

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS NO ENCÉFALO
DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Guilherme Dias de Melo
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2012

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

**EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS NO ENCÉFALO
DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Guilherme Dias de Melo
Orientador: Prof.^a Adjunto Gisele Fabrino Machado**

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

ARAÇATUBA – SP
2012

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

Melo, Guilherme Dias de

M5281

Expressão gênica de citocinas no encéfalo de cães com leishmaniose visceral/Guilherme Dias de Melo.

Araçatuba: [s.n.], 2012

85f. il.; tab. CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2012

Orientador: Prof. Adj. Gisele Fabrino Machado

1. Sistema nervoso central-doenças. 2. Barreira hematoencefálica.
3. Inflamação 4. *Leishmania infantum*. 5. Reação em Cadeia da Polimerase
em Tempo Real. 6. Sistema imunológico

CDD 636. 8639929

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

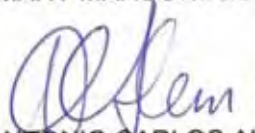
TÍTULO: EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS NO ENCÉFALO DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL

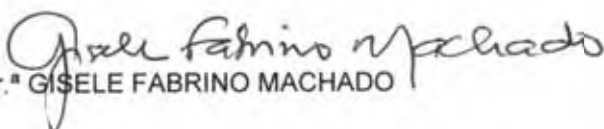
AUTOR: GUILHERME DIAS DE MELO

ORIENTADORA: Dr.^a GISELE FABRINO MACHADO

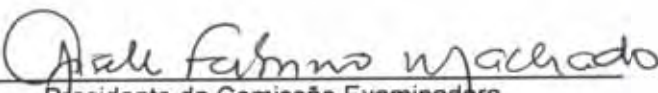
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica) pela Comissão Examinadora.


Dr.^a MARY MARCONDES


Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI


Dr.^a GISELE FABRINO MACHADO

DATA DA REALIZAÇÃO: 22 de junho de 2012.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.^a GISELE FABRINO MACHADO
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME DIAS DE MELO – Ourinhos – SP, 24 de junho de 1984. Graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo em dezembro de 2010. Bolsista de Iniciação Científica FAPESP de dezembro de 2006 a setembro de 2010. Aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo e bolsista FAPESP desde março de 2011. Estágio de pesquisa no *Institut für Veterinär-Pathologie – Justus-Liebig Universität-Giessen*, na cidade de Gießen, Alemanha, entre março e maio de 2012.

**Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele
lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor**

**Wenn ein Mensch einen Traum hat und sich mit der Kraft seiner Seele dafür einsetzt,
verschwört sich das Universum zu seinen Gunsten**

Johann Wolfgang von Goethe
(1749-1832)

Dedico

**à minha família, sempre
Antonio, Silvia e Juliana**

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa (#2009/53309-3) que originou a presente dissertação, bem como pela concessão da bolsa de mestrado (#2010/12473-2), e bolsa de estágio no exterior (#2011/21415-9), que foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa.

À Professora Adjunto Gisele Fabrino Machado, pela orientação e pelo permanente apoio científico e confiança.

À Professora Adjunto Juliana Regina Peiró pela completa introdução à técnica da PCR bem como pelo incentivo constante.

Ao Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles pela disponibilização da estrutura necessária para a realização das PCRs.

À Professora Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima pelo apoio na realização dos exames sorológicos e pela cessão de *Leishmanias* em cultivo.

À Professora Assistente Doutora Sílvia Helena Venturoli Perri pelas discussões estatísticas e pela permanente disponibilidade.

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

Ao *Institut für Veterinär-Pathologie* da *Justus-Liebig Universität Gießen*, em especial à Professora Doutora Christiane Herden e sua equipe: Laura Brachthäuser, Alexandra Kupke, Kristine Kehr e Silke Engel, pela ótima recepção e apoio durante a realização do estágio de pesquisa na Universidade de Giessen, Alemanha.

À minha família, pelo estímulo perene e constante compreensão.

Aos meus amigos, àqueles antigos e aos novos encontrados durante o mestrado, cuja colaboração e convivência foram ímpares.

A todos os pós-graduandos, estagiários e técnicos dos Laboratórios de Patologia e Imuno-histoquímica, Imunologia, e Ornitopatologia, pelo agradável convívio, auxílio e bate-papo durante as pausas para o café.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a construção dessa dissertação.

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

E finalmente a Deus, sem cujo apoio nada teria sido concretizado.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	1
Abstract.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Leishmaniose Visceral.....	5
2.1.1. Leishmaniose Visceral e o Sistema Nervoso Central.....	6
2.2. Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio.....	8
2.3. Citocinas.....	10
2.3.1. IFN- γ	11
2.3.2. IL-1.....	12
2.3.3. IL-6.....	13
2.3.4. IL-10.....	14
2.3.5. IL-12.....	15
2.3.6. TGF- β	16
2.3.7. TNF- α	17
2.3.8. Citocinas no SNC.....	18
2.3.9. Citocinas e a resposta imune à Leishmaniose visceral.....	19
OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Animais.....	22
3.2. Delineamento experimental.....	22
3.3. Colheita de material.....	23
3.4. Diagnóstico de leishmaniose visceral.....	24
3.5. Determinação da carga parasitária esplênica de <i>Leishmania sp.</i>	24
3.6. Extração de RNA de encéfalo.....	26
3.7. Produção de cDNA.....	27
3.8. Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise.....	27
3.9. Avaliação da expressão gênica de citocinas.....	29

3.10. Análise estatística	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1. Expressão gênica de citocinas no encéfalo	31
4.2. Carga parasitária esplênica	36
4.3. Lesões macroscópicas	38
4.4. Análise histopatológica	41
5. DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
Δ Ct	Ct do gene alvo – Ct do gene de referência
$\Delta\Delta$ Ct	Δ Ct médio do grupo infectado – Δ Ct médio do grupo controle
μ g	micrograma
μ L	microlitro
BHE	barreira hematoencefálica
BHL	barreira hematoliquórica
BHQ-1	<i>black hole quencher-1</i>
cDNA	DNA complementar
cm ³	centímetro cúbico
Ct	ciclo limiar (<i>cycle threshold</i>)
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FAM	6-carboxifluoresceína
G3PDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IFN- γ	interferon gama
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
IL-12p40	subunidade p40 da interleucina 12
kDNA	DNA do citenoplasto
log	logaritmo na base 10
LV	leishmaniose visceral
MHC	antígeno principal de histocompatibilidade
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro

ng	nanograma
nM	nanomolar
p	probabilidade
pb	pares de base
PCR	reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativa (ou PCR em tempo real)
r ²	coeficiente de determinação
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RT-qPCR	reação da transcriptase reversa seguida de qPCR
SDS	dodecil sulfato de sódio
SNC	sistema nervoso central
Tc1	linfócito T citotóxico tipo 1
Tc2	linfócito T citotóxico tipo 2
TGF-β	fator de crescimento transformador beta
Th1	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 1
Th2	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 2
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa
Tris	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Expressão gênica média relativa de citocinas no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. Os valores, na escala logarítmica na base 10, indicam quantas vezes (*fold change*) o gene para a citocina está mais expresso (valores positivos) ou menos expresso (valores negativos) em relação aos cães do grupo controle. O fator de normalização dos dados usado foi o sinal do gene de referência G3PDH, segundo o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ **34**

Figura 2 – Correlação (teste de Pearson) entre citocinas no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. Os *scatter plots* indicam a correlação positiva entre TNF- α e IL-6 (**a**; $p = 0,0041$), TNF- α e IL-1 β (**b**; $p = 0,0463$), TNF- α e IFN- γ (**c**; $p = 0,0101$), a tendência de correlação positiva entre IL-6 e IFN- γ (**d**; $p = 0,0997$), e a correlação negativa entre IL-6 e IL-10 (**e**; $p = 0,0142$). A equação dos mínimos quadrados e os valores do coeficiente de determinação (r^2) estão mostrados nos gráficos. Valores em escala logarítmica na base 10 **35**

Figura 3 – Carga parasitária de *Leishmania chagasi* no baço de cães infectados (**a**) e sua correlação com a expressão gênica das citocinas IL-1 β (**b**), IL-6 (**c**), IL-10 (**d**), IL-12p40 (**e**), IFN- γ (**f**), TGF- β (**g**) e TNF- α (**h**) no encéfalo. Não houve correlação significativa entre a carga parasitária com nenhuma das citocinas avaliadas. Valores em escala logarítmica na base 10 **37**

Figura 4 – Variação das diferentes manifestações clínicas da leishmaniose visceral em cães (A: assintomáticos; O: oligossintomáticos; S: sintomáticos) de acordo com a carga parasitária de *Leishmania chagasi* no baço (**a**) e com a expressão gênica das citocinas IL-1 β (**b**), IL-6 (**c**), IL-10 (**d**), IL-12p40 (**e**), IFN- γ (**f**), TGF- β (**g**) e TNF- α (**h**) no encéfalo. As linhas horizontais indicam o valor médio. Não houve diferença significativa em relação à carga parasitária e tampouco em relação a nenhuma das citocinas avaliadas. Valores em escala logarítmica na base 10..... **40**

Figura 5 – Fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. (**a**) intenso infiltrado linfoplasmocitário (seta) em leptomeninge cortical. (**b**) infiltrado linfoplasmocitário (seta) em plexo coróide do ventrículo lateral. Hematoxilina e Eosina. Barra = 100 μm (a), 50 μm (b) **42**

Figura 6 – Fotomicrografias representativas das alterações inflamatórias perivasculares no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. **(a)** manguito perivascular mononuclear (seta) no córtex piriforme. **(b)** infiltrado inflamatório perivascular mononuclear (seta) em região subependimária, sem, contudo, comprometimento da camada ependimária (cabeça de seta). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μm (a), 20 μm (b) **43**

Figura 7 – Fotomicrografias representativas das alterações gliais no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. **(a)** nódulo glial focal (seta) em área subependimária. **(b)** gliose difusa em área subependimária com desorganização do neurópilo. Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μm **44**

Figura 8 – Fotomicrografias representativas das alterações microgliais no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. **(a)** área de microgliose difusa em região subependimária. Notar grande quantidade de células microgliais (cabeça de seta). **(b)** detalhe em maior aumento de uma célula microglial (cabeça de seta), apresentando núcleo alongado em formato de bastão (*rod cell*). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μm (a), 20 μm (b)..... **45**

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso (<i>forward</i> : F), anti-senso (<i>reverse</i> : R) e das sondas de hidrólise (S) utilizados nas qPCRs ...	28
Tabela 2 – Valores de eficiência (E), coeficientes de determinação (r^2) e coeficientes angulares (slope) relativos às reações para amplificação dos genes avaliados	33
Tabela 3 – Alterações no exame necroscópico dos animais, de acordo com os subgrupos experimentais	39

EXPRESSÃO GÊNICA DE CITOCINAS NO ENCÉFALO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO

Para investigar a patogênese das alterações encefálicas durante a leishmaniose visceral, a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IFN- γ e TNF- α e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β foi avaliada por meio de RT-qPCR no encéfalo de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* (= *chagasi*). No encéfalo dos cães infectados houve aumento da expressão gênica de IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , associada ao decréscimo da expressão de IL-10 e TGF- β . Por outro lado, a expressão gênica da citocina pró-inflamatória IL-12p40 mostrou-se reduzida no encéfalo de cães com LV. Esses dados indicam a presença de um ambiente pró-inflamatório no encéfalo de cães com leishmaniose visceral, já que IL-1 β , IL-6 e TNF- α , principalmente, é tida como um fator chave para a iniciação, manutenção e persistência da inflamação. Ainda, não foi detectada correlação entre o perfil de citocinas expresso com a manifestação clínica ou com a carga parasitária periférica de *Leishmania*, sugerindo que as alterações encefálicas são decorrentes da própria resposta imune do hospedeiro, independentemente da fase em que a doença se encontra.

Palavras-chave: barreira hematoencefálica; inflamação; *Leishmania infantum*; PCR em tempo real; sistema imunológico; sistema nervoso central.

CYTOKINE GENE EXPRESSION IN THE BRAIN OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT

To investigate the pathogenesis of the brain alterations during visceral leishmaniasis, the gene expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IFN- γ and TNF- α , and the anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β was evaluated in the brain of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) by means of RT-qPCR. In the brain of the infected dogs, there was noticed up-regulation of IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α gene expression, in association with down-regulation of IL-10 and TGF- β . On the other hand, the gene expression of IL-12p40 was down-regulated in the brain of the dogs with visceral leishmaniasis. These data indicate the presence of a pro-inflammatory milieu in the brain of dogs with visceral leishmaniasis, since IL-1 β , IL-6 and TNF- α are considered key factors for the initiation, maintenance and persistence of inflammation. Furthermore, it was not detected correlation between the cytokine profile with the clinical manifestation or with the peripheral parasite density of *Leishmania*, which suggests that the brain alterations are due to the host immune response, regardless of the stage of the disease.

Keywords: blood-brain barrier; central nervous system; immune system; inflammation; *Leishmania chagasi*; real time PCR.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma enfermidade complexa causada por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, que são transmitidas por cerca de 30 espécies distintas de mosquitos flebotomíneos, e que possui quatro formas diferentes de apresentação: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea, leishmaniose muco-cutânea e leishmaniose dérmica pós-calazar. A LV é uma importante causa de morte em humanos e dentre as doenças parasitárias é superada somente pela malária (CHAPPUIS et al., 2007).

Os cães constituem o principal reservatório da doença nas áreas onde ocorre a LV zoonótica. Estudos sobre a patogênese da LV canina versam principalmente sobre a resposta imune nos órgãos linfóides e na pele, principais estruturas afetadas. Contudo, a resposta imune contra a LV parece ser órgão-específica (STANLEY; ENGWERDA, 2007), e existem relatos de LV canina levando a alterações em outros sistemas, como urinário, musculoesquelético, cardiovascular e nervoso (BLAVIER et al., 2001).

