERGIN, P. S.; MEE, E. W.; GRAHAM, E. S.; FAULL, R. L. M.; DRAGUNOW, M. Interferon- γ blocks signalling through PD β FR in human brain pericytes. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 13, artigo 249, 19 p., 2016. DOI: 10.1186/s12974-016-0722-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27654972/>. Acesso em: 15 set. 2022.

JOHNSON, A. K.; GROSS, P. M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 7, n. 8, p. 678-686, 1993. DOI: 10.1096/fasebj.7.8.8500693. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8500693/>. Acesso em 15 set. 2022.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. **Histologia básica: texto e atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

KAUR, C.; LING, E.-A. The circumventricular organs. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 32, n. 9, p. 879-892, 2017. DOI: 10.14670/HH-11-881. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28177105/>. Acesso em: 15 set. 2022.

KELLEY, K. W.; SHIMADA, A. Neuroinflammation and the blood-brain interface: new findings in brain pathology. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, Richmond, v. 11, n. 1, p. 16-20, 2020. DOI: 10.1111/cen3.12558. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cen3.12558>. Acesso em: 22 set. 2022.

KIELTYKA-KURC, A.; FRACKOWIAK, H.; BRUDNICKI, W. The arteries of brain base in species of the cervid family. **Anatomical Record**, Hoboken, v. 298, n. 4, p. 735-740, 2015. DOI: 10.1002/ar.23096. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25399744/>. Acesso em: 15 set. 2022.

KIPPENES, H.; GAVIN, P. R.; KRAFT, S. L.; SANDE, R. D.; TUCKER, R. L. Mensuration of the normal pituitary gland from magnetic resonance images in 96 dogs. **Veterinary Radiology and Ultrasound**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 130-133, 2001. DOI: 10.1111/j.1740-8261.2001.tb00915.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1740-8261.2001.tb00915.x>. Acesso em: 20 set. 2022.

KROUT, K. E.; KAWANO, J.; METTENLEITER, T. C.; LOEWY, A. D. CNS inputs to the suprachiasmatic nucleus of the rat. **Neuroscience**, Oxford, v. 110, n. 1, p. 73-92, 2002. DOI: 10.1016/s0306-4522(01)00551-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11882374/>. Acesso em: 20 set. 2022.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *In*: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. Cap. 1, p. 2-104.

LANGLOIS, F.; VARLAMOV, E. V.; FLESERIU, M. Hypophysitis, the growing spectrum of a rare pituitary disease. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Cary,

v. 107, n. 1, p. 10-28, 2022. DOI: 10.1210/clinem/dgab672. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34528683/>. Acesso em: 15 set. 2022.

LAU, L. T.; YU, A. CH. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. **Journal of Neurotrauma**, Larchmont, v. 18, n. 3, p. 351-359, 2001. DOI: 10.1089/08977150151071035. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11284554/>. Acesso em: 14 jul. 2022.

LI, L.; ZHANG, H.; VARRIN-DOYER, M.; ZAMVIL, S. S.; VERKMAN, A. S. Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 25, n. 5, p. 1556-1566, 2011. DOI: 10.1096/fj.10-177279. Disponível em: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.10-177279>. Acesso em: 15 jul. 2022.

LO, A. C.; CHEN, A. Y. S.; HUNG, V. K. L.; YAW, L. P.; FUNG, M. K. L.; HO, M. C. Y.; TSANG, M. C. S.; CHUNG, S. S. M.; CHUNG, S. K. Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in astrocytic end-feet. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, New York, v. 25, n. 8, p. 998-1011, 2005. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600108. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15815585/>. Acesso em 15 jul. 2022.

MACAU, W. L.; SÁ, J. C.; SILVA, A. P. C.; ROCHA, A. L.; MONDÊGO-OLIVEIRA, R.; ANDRADE, F. H. E.; CUNHA, C. M.; CALABRESE, K. S.; ABREU-SILVA, A. L. Main lesions in the central nervous system of dogs due to *Leishmania infantum* infection. **BMC Veterinary Research**, London, v. 13, artigo 255, 4 p., 2017. DOI: 10.1186/s12917-017-1174-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28821261/>. Acesso em: 20 set. 2021.

MARCHETTI, L.; ENGERLHARDT, B. Immune cell trafficking across the blood-brain barrier in the absence and presence of neuroinflammation. **Vascular Biology**, Bristol, v. 2, n. 1, p. H1-H18, 2020. DOI: 10.1530/VB-19-0033. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32923970/>. Acesso em: 15 jun. 2022.

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J. R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 25, n. 1, p. 142-146, 2012. DOI: 10.1177/1040638712466728. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23166183/>. Acesso em: 2 set. 2021.

MASTORAKOS, P.; MCGAVERN, D. The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. **Science Immunology**, Washington, DC, v. 4, n. 37, artigo eaav0492, 29 p., 2019. DOI: 10.1126/sciimmunol.aav0492. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31300479/>. Acesso em: 15 set. 2022.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000. DOI:

10.1016/s0169-4758(00)01637-9. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10782075/>. Acesso em: 23 mar. 2021.

MEIJ, B. P.; VOORHOUT, G.; GERRITSEN, R. J.; GRINWIS, G. C. M.; IJZER, J. Lymphocytic hypophysitis in a dog with diabetes insipidus. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 147, n. 4, p. 503-507, 2012. DOI: 10.1016/j.jcpa.2012.04.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22789859/>. Acesso em: 2 abr. 2022.

MELO, G. D.; SILVA, J. E.; GRANO, F. G.; SOUZA, M. S.; MACHADO, G. F. Leishmania infection and neuroinflammation: specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally- infected dogs. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 289, p. 21-29, 2015. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2015.10.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26616868/>. Acesso em: 2 abr. 2022.

MILLER, M. A.; BRUYETTE, D. S.; SCOTT-MONCRIEFF, J. C.; OWEN, T. J.; RAMOS-VARA, J. A.; WENG, H.-Y.; VANDERPOOL, A. L.; CHEN, A. V.; MARTIN, L. G.; DUSOLD, D. M.; JAHAN, S. Histopathologic findings in canine pituitary glands. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 55, n. 6, p. 871-879, 2018. DOI: 10.1177/0300985818766211. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985818766211>. Acesso em: 14 nov. 2021.

MORITA, S.; FURUBE, E.; MANNARI, T.; OKUDA, H.; TATSUMI, K.; WANAKA, A.; MIYATA, S. Heterogeneous vascular permeability and alternative diffusion barrier in sensory circumventricular organs of adult mouse brain. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 363, n. 2, p. 497-511, 2016. DOI: 10.1007/s00441-015-2207-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26048259/>. Acesso em: 19 nov. 2021.

MÜLLER, I.; PEDRAZZINI, T.; FARRELL, J. P.; LOUIS, J. T-Cell responses and immunity to experimental infection with *Leishmania major*. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 7, p. 561-578, 1989. DOI: 10.1146/annurev.iy.07.040189.003021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2653376/>. Acesso em: 19 nov. 2021.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, Puteaux, v. 9, n. 2, p. 16-24, 1999.

OLIVEIRA, V. C.; BOECHAT, V. C.; MENDES JUNIOR, A. A. V.; MADEIRA, M. F.; FERREIRA, L. C.; FIGUEIREDO, F. B.; CAMPOS, M. P.; RODRIGUES, F. C. C.; OLIVEIRA, R. V. C.; AMENDOEIRA, M. R. R.; MENEZES, R. C. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **Plos One**, San Francisco, v. 12, n. 4, artigo e0175588, 15 p. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0175588. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28419136/>. Acesso em: 2 nov. 2021.