O sistema nervoso central (SNC) possui uma série de características morfológicas e funcionais que o tornam, de certa forma, privilegiado imunologicamente (GALEA et al., 2007), entretanto, alguns patógenos são capazes de transpor os mecanismos de defesa e causar alterações neurológicas. Durante a LV canina, apesar de a presença do protozoário não ter sido frequentemente relatada no ambiente nervoso, há diversos indícios da ocorrência de alterações pró-inflamatórias, como grande infiltração de linfócitos

T, células gliais em estado de ativação, alterações degenerativas de neurônios, e presença de enzimas do grupo das metaloproteinases da matriz (IKEDA et al., 2007; MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2009; MELO; MACHADO, 2011). Por conseguinte, esses dados são indicativos de que durante a LV canina, mesmo na ausência do protozoário, há no SNC estímulos para o estabelecimento de alterações inflamatórias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmaniose Visceral

A LV, também conhecida como calazar, é uma antropozoonose, causada por um protozoário do gênero *Leishmania* subgênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida). As espécies relacionadas com a LV formam o complexo *Leishmania donovani*, composto por *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (= *chagasi*). No Brasil e na região do Mediterrâneo é causada pela *L. chagasi*, já *L. donovani* ocorre principalmente na Ásia e África (BANETH et al., 2008; LUKEŠ et al., 2007; MAURICIO et al., 2000).

A LV é transmitida pela picada de flebotomíneos e, no Brasil a espécie relacionada é a *Lutzomyia longipalpis*, comumente chamada de mosquito-palha (“sand fly”) (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008). Os principais hospedeiros são os cães e o homem, mas o parasita já foi detectado em canídeos silvestres (LUPPI et al., 2008), gatos (VIDES et al., 2011), marsupiais (SANTIAGO et al., 2007) e roedores (OLIVEIRA et al., 2005). Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem duas formas ao longo de seu ciclo de vida. A forma promastigota, flagelada, que habita o trato intestinal dos vetores, e que é transmitida ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo, e a forma amastigota, aflagelada, parasita intracelular do hospedeiro vertebrado (BATES, 2007).

A infecção por *L. chagasi* causa freqüentemente uma doença sistêmica, geralmente crônica e algumas vezes subclínica, mas podendo evoluir para a

forma clínica, caracterizada por longos períodos de febre irregular, anemia, perda progressiva de peso e caquexia (ALVAR et al., 2004). Os animais acometidos podem ainda apresentar alterações dermatológicas, onicogrifose, alterações renais, alterações hepáticas, pneumonia, miocardite, distúrbios locomotores, diáteses hemorrágicas e alterações oculares (ALVAR et al., 2004; BLAVIER et al., 2001; CIARAMELLA; CORONA, 2003; MORENO et al., 1998).

A LV afeta principalmente os órgãos do sistema fagocítico mononuclear, como baço, linfonodos, fígado, medula óssea, além da pele. A lesão histopatológica típica nos tecidos é uma reação inflamatória granulomatosa associada à presença de formas amastigotas de *Leishmania* no interior de macrófagos (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008).

A célula alvo do parasita são os macrófagos, que têm a atividade antiparasitária inibida e servem como local para a replicação do parasita. Em seguida, ocorre estabelecimento da infecção e a evolução da doença depende da resposta imune do hospedeiro. Uma vez estabelecida, a infecção geralmente persiste no tecido (PALTRINIERI et al., 2010).

2.1.1. Leishmaniose Visceral e o Sistema Nervoso Central

Embora existam muitos relatos sobre lesões sistêmicas, poucos são os relatos de ocorrência de lesões no SNC durante a LV. Em cães, há descrições sobre a migração de parasitas, deposição de antígenos e imunoglobulinas levando a meningite e coroidite (GARCIA-ALONSO et al., 1996; MELO et al.,

2009; MELO; MACHADO, 2009; NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001). Em camundongos inoculados experimentalmente com *L. amazonensis* foram detectadas lesões inflamatórias no SNC (ABREU-SILVA et al., 2003).

Durante a infecção causada pela *Leishmania* em humanos são incomuns as manifestações do SNC, ao passo que o comprometimento dos nervos periféricos é mais comum (SNYDMAN et al., 2006). Hashim e colaboradores (1995) relataram que 46% das pessoas com LV desenvolveram sintomas neurológicos, sendo o mais referido a sensação de queimação dos pés, sem a ocorrência de infecção direta pelo parasita. São relatados, além de neuropatia periférica, casos de disfunção de nervos cranianos, meningite e alterações semelhantes à síndrome de Guillain-Barré (SNYDMAN et al., 2006).

Em cães naturalmente infectados, entre os sintomas neurológicos destacam-se convulsões generalizadas, mioclonias, vocalização, anisocoria, midríase bilateral, nistagmo, andar em círculos, ataxia, tremor de intenção, tetraparesia e tetraplegia (IKEDA et al., 2007; MARCONDES, 2008). De 215 cães avaliados clinicamente em Araçatuba, de janeiro a novembro de 1999, 4% apresentaram sintomas neurológicos (FEITOSA et al., 2000). Todavia, alterações histopatológicas como degeneração neuronal, infiltração de linfócitos T, células gliais em estado de ativação e enzimas do grupo das metaloproteinases da matriz foram detectadas no SNC de cães naturalmente infectados, com ou sem manifestação clínica de sintomas neurológicos (IKEDA et al., 2007; MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2009; MELO; MACHADO, 2011).

2.2. Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio

O SNC em condições normais é classicamente considerado um local imunologicamente privilegiado, devido à baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade, ao baixo número de células apresentadoras de antígeno, à ausência de drenagem linfática e à eficiência das barreiras cerebrais, em especial a barreira hematoencefálica (BHE) (GALEA et al., 2007).

A BHE propriamente dita é composta por células endoteliais especializadas que não apresentam fenestrações e que possuem junções intercelulares do tipo oclusivas (“tight junctions” ou “zonula occludens”). É uma barreira entre a luz de vasos sanguíneos e o parênquima nervoso. Ainda, como defesa adicional, a BHE conta com a presença de pericitos, que compartilham a membrana basal com as células endoteliais, macrófagos perivasculares e pés terminais de astrócitos, que recobrem toda sua superfície e extensão (BALLABH et al., 2004; GALEA et al., 2007; SAUNDERS et al., 2008). A BHE limita a saída de substâncias do sangue e o tráfego de leucócitos dentro do SNC, mas estudos indicam que leucócitos ativados são capazes de cruzar a barreira e realizar a vigilância imunológica do SNC (KIVISÄKK et al., 2009; MAN et al., 2007).

A BHE está presente em todo o SNC, exceto no plexo coróide e nos órgãos circunventriculares, regiões onde os capilares sanguíneos são fenestrados e se encontra a barreira hematoliquórica (BHL). O plexo coróide é o principal responsável pela produção do líquido cefalorraquidiano, já os órgãos

circunventriculares são áreas adjacentes aos ventrículos cerebrais que possuem características neuroendócrinas e sensoriais: área postrema, eminência mediana, neurohipófise, glândula pineal, órgão subfornical, órgão subcomissural e órgão vascular da lâmina terminal (SCHULZ; ENGELHARDT, 2005; WOLBURG; PAULUS, 2010). Devido à presença de fenestrações nos capilares sanguíneos, essas regiões são, por vezes, tidas como portas de entrada de células inflamatórias e patógenos ao ambiente nervoso. Em especial, o plexo coróide é considerado um importante mediador de sinalização imune entre o SNC e a periferia (MARQUES et al., 2007), sobretudo pelas evidências de acúmulo de linfócitos T CD3⁺ no plexo coróide após estimulação periférica (PETITO; ADKINS; 2005).

A BHL no plexo coróide apresenta o mesmo princípio da BHE, ou seja, a unidade principal é composta por junções intercelulares do tipo oclusivas; contudo, essas junções não se encontram no endotélio, mas sim entre as células epiteliais. Em decorrência dos capilares serem fenestrados, substâncias presentes no sangue podem atingir o estroma do plexo coróide, demonstrando a necessidade da barreira estar situada na camada epitelial dessa estrutura. Ainda, aleatoriamente sobrejacentes às células do epitélio, estão presentes as células do epiplexo (ou células de Kolmer), consideradas células apresentadoras de antígeno residentes, além de células dendríticas e macrófagos no estroma (DI TERLIZZI; PLATT, 2006; JOHANSSON et al., 2008; WOLBURG; PAULUS, 2010). De maneira análoga, a BHL nos órgãos

circunventriculares é formada por células especializadas, os tanicitos (SCHULZ; ENGELHARDT, 2005).

Apesar da eficiência das barreiras cerebrais, alguns patógenos como *Escherichia coli*, *Streptococcus* (grupo B), *Cryptococcus neoformans* e *Borrelia burgdorferi* são capazes de adentrar ao SNC e causar lesões (CHARLIER et al., 2005; DORAN et al., 2005; GRAB et al., 2005; KIM, 2002). Muitas vias têm sido propostas para justificar a entrada de patógenos no SNC, o que inclui a passagem por entre as células da BHE ou BHL, o transporte através da barreira no interior de leucócitos infectados, e a invasão direta das células do endotélio capilar e do epitélio do plexo coróide (HUANG; JONG, 2001; LOSSINSKY; SHIVERS, 2004; STRAZIELLE; GHERSI-EGEA, 2000). A inflamação induzida por patógenos no plexo coróide tem se mostrado um fato comum. Bactérias como a *Neisseria meningitidis*, parasitas como o *Trypanosoma brucei* e vírus como o vírus do sarampo e provavelmente o vírus da AIDS (HIV-1) e da leucemia (HTLV-1) possuem tropismo por esta estrutura (STRAZIELLE; GHERSI-EGEA, 2000).

2.3. Citocinas

As citocinas constituem um amplo grupo de proteínas e glicoproteínas que atuam como mediadores na comunicação celular, especialmente no que tange à resposta imune. De maneira geral não possuem atividade no organismo saudável, mas são rapidamente produzidas em resposta à lesão

tecidual, infecção e inflamação. Sua produção é controlada, sendo e geralmente são secretadas como precursores inativos que precisam ser clivados por enzimas específicas para que possam exercer sua atividade biológica. A transmissão do sinal é feita por meio de receptores específicos situados na membrana celular. O termo citocina inclui interleucinas, interferons, fatores de crescimento, quimiocinas e fatores de necrose tumoral (ALLAN; ROTHWELL, 2001; KADHIM et al., 2008).

2.3.1. IFN- γ

Os componentes da família dos interferons receberam esse nome pela capacidade de interferir na replicação viral. Estes podem ser divididos em quatro subclasses: interferon- α/β (IFN tipo I), interferon- γ (IFN tipo II), interferon- ω e interferon- τ . Apesar de sua atividade antiviral, o IFN- γ possui um espectro de ação muito mais amplo, sendo considerado uma das principais citocinas estimuladoras da imunidade contra infecções, atuando em ambas as respostas imunes, inata e adaptativa. É considerado o principal ativador de macrófagos, estimula a resposta imune por favorecer o crescimento de células Th1 em detrimento das Th2, e estimula a apresentação de antígenos pelo aumento da expressão de moléculas do MHC das classes I e II (YOUNG; HODGE, 2003).

Dentre os principais produtores de IFN- γ encontram-se os linfócitos T e as células *natural killer* (NK) que, por meio de sua produção, podem ter suas

subpopulações diferenciadas: linfócitos T CD4⁺ Th1 e linfócitos T CD8⁺ Tc1 são produtores de IFN- γ , ao passo que linfócitos T CD4⁺ Th2 e linfócitos T CD8⁺ Tc2 são caracterizados pela produção de IL-4 e ausência de produção de IFN- γ . Diversas interleucinas (IL-2, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21), IFN- γ , TNF, quimiocinas, e ativação celular por meio de outros receptores, como o CD16 e o CD28 são estímulos para a produção de IFN- γ (YOUNG; HARDY, 1995; SZABO et al., 2002).

2.3.2. IL-1

A IL-1 é uma das mais potentes citocinas possuindo um amplo espectro de ação. O sistema IL-1 possui como componentes os agonistas IL-1 α e IL-1 β , com ação semelhantes, uma enzima específica de ativação (enzima conversora de IL-1, ICE ou caspase 1) e o IL-1ra (antagonista do receptor de IL-1), que compete com IL-1 α e IL-1 β pela ligação ao receptor. Existem dois receptores para IL-1, IL-1RI e IL-1RII, contudo IL-1RII não possui domínio intracelular e por isso a ligação a esse receptor não permite a transdução de sinal (MANTOVANI, 2003).

A IL-1 tem ação semelhante ao TNF e a IL-6, atua na co-estimulação de linfócitos T e na indução de produção de citocinas por monócitos/macrófagos. A IL-1 é uma potente ativadora de células endoteliais, promovendo a expressão de moléculas de adesão, além de induzir a produção de agentes vasodilatadores. No sistema nervoso central a IL-1 é considerada o principal

pirógeno endógeno, e também atua no sistema neuroendócrino hipotálamo-hipófise-adrenal, promovendo a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) (ROTHWELL; LUHESHI, 2000).

Na ausência de estímulos a IL-1 não é produzida. São estímulos para sua produção moléculas como LPS (lipopolissacarídeo), citocinas (TNF- α , IFN- γ e a própria IL-1) e componentes do sistema complemento. As células da linhagem monocítica-macrofágica são as principais produtoras dessa citocina, contudo, na presença de estímulos, uma grande variedade de tipos celulares é capaz de produzi-la (MANTOVANI, 2003; ROTHWELL; LUHESHI, 2000).

2.3.3. IL-6

A IL-6 é classicamente agrupada entre as citocinas pró-inflamatórias e possui ação contra infecções bacterianas e virais. No sistema imune, a IL-6 atua na ativação, proliferação e sobrevivência de linfócitos T, na estimulação de produção de imunoglobulinas por linfócitos B ativados, auxilia a resposta de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺). Está associada com inflamação aguda, decorrente de traumas, estresse, infecção, bem como inflamação crônica em decorrência de doenças autoimunes (KAMIMURA; HIRANO, 2003).

A produção de IL-6 é estimulada por diversos fatores, como citocinas, componentes do sistema complemento, eicosanóides, partículas bacterianas (como LPS), partículas virais (como RNA de fita dupla), neuropeptídios. O “cross-linking” entre alguns receptores celulares também incentivam a

produção de IL-6, como receptores Fc ϵ e Fc γ , receptor de células T, CD40 e CD95 (Fas). A IL-6 é produzida por uma miríade de células, como linfócitos T, linfócitos B, neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, mastócitos, células dendríticas, células endoteliais. Fatores que inibem/diminuem a produção de IL-6 são IL-10, glicocorticóides, estrógenos, andrógenos, vitamina D₃, ácido retinóico (JONES et al., 2005; KRUTMANN et al., 1990).