OLIVEIRA, V. C. **Ocorrência de *Leishmania infantum* em sistema nervoso central de cães naturalmente infectados**: lesões associadas e isolamento parasitológico de tecidos e líquido. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2016.

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Control of the leishmaniasis**. Geneva: OMS, 2010. (WHO Technical Report Series).

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmanioses: informe epidemiológico nas Américas. **Leishmaniasis Report**, n. 9, dez. 2020. Washington, D.C.: OPAS, 2020.

PEREZ-CASTRO, C.; RENNER, U.; HAEDO, M. R.; STALLA, G. K.; ARZT, E. Cellular and molecular specificity of pituitary gland physiology. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 92, n. 1, p. 1-38, 2012. DOI: 10.1152/physrev.00003.2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22298650/>. Acesso em: 15 set. 2022.

PÓCSAI, K.; KÁLMÁN, M. Glial and perivascular structures in the subfornical organ: distinguishing the shell and core. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Thousand Oaks, v. 63, n. 5, p. 367-383, 2015. DOI: 10.1369/0022155415575027. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25673286/>. Acesso em: 15 set. 2022.

POLLEDO, L.; GRINWIS, G. C. M.; GRAHAM, P.; DUNNING, M.; BAIKER, K. Pathological findings in the pituitary glands of dogs and cats. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v. 55, n. 6, p. 880-888, 2018. DOI: 10.1177/0300985818784162. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29929454/>. Acesso em: 19 set. 2022.

POW, D. V.; PERRY, V. H.; MORRIS, J. F.; GORDON, S. Microglia in the neurohypophysis associate with and endocytose terminal portions of neurosecretory neurons. **Neuroscience**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 567-578, 1989. DOI: 10.1016/0306-4522(89)90409-0. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0306452289904090>. Acesso em: 2 nov. 2022.

RAO, S.; MAHADEVAN, A.; MAITI, T.; RANJAN, M.; SHWETHA, S. D.; ARIVAZHAGAN, A.; SAINI, J. Granulomatous and lymphocytic hypophysitis – are they immunologically distinct? **Apmis: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 124, n. 12, p. 1072-1077, 2016. DOI: 10.1111/apm.12603. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27704605/>. Acesso em: 15 abr. 2022.

REDECKER, P. Golgi-like immunostaining of pituicytes and tanocytes positive for glial fibrillary acidic protein in the neurohypophysis of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). **Histochemistry**, Berlim, v. 87, n. 6, p. 585-595, 1987. DOI: 10.1007/BF00492475. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3692925/>. Acesso em: 18 jun. 2022.

SEYAMA, S.; PEARL, G. S.; TAKEI, Y. Ultrastructural study of the human neurohypophysis. III. Vascular and perivascular structures. **Cell and Tissue Research**, Berlim, v. 206, n. 2, p. 291-302, 1980. DOI: 10.1007/BF00232773. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7388893/>. Acesso em: 19 set. 2022.

SHIMOZAKO, H. J.; WU, J.; MASSAD, E. Mathematical modelling for Zoonotic Visceral Leishmaniasis dynamics: a new analysis considering update parameters and notified human Brazilian data. **Infectious Disease Modelling**, Beijing, v. 2, n. 2, p.

143-160, 2017. DOI: 10.1016/j.idm.2017.03.002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29928734/>. Acesso em: 15 set. 2022.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. Parasites of dogs and cats: parasites of the liver. *In*: TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Veterinary parasitology**. 3. ed. Oxford: Blackwell, 2007. Cap. 6, p. 980-983.

TIZARD, I. R. Imunidade a parasitas: imunidade a protozoários. *In*: TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 9 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 27, p. 672-673.

VALA, H.; MESQUITA, J. R.; ESTEVES, F.; SANTOS, C.; CRUZ, R.; MEGA, C.; NÓBREGA, C. The endocrine glands in the dog: from the cell to hormone. *In*: PAYAN-CARREIRA, R. (Ed.). **Insights from veterinary medicine**. London: IntechOpen, 2013. DOI: 10.5772/53577. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/43183>. Acesso em: 15 set. 2022.

VAN DER VLUGT-MEIJER, R.H.; VOORHOUT, G.; MEIJ, B. P. Imaging of the pituitary gland in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 197, n. 1-2, p. 81-87, 2002. DOI: 10.1016/s0303-7207(02)00282-4. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/12431800>. Acesso em: 03 abr. 2022.

VERDE, F. A. L.; VERDE, F. A. A. L.; SABOIA NETO, A.; ALMEIDA, P. C.; VERDE, E. M. L. Hormonal disturbances in visceral leishmaniasis (kala-azar). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 84, n. 5, p. 668-673, 2011. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.09-0171. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21540373/>. Acesso em: 17 nov. 2021.

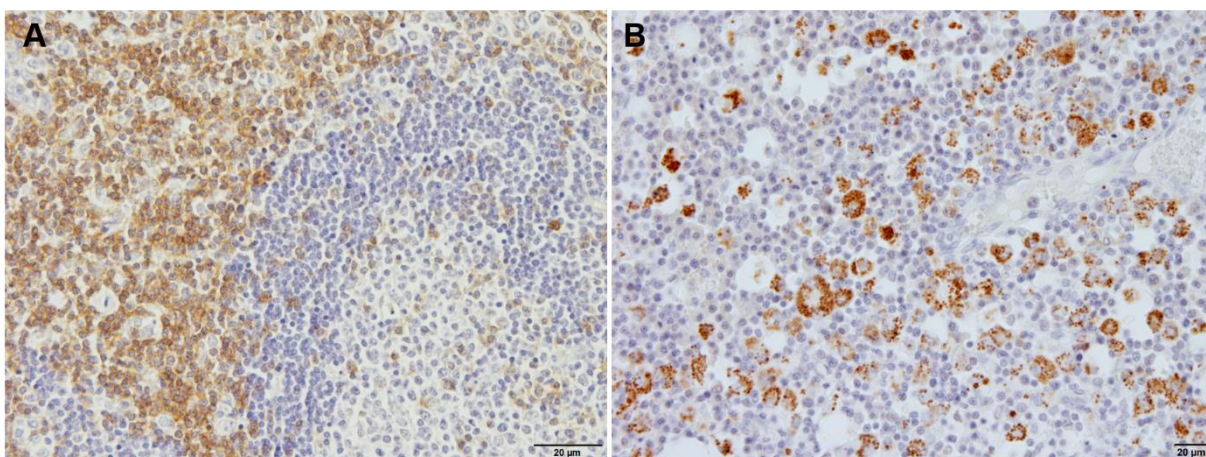
WITTKOWSKI, W. Tanycytes and pituicytes: morphological and functional aspects of neuroglial interaction. **Microscopy Research and Technique**, Hoboken, v. 41, n. 1, p. 29-42, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19980401)41:1<29::AID-JEMT4>3.0.CO;2-P. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9550135/>. Acesso em: 16 set. 2022.

WOLFESBERGER, B.; FUCHS-BAUMGARTINGER, A.; SCHWENDENWEIN, I.; ZEUGSWETTER, F.; SHIBLY, S. Sudden death in a dog with lymphoplasmacytic hypophysitis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 145, n. 2-3, p. 231-234, 2011. DOI: 10.1016/j.jcpa.2011.01.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21392780/>. Acesso em: 3 abr. 2022.

ZGUIGAL, H. Angioarchitecture of the nasal cavity and the carotid rete-cavernous sinus complex and their functional significance in the camel (*Camelus dromedarius*). 197 f. Dissertação (Doutorado em Filosofia) - Iowa State University, Iowa, 1988.