A resposta à IL-6 se dá pela interação com um receptor heterodimérico formado pelas subunidades IL-6R e gp130. A subunidade IL-6R pode se apresentar ligada à subunidade gp130, formando o receptor específico da IL-6, presente em leucócitos e hepatócitos. Por outro lado, a subunidade IL-6R pode se apresentar na forma solúvel (sIL-6R), e após a interação com a IL-6 se ligar à gp130, que é expressa em diversos tipos celulares, proporcionando à IL-6 a estimulação de um amplo espectro de tipos celulares (JONES et al., 2005; KAMIMURA; HIRANO, 2003).

2.3.4. IL-10

A IL-10 é um regulador chave da resposta imune pelo seu efeito anti-inflamatório. Tem ação imunossupressora por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias por linfócitos ativados, por promover a mudança do padrão de resposta Th1 para Th2, e por inibir a apresentação de antígenos por macrófagos e células dendríticas, bloqueando a expressão de moléculas

coestimuladoras (CD80, CD86) e do MHC de classe II (DE WAAL MALEFYT et al., 1991; PESTKA et al., 2004).

É capaz de inibir a produção de IFN- γ por células NK, a expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1) pelo endotélio ativado, e a resposta de células B dependente de células T. Impede a angiogênese por diminuir a produção de fatores angiogênicos como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), além de produzir IL1- β , IL-6, TNF- α , MMP-9 (metaloproteinase da matriz 9) e por estimular a produção de inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) (DE WAAL MALEFYT et al., 1991; DING et al., 2003).

Pode ser produzida por linfócitos T, células T regulatórias (Treg), células CD4⁺ CD25⁺, células de memória (CD4⁺ CD45RA⁻), linfócitos B, monócitos/macrófagos, células NK, células epiteliais, e. A produção de IL-10 é induzida por diversas bactérias e produtos/componentes bacterianos, vírus, parasitas, fungos, por outras citocinas, hormônios e componentes derivados do ácido araquidônico (DING et al., 2003; PESTKA et al., 2004).

2.3.5. IL-12

A IL-12 é a principal citocina polarizante para resposta Th1, sendo responsável por aumentar a produção de citocinas, especialmente IFN- γ , estimular a proliferação linfocitária, a citotoxicidade e a apresentação de antígenos. A IL-12 ativa (p70) é uma proteína heterodimérica formada pelas subunidades p35 e p40 ligadas por pontes de dissulfeto, e a subunidade p40 é

compartilhada por outra citocina, a IL-23, com funções semelhantes as da IL-12 (LOTZE; KALINSKI, 2003; WATFORD et al., 2003).

Diversas células são capazes de produzir a subunidade p35 da IL-12, porém a citocina biologicamente ativa é produzida somente por células capazes de produzir ambas as subunidades p35 e p40, como os macrófagos e células dendríticas. A produção da IL-12 se dá por contato direto com patógenos ou com linfócitos T por meio da interação entre CD40 e CD40L. IL-10, IL-13, IFN tipo I, prostaglandina E₂, histamina e ligação a receptores Fc (cross-linking) são capazes de inibir a produção de IL-12, ao passo que o IFN- γ a estimula (LOTZE; KALINSKI, 2003; WATFORD et al., 2003).

2.3.6. TGF- β

O TGF- β compreende três isoformas praticamente idênticas: TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Sua ação é de efeito autócrino e parácrino. É produzida por todos diversos tipos de células, como todos os leucócitos, fibroblastos e plaquetas. Linfócitos T em processo de apoptose geralmente produzam grandes quantidades de TGF- β cujo efeito imunossupressivo é notável (JAVELAUD; MAUVIEL, 2004; MOUSTAKAS et al., 2002).

O TGF- β possui ação sobre todas as células e pode modular (inibir e/ou estimular) diversos aspectos da biologia celular, como proliferação, diferenciação, motilidade, adesão e morte. Essa citocina também atua na manutenção da matriz extracelular, pela modulação da produção de colágenos

fibrilares e fibronectina, por diminuir a expressão de MMPs e aumentar a produção de TIMPs (MOUSTAKAS et al., 2002).

Principalmente, a função primordial do TGF- β no sistema imune é a inibição da proliferação e diferenciação linfocitária, objetivando o controle do nível populacional dessas células durante a resposta inflamatória (JAVELAUD; MAUVIEL, 2004; MOUSTAKAS et al., 2002).

2.3.7. TNF- α

O TNF- α é uma citocina multifuncional que tem atividade durante a inflamação aguda e crônica, contra infecções e antitumoral. É uma citocina homotrimérica que pode estar associada à membrana citoplasmática ou pode se apresentar na forma solúvel, após clivagem do domínio extracelular do TNF- α associado à membrana por uma MMP, a enzima conversora de TNF- α (TACE ou ADAM-17). Ambas as formas são biologicamente ativas, e aquela associada à membrana está relacionada com a sinalização por contato célula-célula (BEUTLER, 2003; POPA et al., 2007).

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos e é importante no combate à patógenos, como alguns vírus, bactérias Gram-positivas, micobactérias e protozoários. É uma citocina tipicamente causadora de inflamação, por promover ativação de neutrófilos, efeito pró-coagulante no endotélio, produção de espécies reativas de oxigênio e estimulação da síntese de enzimas proteolíticas (BEUTLER, 2003; POPA et al., 2007).

A ação dessa citocina se dá pela interação com dois receptores distintos, TNFR1 e TNFR2. O TNFR1 é expresso de forma constitutiva em diversos tipos celulares, e apresenta um domínio de morte que leva à apoptose. Já o TNFR2 é um receptor do tipo induzível e está restrito à apenas alguns tipos celulares. Ambos os receptores podem ser clivados por enzimas da família das MMPs, e as frações extracelulares liberadas mantêm a capacidade de interação com o TNF- α , podendo atuar como inibidores ou facilitadores da ação da citocina, dependendo de sua concentração (BEUTLER, 2003; PALLADINO et al., 2003).

2.3.8. Citocinas no SNC

A origem exata das citocinas pró-inflamatórias no SNC é difícil de ser determinada, devido à variação da população celular presente, como neurônios, células da neuroglia e células do sistema imune periférico. Astrócitos, micróglia e células endoteliais são os principais produtores de citocinas no SNC (DE VRIES et al., 1997; HANISCH, 2002). Outra possível fonte de citocinas são as células ependimárias e o plexo coróide, que durante meningite bacteriana experimental (KIM et al., 2004) ou após inoculação periférica de LPS (MARQUES et al., 2007; TARLOW et al., 1993) podem expressar IL-1 β e TNF- α . Ainda, os próprios leucócitos que adentram o SNC podem contribuir para a produção de citocinas.

Lucas et al. (2006) descrevem como fatores chave da inflamação do SNC: ativação glial, edema, expressão de MHC, ativação do complemento, expressão de moléculas de adesão, invasão de células do sistema imune e expressão de mediadores inflamatórios como citocinas. Estudos comprovam que a exposição crônica do SNC à altos níveis de citocinas pode levar à neurodegeneração (QUAN et al., 1999).

2.3.9. Citocinas e a resposta imune à Leishmaniose visceral

Na infecção por *Leishmania*, poucos estudos suportam a associação entre a progressão da doença e o estabelecimento de imunidade celular em cães (SANCHEZ et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Trabalhos comprovam uma falha de resposta celular específica em cães infectados sintomáticos, caracterizada por uma redução na resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* e uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ (PINELLI et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Alguns estudos comprovam que, particularmente os linfócitos T CD8⁺, são importantes na proteção imune em casos de leishmaniose cutânea e visceral (GIUNCHETTI et al., 2008), possivelmente devido a mecanismos citotóxicos (PINELLI, 1999; REIS et al., 2009).

Reis et al. (2009) propuseram que o aumento da expressão de MHC II em linfonodos pode refletir a resposta a uma primeira exposição ao antígeno, uma vez que os cães infectados, sintomáticos ou não, apresentaram aumento

na expressão quando comparados aos não infectados. O interessante trabalho de Sanchez et al., (2004), destaca a ocorrência de variação na composição celular do infiltrado inflamatório de cães com leishmaniose, dependendo do órgão alvo analisado.

Em cães assintomáticos e oligossintomáticos há prevalência da resposta Th1 (celular), mediada pelas citocinas IL-2, IFN- γ e TNF- α . Ao contrário, em animais sintomáticos, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β podem mediar a resposta Th2 (humoral) (BARBIÉRI, 2006; REIS et al., 2009; STRAUSS-AYALI et al., 2005). A polarização da resposta imune não pode ser considerada uma regra geral na infecção por *Leishmania* devido ao papel das células T reguladoras (Treg) que suprimem a resposta imune por meio de interação célula-célula e/ou de produção de citocinas supressoras como a IL-10 e o TGF- β , o que torna a resposta à LV uma resposta do tipo Th0 (misto de Th1 e Th2) (BELKAID et al., 2002; CAMPANELLI et al., 2006; GANTT et al., 2003).

OBJETIVOS

No SNC normal, citocinas estão ausentes ou são detectadas em níveis baixos, mas seus níveis rapidamente se elevam em resposta a lesões. Tendo em vista a escassez de dados que relacionam a LV e o SNC, e uma vez que a presença de citocinas no SNC pode indicar um ambiente inflamatório, o objetivo do presente estudo foi a determinação da expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IFN- γ e TNF- α e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β no encéfalo de cães com LV, bem como a avaliação da existência de correlação entre o perfil de citocinas expresso no encéfalo com a carga parasitária periférica e com as diferentes manifestações clínicas da doença.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 25 cães naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes do atendimento realizado no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira” da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba-SP, ou do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba-SP, cuja eutanásia foi autorizada pelos proprietários em cumprimento da Lei Estadual (SÃO PAULO, 2006) tão logo o diagnóstico de LV foi confirmado. A faixa etária dos animais variou de 1 a 6 anos, sendo, 13 machos e 12 fêmeas.

3.2. Delineamento experimental

Os cães foram organizados em dois grupos experimentais: grupo infectado, composto por 19 cães com diagnóstico positivo para LV; e grupo controle, composto por seis cães com diagnóstico negativo para LV, que foram encaminhados ao Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba-SP e cuja morte não foi relacionada com envolvimento neurológico. Somente cães positivos tanto na qPCR quanto na sorologia foram incluídos no grupo infectado.

O grupo infectado foi ainda dividido em três subgrupos com base nas lesões macroscópicas apresentadas pelos cães, de acordo com Mancianti et al.

(1988): subgrupo assintomático ($n=3$), com ausência de sinais clínicos; subgrupo oligossintomático ($n=8$), com cães apresentando até três sinais clínicos moderados de LV, como lesões cutâneas localizadas, emagrecimento e linfadenomegalia; e subgrupo sintomático ($n=8$), com cães apresentando um ou mais sinais clínicos típicos de LV, como úlceras cutâneas generalizadas, seborréia, hipotricose difusa, caquexia, onicogribose, ceratoconjuntivite, linfadenopatia generalizada e hepatosplenomegalia.

3.3. Colheita de material

Os cães foram submetidos à eutanásia de acordo com a Resolução nº 1000 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2012), que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico¹ e então amostras de sangue foram colhidas e armazenadas em tubos sem anticoagulante. Após 20 minutos, os tubos foram submetidos à centrifugação durante 10 minutos a 800×g para obtenção do soro, o qual foi aliquoteado e armazenado a -20°C até análises posteriores.

Após a colheita de sangue, os cães receberam uma dose letal de cloreto de potássio² por via intravenosa. Em seguida à verificação da morte dos animais foi realizado o exame necroscópico, durante o qual foi efetuada a retirada do encéfalo da cavidade craniana. De um hemisfério cerebral,

¹ Hypnol 3%, Fontoveter, Itapira, SP, Brasil

² Cloreto de Potássio 19,1%, Darrow, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

fragmentos de aproximadamente 0,5 cm³ de região de tálamo, hipocampo, córtex temporal/piriforme e substância branca periventricular foram colhidos, armazenados em solução preservadora de RNA³ e mantidos por 24 horas a 4°C e então a -80°C até o processamento das amostras. O hemisfério contralateral foi colhido inteiro em formol tamponado com fosfatos a 10%, pH 7,4 para processamento histológico e coloração pela Hematoxilina e Eosina. Fragmentos de aproximadamente 2 cm³ de baço também foram colhidos para extração de DNA, tendo sido imediatamente congelados a -80°C.

3.4. Diagnóstico de leishmaniose visceral

O diagnóstico de LV foi alcançado por meio de exame sorológico (ELISA) realizado segundo o protocolo descrito por Lima et al. (2005).

3.5. Determinação da carga parasitária esplênica de Leishmania sp.

Amostras de 25 mg de baço foram submetidas à extração de DNA utilizando-se um kit comercial⁴ e 20 µL de proteinase K, de acordo com as especificações do fabricante. O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro⁵ e somente amostras com valor da relação de absorbância

³ RNeasy RNeasy Lysis Buffer, Applied Biosystems®, Austin, TX, Estados Unidos da América

⁴ DNeasy Blood & Tissue kit 69506, Qiagen®, Valencia, CA, Estados Unidos da América

⁵ NanoDrop ND-1000, Nano-Drop Technologies®, Wilmington, DE, Estados Unidos da América

260/280 entre 1,8 e 2,0 foram incluídas nas análises subsequentes. O DNA obtido foi armazenado a -20°C.

Para quantificação da carga parasitária, uma curva padrão foi produzida utilizando DNA de *L. infantum* (cepa MHOM/BR/72/LD46) extraído de $1,6 \times 10^7$ promastigotas/mL, pelo método do fenol-clorofórmio. Resumidamente, as promastigotas foram submetidas a cinco ciclos de congelamento e descongelamento (1 minuto em nitrogênio líquido seguido de 2 minutos a 56°C). Na sequência, realizou-se a incubação com tampão de lise contendo acetato de sódio (200 mM), SDS (10%, p/v) e proteinase K (20 µg/mL)⁶ por 1 hora a 56°C sob agitação. As promastigotas foram então tratadas com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1)⁷, o DNA foi precipitado em etanol absoluto gelado e ressuspendido em 50 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM). O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro⁸ e foi incluído nas análises subsequentes somente se o valor da relação de absorvância 260/280 foi entre 1,8 e 2,0. Sete diluições seriadas (desde $1,6 \times 10^5$ a $1,6 \times 10^{-1}$ promastigotas/mL) foram feitas para composição da curva padrão para quantificação da carga parasitária e conservadas a -20°C.

Foram selecionados os oligonucleotídeos iniciadores senso (5'-CCTATTTTACACCAACCCCGAGT-3') e anti-senso (5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3') que amplificam um fragmento de 116 pb do minicírculo do kDNA de *Leishmania* (RANASINGHE et al., 2008).

⁶ P2308, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, Estados Unidos da América

⁷ P3803, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, Estados Unidos da América

⁸ NanoDrop ND-1000, Nano-Drop Technologies®, Wilmington, DE, Estados Unidos da América

As qPCRs foram realizadas em termociclador⁹ utilizando mastermix comercial com o fluoróforo *SYBR Green*¹⁰, 900 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 5 µL de DNA, num volume total de 25 µL. As amostras, em duplicata, foram incubadas a 94°C por 2 minutos e então por 40 ciclos de amplificação (94°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto), momento onde os dados de fluorescência foram coletados. Na sequência, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação (*melt curve*), de 60°C até 95°C, com incremento de 0,5°C a cada 5 segundos. Água livre de nucleases foi utilizada como controle negativo da reação.

3.6. Extração de RNA de encéfalo

As amostras de tecido armazenadas em solução preservadora de RNA a -80°C foram equilibradas a temperatura ambiente e a extração de RNA foi realizada utilizando-se um kit comercial¹¹ seguindo-se as especificações descritas pelo fabricante. Após a obtenção do RNA, procedeu-se com a lise de DNA genômico usando-se DNase¹². O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e somente amostras com valor da relação de absorbância 260/280 entre 2,0 e 2,3 foram incluídas nas análises subsequentes. O RNA foi armazenado a -80°C até o momento da transcrição reversa.

⁹ CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad®, Hercules, CA, Estados Unidos da América

¹⁰ SYBR® Green JumpStart Taq ReadMix S4438, Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, Estados Unidos da América)

¹¹ RiboPure AM1924, Applied Biosystems®, Austin, TX, Estados Unidos da América

¹² DNase I AM 1928, Applied Biosystems®, Austin, TX, Estados Unidos da América

3.7. Produção de cDNA

As amostras de RNA foram submetidas à transcrição reversa para produção cDNA utilizando-se um kit comercial¹³, de acordo com as especificações do fabricante. Resumidamente, 1000 ng de RNA foram incubados em solução contendo a enzima transcriptase reversa e oligonucleotídeo iniciador do tipo oligo(dT) por 1 hora a 40°C seguido de 10 minutos a 92°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento da realização das reações de amplificação (qPCR).

3.8. Oligonucleotídeos iniciadores e sondas de hidrólise

Oligonucleotídeos iniciadores e sondas para análise de citocinas na espécie canina foram selecionados da literatura científica ou foram desenhados utilizando o *software on-line* de acesso livre Primer3Plus¹⁴ (UNTERGASSER et al., 2007). As sondas de hidrólise foram conjugadas ao fluoróforo (*reporter dye*) FAM na extremidade 5', e ao supressor (*quencher dye*) BHQ-1 na extremidade 3' (Tabela 1). Os oligonucleotídeos iniciadores e as sondas foram sintetizados por BioBasic Inc (Ontário, Canadá) (G3PDH, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40) ou por Sigma-Aldrich Corp (Texas, Estados Unidos da América) (IFN- γ , TGF- β , TNF- α) e reconstituídos em água livre de nucleases para a concentração de 100 μ M.

¹³ RETROscript AM 1710, Applied Biosystems®, Austin, TX, Estados Unidos da América

¹⁴ Disponível em: <<http://www.primer3plus.com>>

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores senso (*forward*: F), anti-senso (*reverse*: R) e das sondas de hidrólise (S) utilizados nas qPCRs

Gene alvo	Oligos e Sondas	Sequência (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Nº acesso GenBank	Referência
G3PDH	F	TCAACGGATTTGGCCGTATTGG	90	AB022763	Peters et al., 2005
	R	TGAAGGGGTCATTGATGGCG			
	S	CAGGGCTGCTTTTAACTCTGGCAAAGTGAA			
IL-1 β	F	TCTCCCACCAGCTCTGTAACAA	80	Z70047	Fujiwara et al., 2003
	R	GCAGGGCTTCTTCAGTTCTC			
	S	CTGAGGCATTTCTGTCTCAGTCATTGTAGCTT			
IL-6	F	CTCTCCACAAGCGCCTTCTC	102	U12234	Peters et al., 2005
	R	TGAAGTGGCATCATCCTTGG			
	S	TGGGGCTGCTCCTGGTGATG			
IL-10	F	CGACCCAGACATCAAGAACC	101	U33843	Peters et al., 2005
	R	CACAGGGAAGAAATCGGTGA			
	S	TCCCTGGGAGAGAAGCTCAAGACCC			
IL-12p40	F	CAGCAGAGAGGGTCAGAGTGG	109	AF091134	Peters et al., 2005
	R	ACGACCTCGATGGGTAGGC			
	S	TGGAGTGTCAGGAGGGCAGTGC			
IFN- γ	F	TCAACCCCTTCTCGCCACT	113	AF126247	Peters et al., 2005
	R	GCTGCCTACTTGGTCCCTGA			
	S	CCCACCCGAACCTCTTCCT			
TGF- β	F	CTGGAGTCGTGAGGCAGTG	96	L34956	Peters et al., 2005
	R	GCAGTGTGTTATCTTTGCTGTCA			
	S	TTTCGCCTCAGTGCCCACTG			
TNF- α	F	ACCCATGTGCTCCTCACC	87	Z70046	desenhado
	R	AGGGCTCTTGATGGCAGAGA			
	S	CGCTTCGCCGTCTCCTACCA			

3.9. Avaliação da expressão gênica de citocinas

As qPCRs foram realizadas em termociclador¹⁵ utilizando mastermix comercial¹⁶, 400 nM de cada oligonucleotídeo iniciador, 250 nM da sonda e 5 µL de cDNA, num volume total de 25 µL. As amostras, em duplicata, foram incubadas a 55°C por 2 minutos, após a 95°C por 10 minutos e então por 45 ciclos de amplificação (95°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto), momento onde os dados de fluorescência foram coletados. Valores de eficiência de reação, do coeficiente de determinação e do coeficiente angular foram obtidos a partir de sete diluições seriadas de cDNA para cada uma das citocinas avaliadas. Como controle negativo da reação foi utilizada água livre de nucleases.

A quantificação da expressão gênica das citocinas foi avaliada pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, segundo Livak e Schmittgen (2001), usando-se o sinal do gene de referência G3PDH para normalização dos dados. Os resultados foram descritos como a expressão gênica relativa, ou seja, esse método expressa o número de vezes (*fold change*) que determinado gene está mais ou menos expresso no grupo infectado em relação ao grupo controle.

¹⁵ CFX96TM Real-Time System, Bio-Rad®, Hercules, CA, Estados Unidos da América

¹⁶ TaqMan Universal PCR Master Mix 4304437, Applied Biosystems®, Austin, TX, Estados Unidos da América

3.10. Análise estatística

Para as análises, todos os valores foram transformados na escala logarítmica de base 10. Para análise estatística envolvendo citocinas, foram utilizados os valores obtidos da equação $2^{-\Delta Ct}$ no grupo infectado. A correlação entre a expressão gênica das citocinas e a carga parasitária foi avaliada pelo teste de Pearson. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação da expressão gênica das citocinas de acordo com os sinais clínicos (assintomático, oligossintomático e sintomático). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$, e foram considerados como evidência de tendência estatística quando $0,05 < p < 0,1$. Todas as análises foram realizadas usando-se o *software* Prism¹⁷

¹⁷ Prism 5, GraphPad, San Diego, Estados Unidos da América

4. RESULTADOS

4.1. Expressão gênica de citocinas no encéfalo

Com os oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados, foi possível detectar a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IFN- γ e TNF- α , e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β . Os valores de eficiência, coeficiente de determinação e coeficiente angular relativos às reações de amplificação de cada um dos genes avaliados estão listados na Tabela 2.

Nos cães com LV, a citocina IL-1 β teve sua expressão aumentada em 8,04 vezes em relação aos cães controle, a IL-6 em 3,49 vezes; o IFN- γ em 5,85 vezes; e o TNF- α em 6,34 vezes (Figura 1). Três citocinas apresentaram expressão diminuída nos cães com LV em relação aos cães controle: a IL-10 (6,08 vezes), a IL-12p40 (6,81 vezes) e o TGF- β (5,25 vezes).

Para se avaliar a interação entre diferentes citocinas, valores de log derivados da equação $2^{-\Delta C_t}$, foram submetidos à análise de correlação pelo teste de Pearson. Dentre as citocinas pró-inflamatórias, o TNF- α apresentou forte correlação positiva com a IL-6 ($p = 0,0041$; $r = 0,693$; Figura 2a) e correlação moderada positiva com a IL-1 β ($p = 0,0463$; $r = 0,489$; Figura 2b) e com o IFN- γ ($p = 0,0101$; $r = 0,605$; Figura 2c). Não houve correlação do TNF- α com a IL-10 ($p = 0,1549$), com a IL-12p40 ($p = 0,4012$) e com o TGF- β ($p = 0,3708$).

A IL-6 apresentou tendência de correlação moderada positiva com o IFN- γ ($p = 0,0997$; $r = 0,413$; Figura 2d). De maneira contrária, a IL-6 apresentou correlação moderada negativa com a IL-10 ($p = 0,0142$; $r = -0,582$; Figura 2e), ou seja, a expressão aumentada da IL-6 está relacionada com a diminuição da IL-10. A IL-6 não apresentou correlação com a IL-1 β ($p = 0,2817$), com a IL-12p40 ($p = 0,2286$) e com o TGF- β ($p = 0,1337$). A IL-12p40 não apresentou correlação com a IL-1 β ($p = 0,9781$), com a IL-10 ($p = 0,1844$), com o IFN- γ ($p = 0,1112$) ou com o TGF- β ($p = 0,1132$). Para a IL-1 β , não houve correlação com a IL-10 ($p = 0,8791$), com o IFN- γ ($p = 0,1459$) e com o TGF- β ($p = 0,8269$). A IL-10 também não apresentou correlação com o IFN- γ ($p = 0,1241$) e com o TGF- β ($p = 0,1944$). Ainda, não houve correlação entre o IFN- γ e o TGF- β ($p = 0,8903$).

Tabela 2 – Valores de eficiência (E), coeficientes de determinação (r^2) e coeficientes angulares (*slope*) relativos às reações para amplificação dos genes avaliados

Gene alvo	E	r^2	<i>Slope</i>
G3PDH	99,8	0,956	-3,327
IL-1 β	99,9	0,976	-3,323
IL-6	96,5	0,983	-3,383
IL-10	99,9	0,981	-3,323
IL-12p40	98,5	0,971	-3,331
IFN- γ	99,1	0,969	-3,342
TGF- β	96,9	0,992	-3,399
TNF- α	97,2	0,989	-3,419

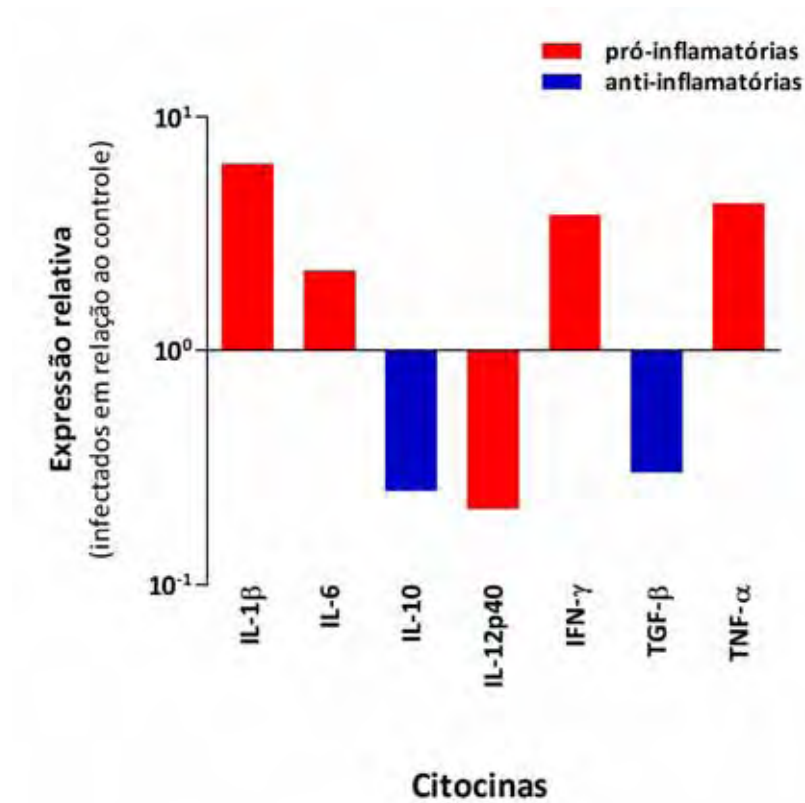


Figura 1 – Expressão gênica média relativa de citocinas no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. Os valores, na escala logarítmica na base 10, indicam quantas vezes (*fold change*) o gene para a citocina está mais expresso (valores positivos) ou menos expresso (valores negativos) em relação aos cães do grupo controle. O fator de normalização dos dados usado foi o sinal do gene de referência G3PDH, segundo o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