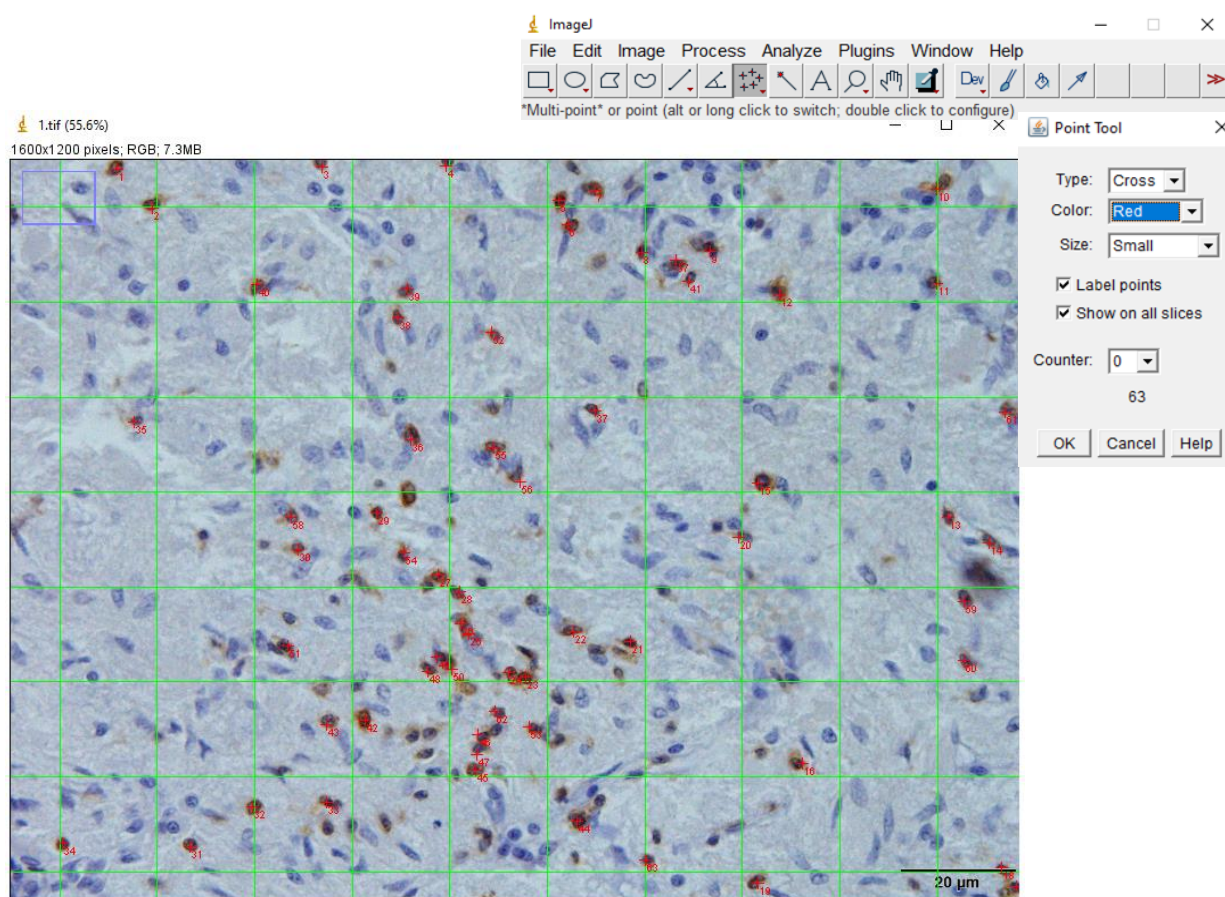
APÊNDICE B - FIGURAS E TABELA SUPLEMENTARES