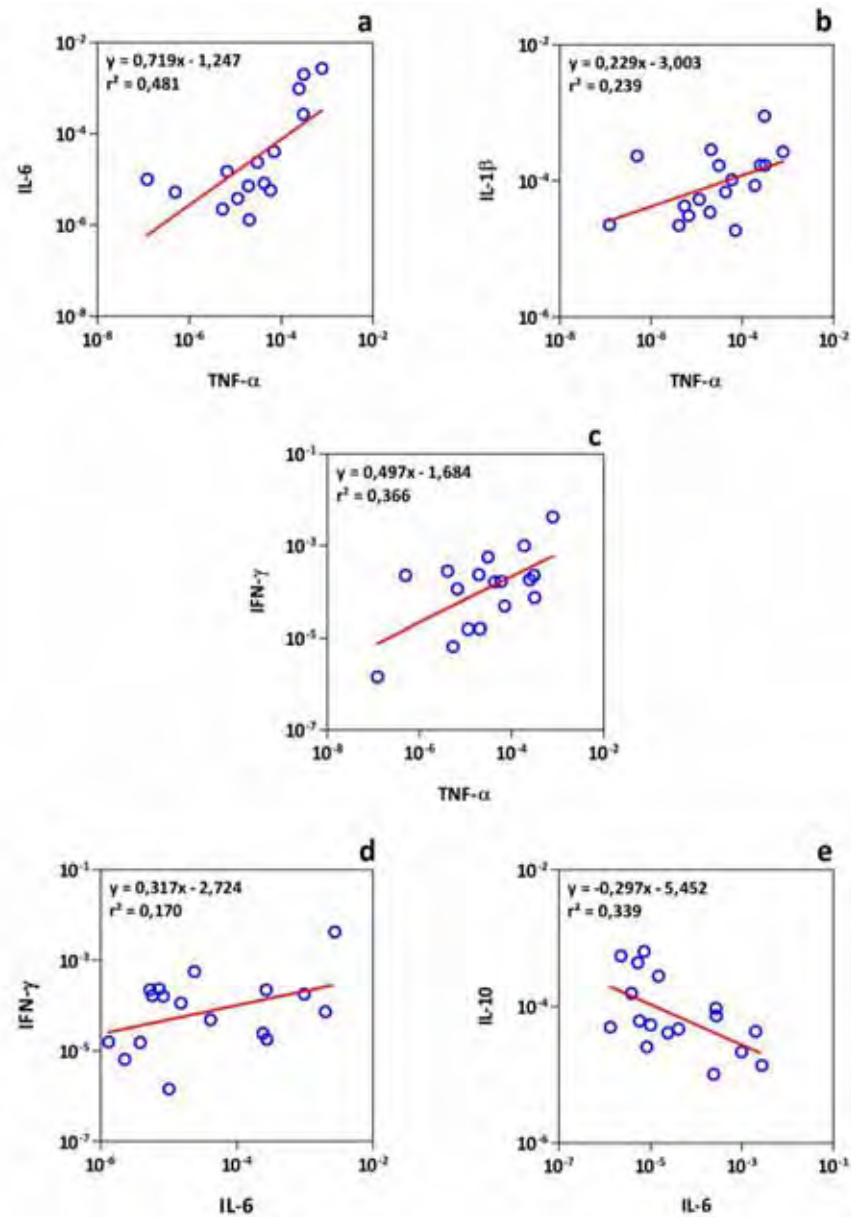


Figura 2 – Correlação (teste de Pearson) entre citocinas no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. Os *scatter plots* indicam a correlação positiva entre TNF- α e IL-6 (**a**; $p = 0,0041$), TNF- α e IL-1 β (**b**; $p = 0,0463$), TNF- α e IFN- γ (**c**; $p = 0,0101$), a tendência de correlação positiva entre IL-6 e IFN- γ (**d**; $p = 0,0997$), e a correlação negativa entre IL-6 e IL-10 (**e**; $p = 0,0142$). A equação dos mínimos quadrados e os valores do coeficiente de determinação (r^2) estão mostrados nos gráficos. Valores em escala logarítmica na base 10.

4.2. Carga parasitária esplênica

A partir da curva-padrão composta por sete diluições seriadas (10^5 até 10^{-1}) de DNA de promastigotas de *L. chagasi*, foi possível quantificar a presença do DNA do protozoário no baço de todos os cães infectados, com amplitude de detecção desde $4,44 \times 10^{-1}$ até $8,31 \times 10^5$ parasitas/25 mg de tecido esplênico (Figura 3a). Em nenhum dos cães do grupo controle foi observada amplificação. A reação de amplificação para *Leishmania* obteve eficiência de 100%, coeficiente de determinação de 0,968 e coeficiente angular de -3,323. A curva de dissociação indicou especificidade do par de oligonucleotídeos iniciadores utilizado, devido à presença de somente um pico na temperatura de 83,5°C.

Para testar se a carga parasitária periférica influencia a expressão gênica de citocinas no SNC (Figura 3b-h), foi usado o teste de Pearson, após transformação dos dados na escala logarítmica na base 10. Não houve correlação entre a carga parasitária com a IL-1 β ($p = 0,3884$), com a IL-6 ($p = 0,1758$), com a IL-10 ($p = 0,8716$), com a IL-12p40 ($p = 0,6869$), com o IFN- γ ($p = 0,2606$), com o TGF- β ($p = 0,4029$) e tampouco com o TNF- α ($p = 0,1716$).

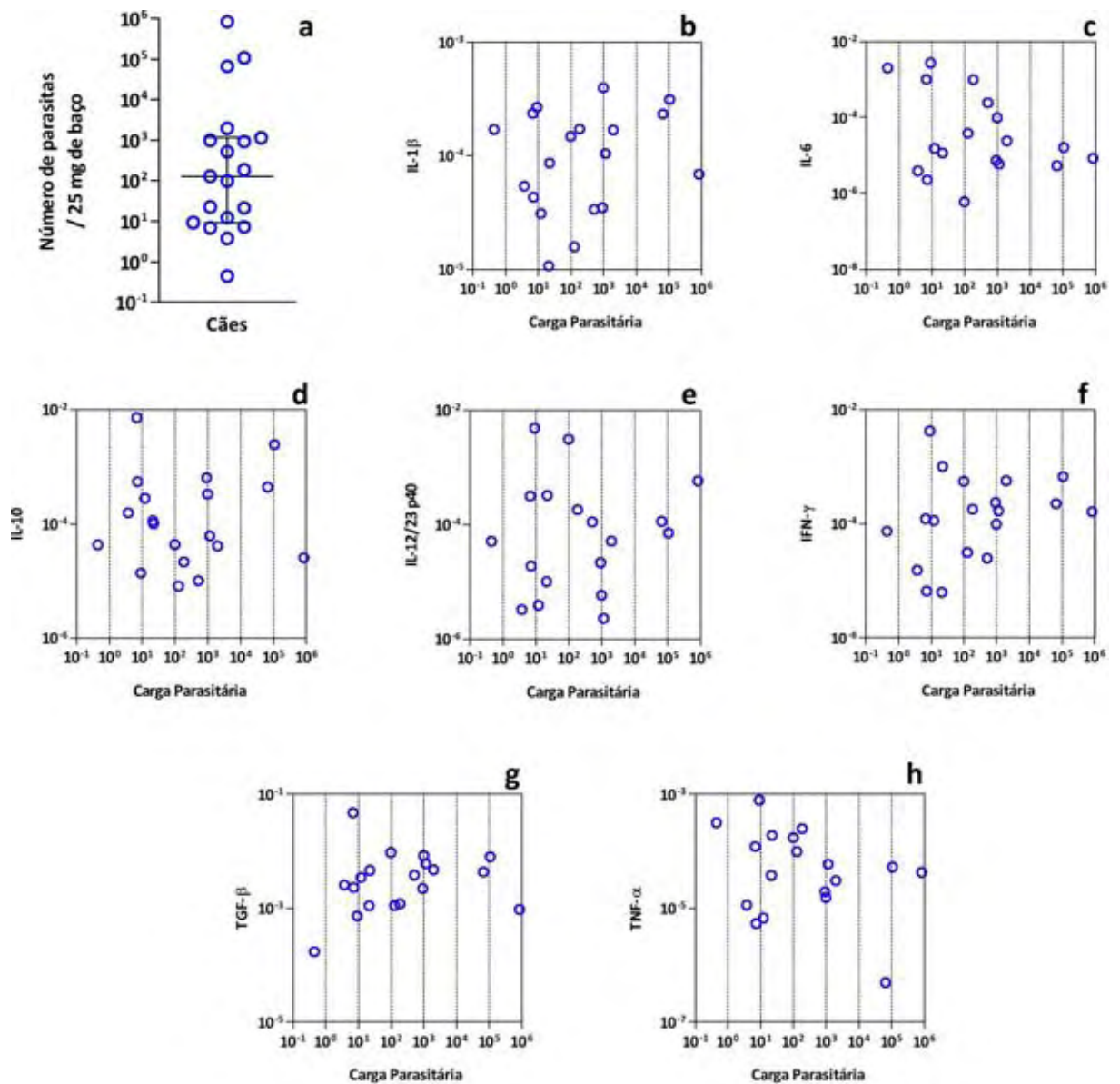


Figura 3 – Carga parasitária de *Leishmania chagasi* no baço de cães infectados (a) e sua correlação com a expressão gênica das citocinas IL-1 β (b), IL-6 (c), IL-10 (d), IL-12p40 (e), IFN- γ (f), TGF- β (g) e TNF- α (h) no encéfalo. Não houve correlação significativa entre a carga parasitária com nenhuma das citocinas avaliadas. Valores em escala logarítmica na base 10.

4.3. Lesões macroscópicas

A Tabela 3 relaciona as principais alterações encontradas durante o exame necroscópico dos animais. Os achados mais prevalentes foram representados por alterações dermatológicas (seborréia, alopecia periocular, alopecia generalizada, hiperqueratose de plano nasal, hipotricose em membros, pododermatite), alterações oftálmicas (conjuntivite, blefarite, secreção ocular), linfadenopatia generalizada e emagrecimento/caquexia. Nenhum dos animais apresentou alterações neurológicas macroscópicas.

Os cães infectados foram divididos em três subgrupos de acordo com os sinais clínicos: subgrupo assintomático (n=3); subgrupo oligossintomático (n=8), e subgrupo sintomático (n=8). Com isso, foi possível avaliar se cães com diferentes manifestações clínicas da LV possuem um perfil de citocinas diferentes no encéfalo (Figura 4). A carga parasitária não variou de acordo com a manifestação clínica ($p = 0,7571$), tampouco a expressão gênica das citocinas IL-1 β ($p = 0,4221$), IL-6 ($p = 0,3128$), IL-10 ($p = 0,3684$), IL-12p40 ($p = 0,7263$), IFN- γ ($p = 0,7985$), TGF- β ($p = 0,1147$) e TNF- α ($p = 0,2231$).

Tabela 3 – Alterações macroscópicas observadas durante o exame necroscópico dos cães, de acordo com os subgrupos experimentais

Alterações macroscópicas	Sintomático (n=8)		Oligossintomático (n=8)		Assintomático (n=3)		Controle (n=6)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Alterações dermatológicas	7	87,5	4	50,0	-	-	-	-
Alterações neurológicas	-	-	-	-	-	-	-	-
Alterações oftálmicas	7	87,5	2	25,0	-	-	-	-
Baço (polpa branca evidente)	1	12,5	2	25,0	-	-	-	-
Emagrecimento/caquexia	4	50,0	2	25,0	-	-	-	-
Hepato/esplenomegalia	2	25,0	2	25,0	-	-	-	-
Linfadenopatia	7	87,5	4	50,0	-	-	-	-
Onicogribose	7	87,5	-	-	-	-	-	-
Outros	2	25,0	1	12,5	-	-	-	-
Sem alteração	-	-	-	-	3	100,0	6	100,0

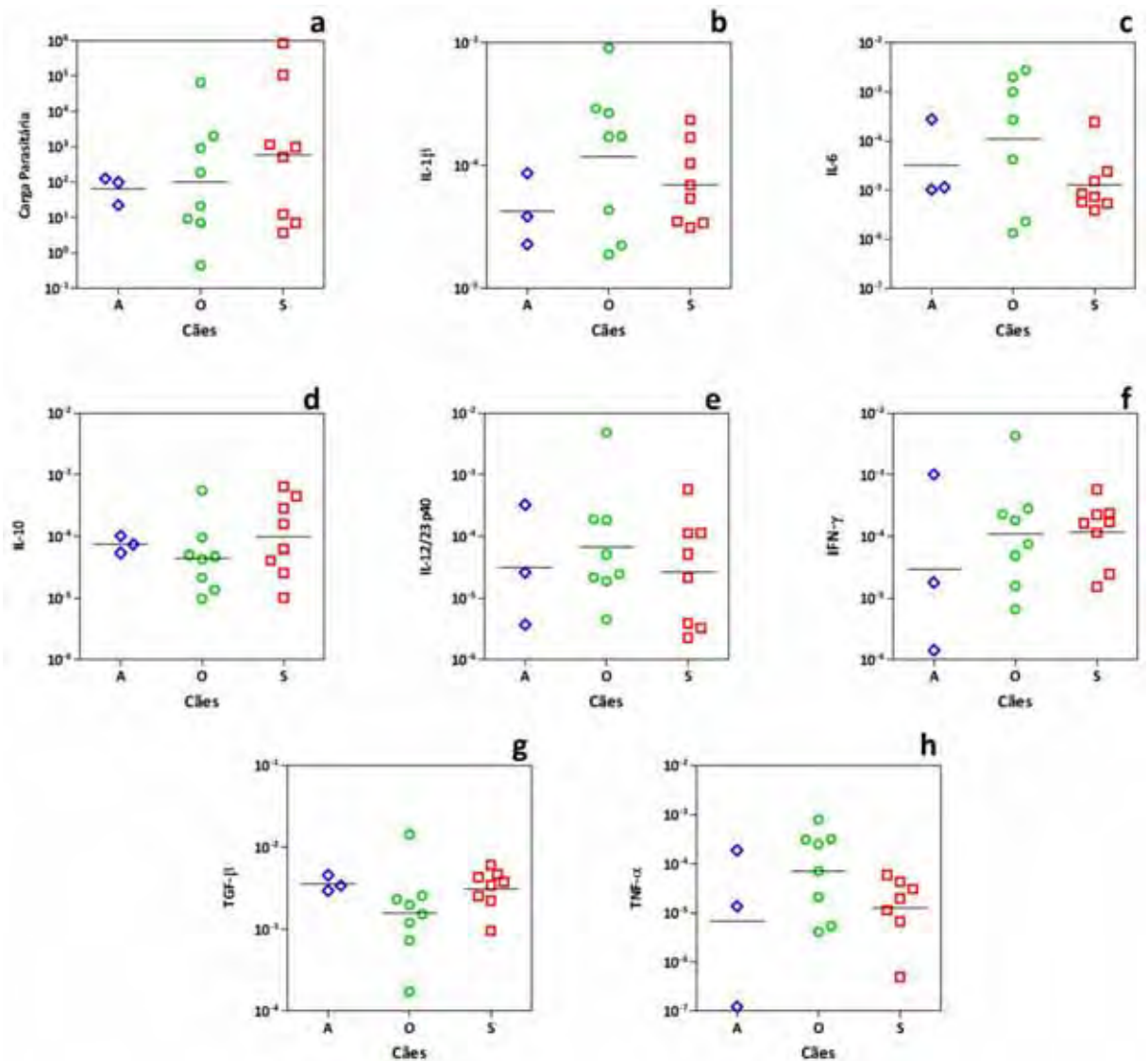


Figura 4 – Variação das diferentes manifestações clínicas da leishmaniose visceral em cães (A: assintomáticos; O: oligossintomáticos; S: sintomáticos) de acordo com a carga parasitária de *Leishmania chagasi* no baço (a) e com a expressão gênica das citocinas IL-1 β (b), IL-6 (c), IL-10 (d), IL-12p40 (e), IFN- γ (f), TGF- β (g) e TNF- α (h) no encéfalo. As linhas horizontais indicam o valor médio. Não houve diferença significativa em relação à carga parasitária e tampouco em relação a nenhuma das citocinas avaliadas. Valores em escala logarítmica na base 10.