Fig. S1. Fotomicrografia representativa do controle positivo das reações de imunohistoquímica de cortes histológicos de tecido linfoide (linfonodo poplíteo) de cão positivo para LVC, revelado com DAB DAKO (barra de escala = 20µm). (A) Detecção de linfócitos T CD3⁺ com anticorpo anti-CD3 (A0452, Dako). (B) Imunomarcacão para *Leishmania* spp. utilizando soro hiperimune heterólogo de camundongo experimentalmente infectado com *Leishmania* (*V.*) *shawi* (cepa 15789).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Fig. S2. Demonstração da contagem de células TCD3⁺ imunomarcadas com revelador 3,3'-diaminobezidina (DAKO) no software ImageJ, em vermelho contagem de linfócitos TCD3⁺ selecionadas utilizando ferramenta do programa, linhas verde grid feito pelo programa para auxiliar na contagem. A fotomicrografia foi obtida com auxílio do dispositivo de microimagem digital Olympus BX 50 acoplado a câmera e computador para captura de imagem, por meio do software Cellsens (Olympus Life Science) em objetiva de 40, com ampliação 400x; hot spot. Bar= 20µm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela S1. Classificação estabelecida de acordo com estadiamento clínico da LVC conforme Mancianti *et al.* (1988).

Classificação		Observações
0	Assintomático	Ausência de sinais e sintomas referentes à infecção por Leishmania
1	Oligossintomático	Adenopatia linfóide, discreta redução de peso e/ou pelos opacos
2	Sintomático	Todos ou alguns dos sinais graves da doença, ou seja, alterações cutâneas (alopecia, dermatite furfurácea, úlceras), onicogribose, ceratoconjutivite, rigidez de membro posterior, etc.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela S2. Estadiamento clínico dos cães infectados (G1), em assintomáticos oligossintomáticos e sintomáticos.

Estadiamento clínico	N	%
Assintomáticos	5	23,81
Oligossintomáticos	5	23,81
Sintomáticos	11	52,38
Total	21	100

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela S3. Porcentagem dos cães infectados (G1) e controle (G2) que apresentaram inflamação nas regiões hipofisárias, graduadas pela presença e intensidade.

Regiões hipofisárias		Presença de células mononucleares	Discreta	Moderada	Acentuada
G1 (n21)	<i>Pars nervosa</i>	9	7 (33,33%)	2 (9,52%)	-
	<i>Pars intermedia</i>	11	6 (28,57%)	3 (14,29%)	2 (9,52%)
	<i>Pars distalis</i>	13	6 (28,57%)	5 (23,81%)	2 (9,52%)
G2 (n5)	<i>Pars nervosa</i>	0	-	-	-
	<i>Pars intermedia</i>	1	1 (20%)	-	-
	<i>Pars distalis</i>	2	2 (40%)	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela S4- Tabela com dados brutos do experimento