4.4. Análise histopatológica

A análise histopatológica do encéfalo dos cães com leishmaniose visceral revelou predominantemente alterações inflamatórias. Foi detectada infiltração de células mononucleares, com intensidades variando de leve a intensa, em áreas perivasculares, sobretudo em leptomeninges (Figura 5a), plexo coróide (Figura 5b) e regiões periventriculares (Figura 6b). Presença de infiltrado perivascular no parênquima cerebral, área onde a barreira hematoencefálica (BHE) está presente, também foi observada, com intensidade discreta a moderada (Figura 6a).

Alterações das células nervosas também foram detectadas. No tocante aos neurônios, presença de satelitose e neuronofagia. A resposta das células da glia foi observada principalmente em áreas periventriculares, com presença de gliose focal (Figura 7a) até áreas de gliose difusa com desorganização do neurópilo (Figura 7b), e também regiões de microgliose difusa (Figura 8), onde houve presença de grande quantidade de células microgliais em região subependimária.

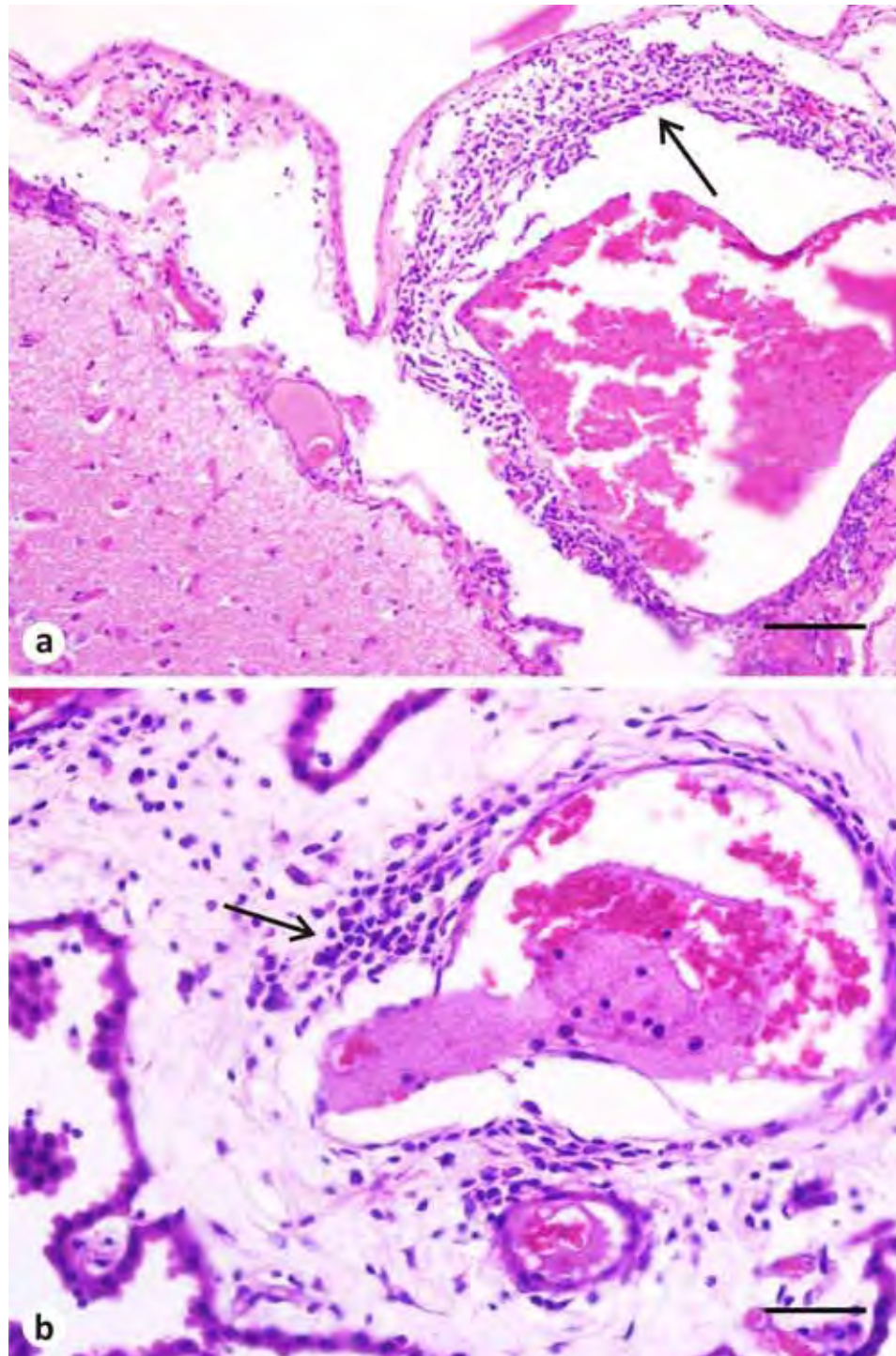


Figura 5 – Fotomicrografias representativas das alterações histopatológicas no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. **(a)** intenso infiltrado linfoplasmocitário perivascular (seta) em leptomeninge cortical. **(b)** infiltrado linfoplasmocitário perivascular (seta) em plexo coróide do ventrículo lateral. Hematoxilina e Eosina. Barra = 100 μ m (a), 50 μ m (b).

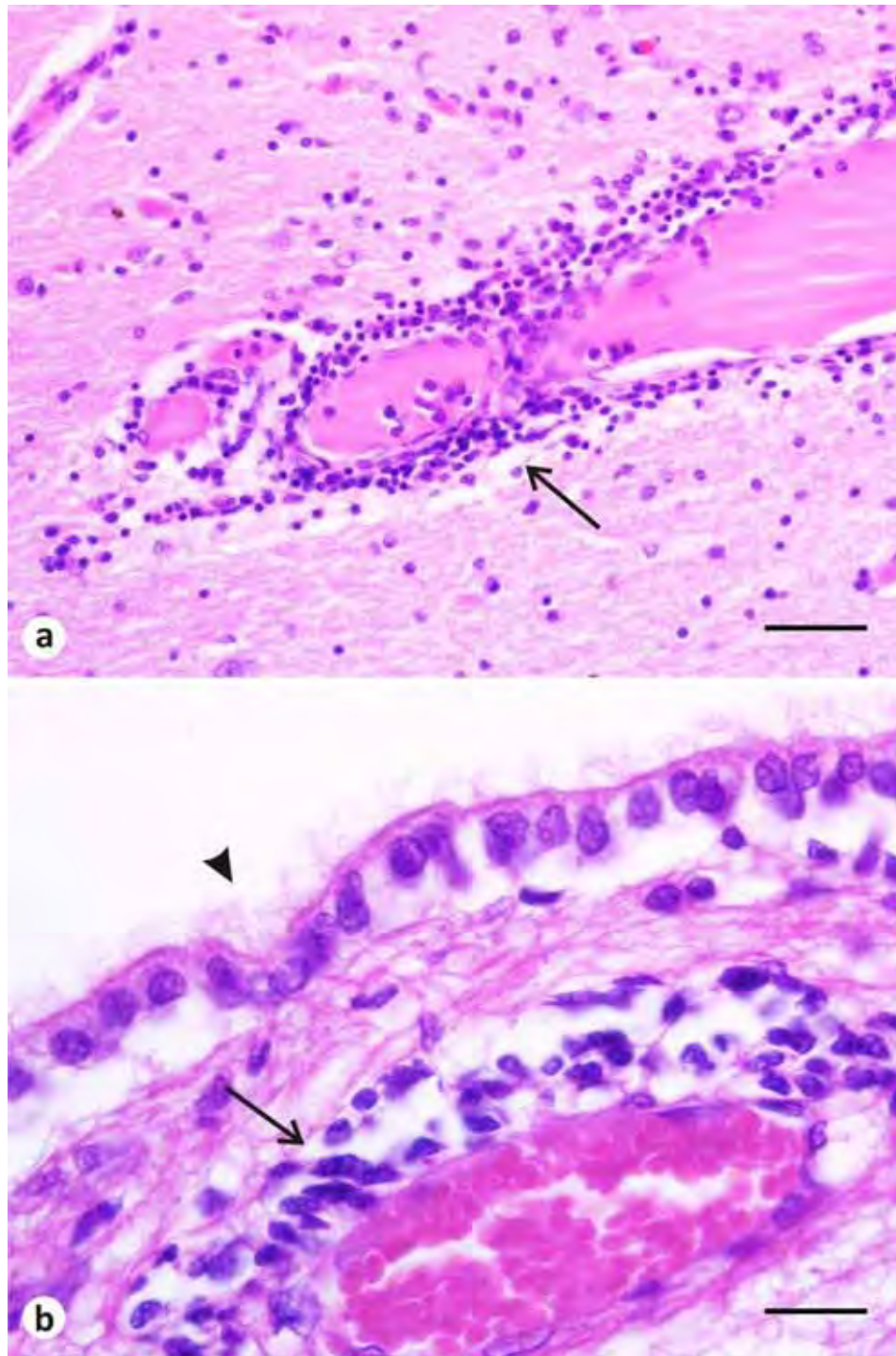


Figura 6 – Fotomicrografias representativas das alterações inflamatórias perivasculares no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. **(a)** manguito perivascular mononuclear (seta) no córtex piriforme. **(b)** infiltrado inflamatório perivascular mononuclear (seta) em região subependimária, sem, contudo, comprometimento da camada ependimária (cabeça de seta). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m (a), 20 μ m (b).

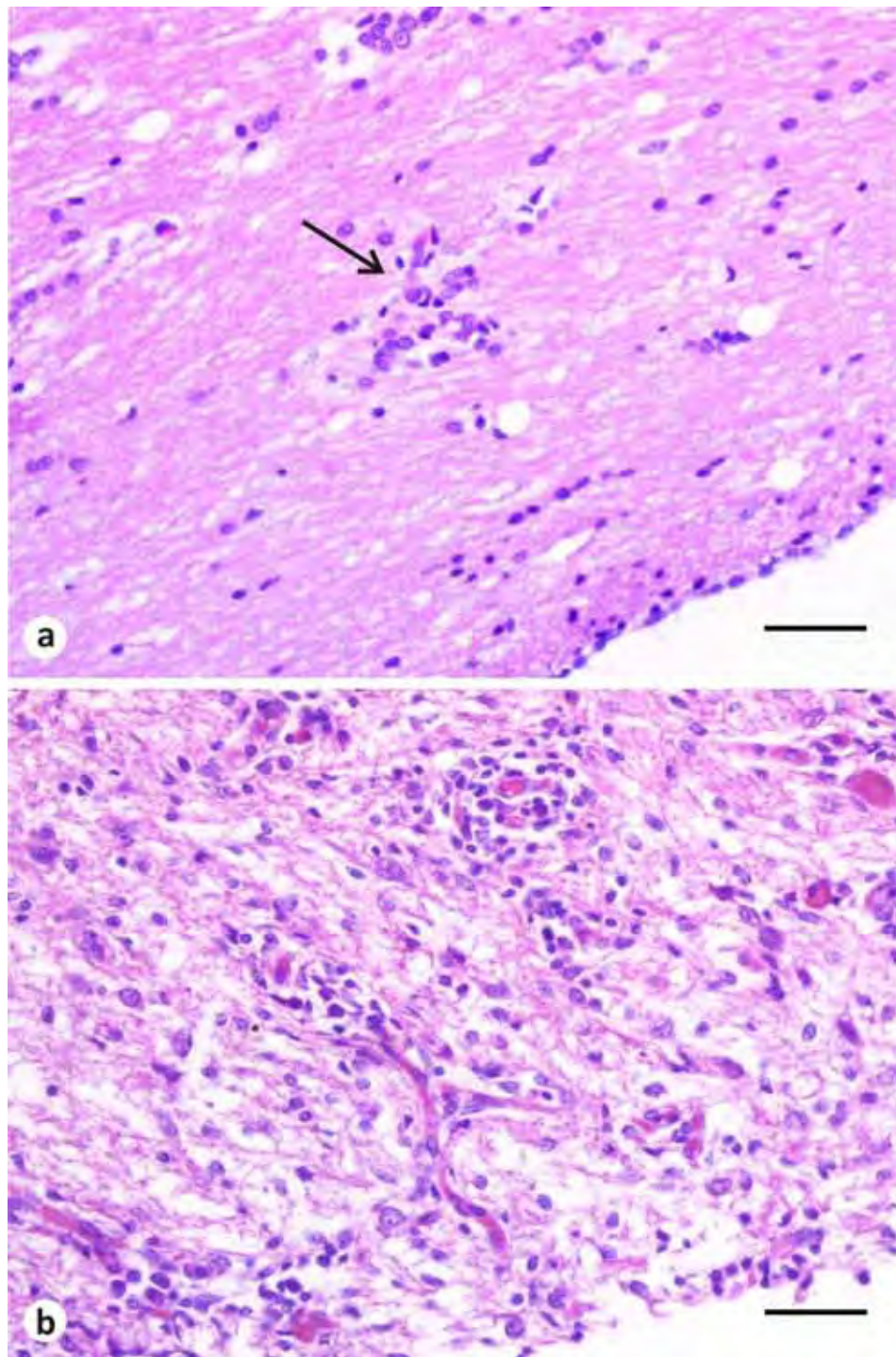


Figura 7 – Fotomicrografias representativas das alterações gliais no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. **(a)** nódulo glial focal (seta) em área subependimária. **(b)** gliose difusa em área subependimária com desorganização do neuropilo. Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m.

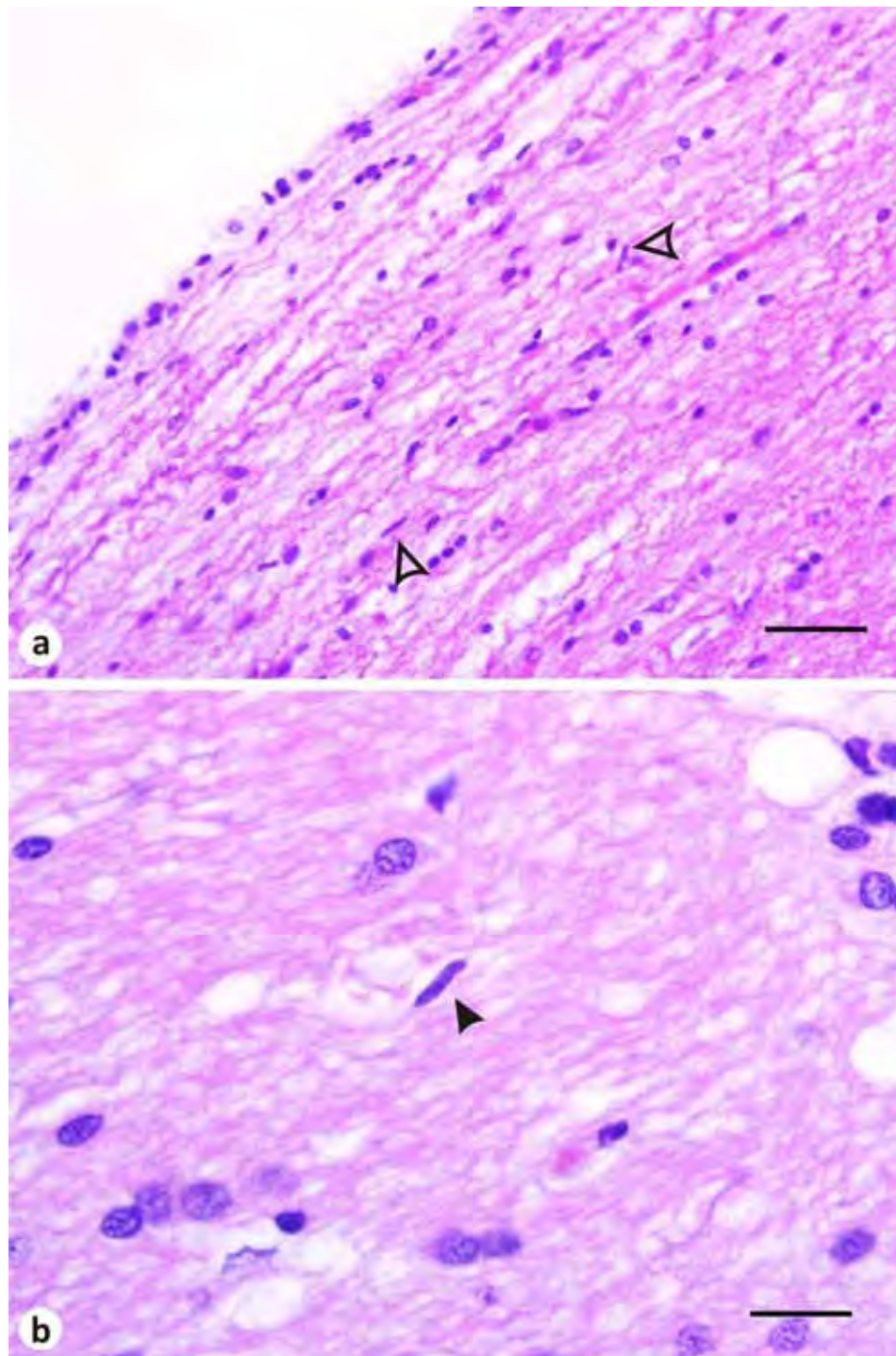


Figura 8 – Fotomicrografias representativas das alterações microgliais no encéfalo de cães com leishmaniose visceral. (a) área de microgliose difusa em região subependimária. Notar grande quantidade de células microgliais (cabeça de seta). (b) detalhe em maior aumento de uma célula microglial (cabeça de seta), apresentando núcleo alongado em formato de bastão (*rod cell*). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m (a), 20 μ m (b).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível avaliar a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IFN- γ e TNF- α e das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β por meio de RT-qPCR no encéfalo de cães com LV.

Nos cães com LV foi observada uma elevação da expressão gênica de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , as principais citocinas observadas no SNC durante a inflamação, relacionadas com febre, defesa contra patógenos e indução da produção de outras citocinas (DE VRIES et al., 1997). Foi detectada uma correlação positiva entre as expressões gênicas das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , evidenciando a relação entre a biossíntese dessas citocinas, de forma a ilustrar quão intrincada e redundante é a resposta imune no SNC.

Especificamente, uma das características do processo inflamatório no SNC é a perda da integridade da BHE. A IL-1 β é considerada uma das principais citocinas que atuam na quebra da BHE, juntamente com a IL-6 e com o TNF- α , sobretudo por aumentar a expressão de moléculas de adesão no endotélio, proporcionando a migração leucocitária (ABBOTT et al., 2006; DE VRIES et al., 1996; HICKEY, 1999; QUAGLIARELLO et al., 1991). Evidências da ação do IFN- γ na BHE também existem. Células endoteliais microvasculares derivadas do SNC e incubadas com IFN- γ sofrem mudanças

morfológicas e organizacionais, levando a alterações de permeabilidade, bem como aumento da expressão de MHC de classe II (HUYNH; DOROVINI-ZIS, 1993).

A integridade da BHE não é afetada somente pela presença de fatores que a desregulam, mas igualmente pela ausência de componentes que auxiliam na sua manutenção. O TGF- β está relacionado com a integridade da BHE pela conservação da integridade das junções oclusivas (*tight junctions*) das células endoteliais (DOHGU et al., 2004) e por sua produção contínua pelos pericitos da barreira (DOHGU et al., 2005). Ainda em relação ao papel dos pericitos na manutenção da BHE, essas células são sensíveis à estimulação pelo TNF- α e liberam MMP-9, uma das principais enzimas proteolíticas relacionadas com quebra da BHE (TAKATA et al., 2011). Uma vez que a expressão de TNF- α encontra-se elevada, e que a presença de MMP-9 já foi descrita no líquido cefalorraquidiano e no encéfalo de cães com LV (MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011), em conjunto, é possível sugerir que a infecção por *L. infantum* promova uma desregulação da permeabilidade seletiva da BHE, com posterior infiltração de leucócitos.

As alterações histopatológicas do SNC dos cães com LV também podem ser secundárias à ação das citocinas pró-inflamatórias, como o IFN- γ , que foi relacionado com a proliferação de astrócitos *in vitro* e com a ocorrência de gliose em encéfalo de camundongos (YONG et al., 1991), situação semelhante ao que ocorre no SNC de cães com LV (MELO; MACHADO, 2011). Em contrapartida, a ausência de fatores neuroprotetores, como as citocinas anti-

inflamatórias IL-10 e TGF- β podem contribuir para a ocorrência de lesão tecidual. A IL-10 inibe a produção de citocinas e a expressão de receptores de citocinas em células microgliais (SAWADA et al., 1999) e camundongos *knock-out* para IL-10 são mais suscetíveis e não apresentam recuperação espontânea na encefalomielite autoimune experimental (SAMOILOVA et al., 1998). Ademais, foi observada correlação negativa entre a expressão de IL-10 e IL-6, sugerindo que o aumento da expressão gênica da IL-6 pode colaborar para a diminuição da expressão da IL-10.

Já o TGF- β é considerado um agente anti-neurodegenerativo, e um estudo com camundongos *knock-out* revelou sua capacidade de manter a integridade e sobrevivência neuronal e de regular a atividade microglial (BRIONNE et al., 2003). A diminuição de sua expressão no encéfalo dos cães com LV é um fator adicional para esclarecer os achados histopatológicos desse estudo, como morte neuronal e gliose, e corroboram os resultados de estudos anteriores que versam sobre a ativação microglial em cães com LV (MELO; MACHADO, 2011).

Surpreendentemente, de maneira contrária ao observado com as demais citocinas pró-inflamatórias avaliadas, a IL-12p40 mostrou-se diminuída no SNC dos cães com LV. Uma provável hipótese para a diminuição da expressão dessa citocina pode ser a ação de outras citocinas, numa espécie de *feedback* negativo após uma ação inicial da IL-12, como o TNF- α e o IFN tipo I, ou mesmo outros mediadores inflamatórios como prostaglandina E2, componentes do sistema complemento e imunocomplexos (MA et al., 2000; MA, 2001;

McRAE et al., 1998). No SNC, a principal produtora de IL-12 é a microglia e a interação com outras células pode influenciar sua capacidade de produção de IL-12. *In vitro*, células microgliais estimuladas com LPS/IFN- γ produziram grandes quantidades de IL-12p40 e IL-12p70, contudo, em co-culturas de astrócitos e micróglia, ou em cultura microglial adicionada de meio condicionado de cultura astrocitária, a detecção de IL-12p40 e IL-12p70 sofreu expressivo decréscimo (ALOISI et al., 1997).

Dentre os principais sintomas neurológicos relatados em cães com LV encontram-se convulsões generalizadas (IKEDA et al., 2007; MARCONDES, 2008). Recentemente, como principais causas da epileptogênese, foram descritas inflamação e quebra da BHE (CHOI; KOH, 2008; VEZZANI; GRANATA, 2005), e a ocorrência de convulsões espontâneas foi relacionada com gliose reativa e degeneração neuronal e astrocitária (BORGES et al., 2003; CHOI; KOH, 2008; VEZZANI; GRANATA, 2005). Além disso, a expressão microglial de uma gama de citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, têm sido relacionada com astrogliose, e uma vez que a hipertrofia de astrócitos desregula a absorção astrocitária do glutamato, pode predispor a ocorrência de convulsões (HANISCH, 2002; CHOI; KOH, 2008).

De acordo com o conhecimento dos autores, esse é o primeiro estudo que avalia o perfil de citocinas no encéfalo de cães com LV. Em análise comparativa com outras doenças causadas por protozoários, o perfil de citocinas expresso no SNC é semelhante. Ratos infectados por *Trypanosoma brucei* exibiram elevados níveis de mRNA para IL-1 β e TNF- α (QUAN et al.,

1999). Na encefalite toxoplásmica em camundongos houve elevação de IL-1 β , mas também de IL-10 (SCHLÜTER et al., 1997). Astrócitos infectados *in vitro* com *Toxoplasma gondii* produziram IL-1 β , IL-6 e GM-CSF, enquanto a micróglia produziu TNF- α e TGF- β concomitantemente (FISCHER et al., 1997). Na malária cerebral murina foi observado aumento da expressão de IL-1 β , IFN- γ e TNF- α , mas sem elevação das IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 e GM-CSF (JENNINGS et al., 1997).

Ainda, camundongos suscetíveis à malária cerebral expressaram menores níveis de IL-10 no encéfalo (KOSSODO et al., 1997). De maneira oposta, em casos humanos de malária cerebral, houve elevação da detecção imunistoquímica de TGF- β 1, 2 e 3 (DEININGER et al., 2000). Apesar da presença de um estado de ativação imune no SNC de portadores dessas doenças, a variação no perfil das citocinas, especialmente em relação àquelas anti-inflamatórias, pode ser decorrente de diferenças inerentes a cada patógeno, bem como da ausência da *Leishmania* no ambiente nervoso, diferente do que ocorre com o *Plasmodium*, *Toxoplasma* e *Trypanosoma*.

Até o presente momento, não existem muitas evidências da presença da *Leishmania* no SNC (NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001) sendo mais comuns os estudos que não detectam o parasita no encéfalo (IKEDA et al., 2007; MELO; MACHADO, 2009; MELO; MACHADO, 2011). Por conseguinte, as alterações inflamatórias descritas no SNC de cães com LV são consideradas como consequência de estímulos imunológicos periféricos além

de deposição de imunocomplexos e antígenos circulantes (GARCIA-ALONSO et al., 1996; IKEDA et al., 2007).

A resposta do encéfalo a estímulos periféricos é bem descrita em animais experimentais. A administração periférica de LPS em camundongos induziu a expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α tanto no baço como no encéfalo, mas o padrão de expressão dessas citocinas foi diferente (LAYÉ et al., 1994). Ainda, em outro estudo utilizando administração peritoneal de LPS em ratos, foi detectado o aumento da expressão de IL-1 β no encéfalo, sendo que as primeiras regiões a apresentarem a expressão dessa citocina foram o plexo coróide, os órgãos circunventriculares e as leptomeninges (QUAN et al., 1998). Esses estudos, apesar de utilizarem o LPS como modelo experimental, dão suporte à hipótese de que as infecções periféricas, como a causada pela *Leishmania*, podem promover alterações no SNC, e também à da compartimentalização da resposta imune durante a LV, onde diferentes órgãos e tecidos produzem uma resposta imune específica e distinta, após um mesmo estímulo (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010; REIS et al., 2009).

Padrões de perfil de citocinas em cães com LV já foram descritos em baço, fígado, linfonodo, medula óssea, células mononucleares de sangue periférico e pele. Em todos os casos houve variação de acordo com o órgão/tecido estudado e com a manifestação clínica da doença (BARBOSA et al., 2011; CHAMIZO et al., 2005; MANNA et al., 2006; MENEZES-SOUZA et al., 2011; PANARO et al., 2009; REIS et al., 2009; SANTOS-GOMES et al., 2002). No presente estudo, não foi detectada correlação entre o perfil de

citocinas expresso no encéfalo de cães com LV e a manifestação clínica da doença, e tampouco com a carga parasitária dos animais, o que é sugestivo de que as alterações encefálicas que ocorrem nesses cães são decorrentes da desregulação da resposta imune periférica, independentemente da forma clínica ou do grau de infecção, resultado corroborado por outros estudos envolvendo a infiltração de linfócitos T (MELO et al., 2009), a ativação glial (MELO; MACHADO, 2011), a presença de MMP-2 e MMP-9 no líquido cefalorraquidiano (MARANGONI et al., 2011), e de MMP-9 no tecido nervoso (MACHADO et al., 2010).

CONCLUSÃO

No presente estudo detectamos acréscimo na expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α , aliada à diminuição na expressão gênica das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β . Por outro lado a expressão da gênica citocina pró-inflamatória IL-12p40 mostrou-se reduzida no encéfalo de cães com LV. Em conjunto, esses achados indicam um ambiente pró-inflamatório no SNC de cães com LV e sugerem que as alterações encefálicas estão relacionadas com o perfil de citocinas detectado, já que a expressão de IL-1 β , IL-6 e TNF- α são tidas como um fator chave para a iniciação, manutenção e persistência da inflamação. A ausência de correlação dessas citocinas com a manifestação clínica e a carga parasitária periférica de *Leishmania* sugere que as alterações encefálicas são decorrentes da própria resposta imune do hospedeiro, independentemente da fase em que a doença se encontra.

REFERÊNCIAS

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

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; TEDESCO, R.C.; MORTARA, R.A.; DA-COSTA, S.C. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.68, n.6, p.661-665, 2003.