Cão	Sexo	Raça*	Idade	Diagnóstico LVC (ELISA e/ou PBA)	GRUPO	IHQ CD3 - 5 campos / HPF 40x			IHQ - Leishmania IHQ - LISH	HE - Infamação Presente/ausente	HE - Escore Infamação**			ELISA D.O	Citologia PBA	Estad. Clínico ***	
						Pars N.	Pars I.	Pars D.			Pars N.	Pars I.	Pars D.			Estad. Clínico	Estad. Clínico
41	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	G1	3,6	3,2	3,2	Negativo	P	0	1	0	0,528	Ausente	2	S
44	Macho	Pit Bull	Adulto jovem	Positivo	G1	3,2	3,6	36	Positivo	P	0	0	2	Ausente	Positivo	1	O
47	Macho	Pit Bull	Jovem	Positivo	G1	13,4	2,6	4,4	Negativo	P	1	2	1	0,329	Ausente	0	A
49	Macho	Pit Bull	Adulto	Positivo	G1	5,4	5,8	26,4	Negativo	P	1	1	1	0,393	Ausente	0	A
52	Fêmea	Labrador	Adulto	Positivo	G1	6,2	0,8	13,2	Negativo	A	0	0	0	0,388	Ausente	2	S
54	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	G1	1,2	2,4	5,6	Negativo	A	0	0	0	0,292	Ausente	1	O
55	Macho	Pit Bull	Adulto jovem	Positivo	G1	1,4	2	6	Negativo	A	0	0	0	0,302	Ausente	1	O
56	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	G1	5,6	2,4	2,2	Negativo	P	0	0	1	0,461	Ausente	1	O
61	Macho	SRD	Adulto jovem	Positivo	G1	42,8	10,8	52,8	Negativo	P	2	2	3	0,335	Ausente	2	S
62	Fêmea	SRD	Adulto jovem	Positivo	G1	11,6	10,2	38,2	Negativo	P	2	1	2	0,281	Ausente	2	S
64	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	G1	2,2	2,2	6,8	Negativo	A	0	0	0	0,340	Ausente	0	A
67	Macho	SRD	Adulto	Positivo	G1	2,2	0,8	5,8	Positivo	P	0	0	1	0,324	Positivo	2	S
77	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	G1	7,4	2,6	10,6	Negativo	P	0	1	0	0,378	Positivo	2	S
84	Macho	SRD	Adulto	Positivo	G1	19,6	3,4	29	Negativo	P	1	0	1	0,493	Positivo	0	A
91	Macho	SRD	Adulto	Positivo	G1	8,4	2,2	6,8	Negativo	P	0	0	1	0,424	Positivo	0	A
93	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	G1	14,2	2	13,2	Negativo	A	0	0	0	0,532	Positivo	2	S
96	Macho	SRD	Adulto	Positivo	G1	13,4	2,4	11,4	Negativo	P	1	1	2	0,633	Positivo	2	S
CT07	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	G1	4,2	2,4	2	Negativo	P	0	1	0	Ausente	Positivo	2	S
CT08	Fêmea	SRD	Adulto	Positivo	G1	9,4	6	37,8	Negativo	P	1	2	2	Ausente	Positivo	2	S
CT10	Macho	SRD	Adulto	Positivo	G1	18,6	5,2	18,2	Negativo	P	1	3	3	Ausente	Positivo	1	O
CT12	Macho	SRD	Adulto	Positivo	G1	2,4	1,2	3,8	Negativo	P	1	3	2	Ausente	Positivo	2	S
57	Fêmea	SRD	Adulto	Negativo	G2	3	3	8,4	Negativo	A	0	0	0	0,133	Ausente	X	X
58	Macho	SRD	Adulto	Negativo	G2	1	2,4	7,6	Negativo	P	0	0	1	0,105	Ausente	X	X
68	Macho	SRD	Adulto	Negativo	G2	5,2	3	6	Negativo	P	0	0	1	Ausente	Negativo	X	X
71	Macho	SRD	Adulto	Negativo	G2	0,2	2	2,2	Negativo	A	0	0	0	Ausente	Negativo	X	X
88	Macho	SRD	Adulto	Negativo	G2	4,2	1,2	7,8	Negativo	P	0	1	0	Ausente	Negativo	X	X

* SRD: sem raça definida.

** 0: ausente; 1: discreta; 2: moderada; 3: acentuada.

*** X: não classificado; 0/A: assintomático; 1/O: oligossintomático; 2/S: sintomático.

Fonte: Elaborado pelo autor.

ANEXO A - COMISSÃO DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Caracterização de alterações histopatológicas em hipofise e rete mirabilis de cães naturalmente infectados por Leishmania infantum**", Processo FOA nº 0354-2021, sob responsabilidade de Gisele Fabrino Machado apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Julho de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Agosto de 2022.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Setembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Characterization of histopathological changes in hypophysis and rete mirabilis of dogs naturally infected by Leishmania infantum**", Protocol FOA nº 0354-2021, under the supervision of Gisele Fabrino Machado presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on July 30, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: August 30, 2022.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: September 30, 2022.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO B - NORMAS DE SUBMISSÃO

GUIDE FOR AUTHORS

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers)
2. Review articles
3. Letters to the Editor
4. Book reviews

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editors-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

Book reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old and were written in English.

Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to one of the Book Review Editors noted below:

Dr G. Baneth
School of Veterinary Medicine,
Hewbrew University,
Rehovot,
Israel
gad.baneth@mail.huji.ac.il

Dr E. Papadopoulos
Faculty of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki,
Thessaloniki,
Greece
eliaspap@vet.auth.gr

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- We require that non-commercial product names are used throughout the text in submissions. You may include the commercial name(s) of products in the Material and Methods section, then use only the non-commercial name thereafter

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Animal Welfare

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from the following URL: https://grants.nih.gov/grants/olaw/guiding_principles_2012.pdf. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Veterinary Parasitology. Please include an animal welfare statement under the heading "Animal welfare statement" at the end of the text.

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We

suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example.](#)

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

A cover letter is required for each new submission. It should address the novelty and significance of the work and how it fits within the defined scope of Veterinary Parasitology. Essential information, issues of concern or potential problems, (such as other publications or submissions containing similar information) should be identified in the cover letter. Authors who submit papers based on local data/surveys will need to indicate why their paper is relevant to a broader readership.

Authors are invited to suggest the names of up to 5 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission. Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

Article Transfer Service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/VETPAR/default.aspx>.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written

by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

If at all possible please refrain from sending chasers to the Editorial Office asking about the status of your paper under review, as the Editors aim to review your paper as efficiently as possible and the enquiry is unlikely to speed up the process.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscripts should have **numbered lines** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone, Fax No. and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3-6 items. Please refer to last index (Vol. 100/3-4).

Introduction

Material studied, area descriptions, methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgments and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s)).

Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

SI units should be used.

Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be clear, descriptive and not more than 400 words.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Formulae

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺, not as Ca⁺⁺.

6. Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O .

7. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

4. For chemical nomenclature, the conventions of the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed.

5. For the denomination of parasitic diseases or infections, authors are advised to consult the Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD) published in 1988 in *Veterinary Parasitology* (Kassai, T. et al., 1988. *Vet. Parasitol.* 29, 299-326).

Submission of sequence data to databases

New nucleotide or amino acid sequence data must be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank™, EMBL or DDJB, and an accession number obtained and submitted to the Publisher (at the latest) together with the final, revised manuscript. The accession number should appear in a separate paragraph in the Materials and Methods section (example: Nucleotide sequence data reported in this paper are available in the GenBank™, EMBL and DDBJ databases under the accession numbers: XXXX, XXXX). In order for automatic links to be made between papers and databases, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. When published they will appear in normal type.

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Illustration services

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.
2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.
3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.
4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.
5. Each table should have a brief and self-explanatory title.
6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.
7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.
8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference Style

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author's names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

2. In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12–16)".

3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on author's names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.

5. Use the following system for arranging your references:

a. For periodicals

Lanusse, C.E., Prichard, R.K., 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 49, 123–158.

b. For edited symposia, special issues, etc., published in a periodical

Weatherley, A.J., Hong, C., Harris, T.J., Smith, D.G., Hammet, N.C., 1993. Persistent efficacy of doramectin against experimental nematode infections in calves. In: Vercruyse, J. (Ed.), *Doramectin – a novel avermectin*. *Vet. Parasitol.* 49, 45–50.

c. For books

Blaha, T. (Ed.), 1989. *Applied Veterinary Epidemiology*. Elsevier, Amsterdam, 344 pp.

d. For multi-author books

Wilson, M.B., Nakane, P.K., 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp, W., Holubar, K., Wick, G. (Eds.), *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. North Holland, Amsterdam, pp. 215–224.

6. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references in accordance with BIOSIS Serial Sources, published annually by BIOSIS. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Parasitol.*

7. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.

8. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".

9. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

10. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.

11. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI) code.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to

supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage <https://www.elsevier.com/locate/vetpar> For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>