ALEXANDRE-PIRES, G.; DE BRITO, M.T.V.; ALGUERÓ, C.R.; MARTINS, C.; RODRIGUES, O.R.; DA FONSECA, I.P.; SANTOS-GOMES, G. Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.137, n.3-4, p.275-283, 2010.

ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2, n.10, p.734-744, 2001.

ALOISI, F.; PENNA, G.; CERASE, J.; MENENDEZ IGLESIAS, B.; ADORINI, L. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. **The Journal of Immunology**, v.159, n.4, p.1604-1612, 1997.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p.1-88, 2004.

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

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

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

BARBOSA, M.A.G.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SOARES-CLEMENTE, M.; MARQUES, C.; RODRIGUES, O.R.; DE BRITO, T.V.; DA FONSECA, I.P.; ALVES, L.C.; SANTOS-GOMES, G.M. Cytokine gene expression in the tissues of dogs infected by *Leishmania infantum*. **Journal of Comparative Pathology**, v.145, n.4, p.336-344, 2011.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.10, p.1097-1106, 2007.

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C.A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E.M.; SACKS, D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v.420, n.6915, p.502-507, 2002.

BEUTLER, B. Tumor Necrosis Factor (TNF). In: H.L. HENRY; A.W. NORMAN (Eds.) **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p.536-539.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, v.162, n.2, p.108-120, 2001.

BORGES, K.; GEARING, M.; MCDERMOTT, D.L.; SMITH, A.B.; ALMONTE, A.G.; WAINER, B.H.; DINGLEDINE, R. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. **Experimental Neurology**, v.182, n.1, p.21-34, 2003.

BRIONNE, T.C.; TESSEUR, I.; MASLIAH, E.; WYSS-CORAY, T. Loss of TGF- β 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. **Neuron**, v.40, n.6, p.1133-1145, 2003.

CAMPANELLI, A.P.; ROSELINO, A.M.; K. A. CAVASSANI; PEREIRA, M.S.F.; MORTARA, R.A.; BRODSKYN, C.I.; GONÇALVES, H.S.; BELKAID, Y.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; SILVA, J.S. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **The Journal of Infectious Diseases**, v.193, p.1313-1322, 2006.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, n.1-2, p.67-75, 2005.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v.5, p.873-882, 2007.

CHARLIER, C.; CHRETIEN, F.; BAUDRIMONT, M.; MORDELET, E.; LORTHOLARY, O.; DROMER, F. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. **American Journal of Pathology**, v.166, n.2, p.421-432, 2005.

CHOI, J.; KOH, S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. **Yonsei Medical Journal**, v.49, n.1, p.1-18, 2008.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and Diagnostic Aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-369, 2003.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução nº1000 de 11 de maio de 2012**. *Dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais e dá outras providências*. Brasília: Diário Oficial da União, 17 de maio de 2012. Seção 1, p.124-125.

DE VRIES, H.E.; BLOM-ROOSEMALEN, M.C.M.; OOSTEN, M.V.; DE BOER,

A.G.; VAN BERKEL, T.J.C.; BREIMER, D.D.; KUIPER, J. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, v.64, n.1, p.37-43, 1996.

DE VRIES, H.E.; KUIPER, J.; BOER, A.G.D.; BERKEL, T.J.C.V.; BREIMER, D.D. The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. **Pharmacological Reviews**, v.49, n.2, p.143-156, 1997.

DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; DE VRIES, J.E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v.174, n.5, p.1209-1220, 1991.

DEININGER, M.H.; KREMSNER, P.G.; MEYERMANN, R.; SCHLUESENER, H.J. Differential cellular accumulation of transforming growth factor- β 1, - β 2, and - β 3 in brains of patients who died with cerebral malaria. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, n.6, p.2111-2115, 2000.

DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part I - function and composition. **Veterinary Journal**, v.172, p.422-431, 2006.

DING, Y.; FU, S.; ZAMARIN, D.; BROMBERG, J. Interleukin-10. In: H.L. HENRY; A.W. NORMAN (Eds.) **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p.453-462.

DOHGU, S.; YAMAUCHI, A.; TAKATA, F.; NAITO, M.; TSURUO, T.; HIGUCHI, S.; SAWADA, Y.; KATAOKA, Y. Transforming growth factor- β 1 upregulates the tight junction and p-glycoprotein of brain microvascular endothelial cells. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v.24, n.3, p.491-497, 2004.

DOHGU, S.; TAKATA, F.; YAMAUCHI, A.; NAKAGAWA, S.; EGAWA, T.; NAITO, M.; TSURUO, T.; SAWADA, Y.; NIWA, M.; KATAOKA, Y. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier

functions through transforming growth factor- β production. **Brain Research**, v.1038, n.2, p.208-215, 2005.

DORAN, K.S.; ENGELSON, E.J.; KHOSRAVI, A.; MAISEY, H.C.; FEDTKE, I.; EQUILS, O.; MICHELSEN, K.S.; ARDITI, M.; PESCHELA, A.; NIZET, V. Blood-brain barrier invasion by group B *Streptococcus* depends upon proper cell-surface anchoring of lipoteichoic acid. **Journal of Clinical Investigation**, v.115, n.9, p.2499-2507, 2005.

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

FISCHER, H.-G.; NITZGEN, B.; REICHMANN, G.; HADDING, U. Cytokine responses induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglial cells. **European Journal of Immunology**, v.27, n.6, p.1539-1548, 1997.

FUJIWARA, S.; YASUNAGA, S.; IWABUCHI, S.; MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from dogs experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.93, p.9-20, 2003.

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

GANTT, K.R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; GOLDMAN, T.L.; RECKER, T.J.; MILLER, M.A.; WILSON, M.E. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **The Journal of Immunology**, v.170, p.2613-2620, 2003.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, A.G.; BLANCO, A.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during *Leishmania* infections in dogs. Pathological features

at the central nervous system. **Parasite Immunology**, v.18, p.539-546, 1996.

GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.121, n.1-2, p.23-33, 2008.

GRAB, D.J.; PERIDES, G.; DUMLER, J.S.; KIM, K.J.; PARK, J.; KIM, Y.V.; NIKOLSKAIA, O.; CHOI, K.S.; STINS, M.F.; KIM, K.S. *Borrelia burgdorferi*, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. **Infection and Immunity**, v.73, n.2, p.1014-1022, 2005.

HANISCH, U.-K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v.40, n.2, p.140-155, 2002.

HASHIM, F.A.; AHMED, A.E.; EL HASSAN, M.; EL MUBARAK, M.H.; YAGI, H.; IBRAHIM, E.N.; ALI, M.S. Neurologic changes in visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.52, n.2, p.149-154, 1995.

HICKEY, W.F. Leukocyte traffic in the central nervous system: the participants and their roles. **Seminars in Immunology**, v.11, n.2, p.125-137, 1999.

HUANG, S.H.; JONG, A.Y. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. **Cellular Microbiology**, v.3, n.5, p.277-287, 2001.

HUYNH, H.K.; DOROVINI-ZIS, K. Effects of interferon- γ on primary cultures of human brain microvessel endothelial cells. **American Journal of Pathology**, v.142, n.4, p.1265-1278, 1993.

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

nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science**, v.44, p.5-11, 2007.

JAVELAUD, D.; MAUVIEL, A. Mammalian transforming growth factor- β s: Smad signaling and physio-pathological roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, n.7, p.1161-1165, 2004.

JENNINGS, V.M.; ACTOR, J.K.; LAL, A.A.; HUNTER, R.L. Cytokine profile suggesting that murine cerebral malaria is an encephalitis. **Infection and Immunity**, v.65, n.11, p.4883-4887, 1997.

JOHANSSON, P.A.; DZIEGIELEWSKA, K.M.; LIDDELOW, S.A.; SAUNDERS, N.R. The blood-CSF barrier explained: when development is not immaturity. **Bioessays**, v.30, n.3, p.237-248, 2008.

JONES, S.A. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. **The Journal of Immunology**, v.175, n.6, p.3463-3468, 2005.

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

KAMIMURA, D.; HIRANO, T. Interleukin-6. In: H.L. HENRY; A.W. NORMAN (Eds.) **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p.430-439.

KIM, K.S. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186 (supl. 2), p.S220-S224, 2002.

KIM, Y.S.; HONKANIEMI, J.; SHARP, F.R.; TÄUBER, M.G. Expression of proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in the brain during experimental group B streptococcal meningitis. **Molecular Brain Research**, v.128, n.1, p.95-102, 2004.

KIVISÄKK, P.; IMITOLA, J.; RASMUSSEN, S.; ELYAMAN, W.; ZHU, B.;

RANSOHOFF, R.M.; KHOURY, S.J. Localizing central nervous system immune surveillance: Meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Annals of Neurology**, v.65, n.4, p.457-469, 2009.

KOSSODO, S.; MONSO, C.; JUILLARD, P.; VELU, T.; GOLDMAN, M.; GRAU, G.E. Interleukin-10 modulates susceptibility in experimental cerebral malaria. **Immunology**, v.91, n.4, p.536-540, 1997.

KRUTMANN, J.; KIRNBAUER, R.; KOCK, A.; SCHWARZ, T.; SCHOPF, E.; MAY, L.T.; SEHGAL, P.B.; LUGER, T.A. Cross-linking Fc receptors on monocytes triggers IL-6 production. Role in anti-CD3-induced T cell activation. **The Journal of Immunology**, v.145, n.5, p.1337-1342, 1990.

LAYÉ, S.; PARNET, P.; GOUJON, E.; DANTZER, R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. **Molecular Brain Research**, v.27, n.1, p.157-162, 1994.

LIMA, V.M.F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A.C.; CORREA, A.P.F.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research in Animal Science**, v.25, n.4, p.215-218, 2005.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.

LOSSINSKY, A.S.; SHIVERS, R.R. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. **Histology and Histopathology**, v.19, n.2, p.535-564, 2004.

LOTZE, M.T.; KALINSKI, P. Interleukin-12 Family Members. In: H.L. HENRY; A.W. NORMAN (Eds.) **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p.462-470.

LUCAS, S.-M.; ROTHWELL, N.J.; GIBSON, R.M. The role of inflammation in CNS injury and disease. **British Journal of Pharmacology**, v.147, n.S1, p.S232-S240, 2006.

LUKEŠ, J.; MAURICIO, I.L.; SCHÖNIAN, G.; DUJARDIN, J.-C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.-P.; KUHL, K.; TINTAYA, K.W.Q.; JIRKŮ, M.; CHOCHOLOVÁ, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNÍK, M.; HORÁK, A.; AYALA, F.J.; MILES, M.A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.22, p.9375-9380, 2007.

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

MA, X.; SUN, J.; PAPASAVVAS, E.; RIEMANN, H.; ROBERTSON, S.; MARSHALL, J.; BAILER, R.T.; MOORE, A.; DONNELLY, R.P.; TRINCHIERI, G.; MONTANER, L.J. Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. **The Journal of Immunology**, v.164, n.4, p.1722-1729, 2000.

MA, X. TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. **Microbes and Infection**, v.3, n.2, p.121-129, 2001.

MACHADO, G.F.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; MARCONDES, M.; PERRI, S.H.V.; VASCONCELOS, R.O. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.136, n.3-4, p.340-345, 2010.

MAN, S.; UBOGU, E.E.; RANSOHOFF, R.M. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. **Brain Pathology**, v.17, n.2, p.243-250, 2007.

MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.4, p.566-567, 1988.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, P.L.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A.E. *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.142, n.3-4, p.271-280, 2006.

MANTOVANI, A. Interleukin-1 (IL-1). In: H.L. HENRY; A.W. NORMAN (Eds.) **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p.405-412.

MARANGONI, N.R.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; PERRI, S.H.V.; MACHADO, G.F. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.33, n.6, p.330-334, 2011.

MARCONDES, M. **Envolvimento do Sistema Nervoso Central na Leishmaniose Visceral Canina**. 2008, Tese (Livre-docência em Clínica Médica de Cães e Gatos) - Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Araçatuba, 2008.

MARQUES, F.; SOUSA, J.C.; CORREIA-NEVES, M.; OLIVEIRA, P.; SOUSA, N.; PALHA, J.A. The choroid plexus response to peripheral inflammatory stimulus. **Journal of Neuroscience**, v.144, p.424-430, 2007.

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

MCRAE, B.L.; SEMNANI, R.T.; HAYES, M.P.; VAN SEVENTER, G.A. Type I IFNs inhibit human dendritic cell IL-12 production and Th1 cell development. **The Journal of Immunology**, v.160, n.9, p.4298-4304, 1998.

MELO, G.D.; MACHADO, G.F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral leishmaniasis: a histopathological investigation. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.2, n.2, p.69-74, 2009.

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.162, n.3-4, p.248-256, 2009.

MELO, G.D.; MACHADO, G.F. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. **Cell and Tissue Research**, v.346, n.3, p.293-304, 2011.

MENEZES-SOUZA, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GUERRA-SÁ, R.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, G.C.; REIS, A.B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v.177, n.1-2, p.39-49, 2011.

MORENO, P.; LUCENA, R.; GINEL, P.J. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. **Veterinary Record**, v.142, p.81-83, 1998.

MOUSTAKAS, A.; PARDALI, K.; GAAL, A.; HELDIN, C.-H. Mechanisms of TGF- β signaling in regulation of cell growth and differentiation. **Immunology Letters**, v.82, n.1-2, p.85-91, 2002.

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

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

Veterinary Parasitology, v.129, n.3-4, p.219-227, 2005.

PALLADINO, M.A.; BAHJAT, F.R.; THEODORAKIS, E.A.; MOLDAWER, L.L. Anti-TNF- α therapies: the next generation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, n.9, p.736-746, 2003.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A. Guideline for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.236, n.11, p.1184-1191, 2010.

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

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; WALTER, M.R.; SHI, Y.; FISHER, P.B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v.22, n.1, p.929-979, 2004.

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; CALVERT, E.L.; HALL, E.J.; DAY, M.J. Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.103, n.1-2, p.101-111, 2005.

PETITO, C.K.; ADKINS, B. Choroid plexus selectively accumulates T lymphocytes in normal controls and after peripheral immune activation. **Journal of Neuroimmunology**, v.162, p.19-27, 2005.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG, E.J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**,

v.67, p.237-243, 1999.

POPA, C.; NETEA, M.G.; VAN RIEL, P.L.C.M.; VAN DER MEER, J.W.M.; STALENHOF, A.F.H. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research**, v.48, n.4, p.751-762, 2007.

QUAGLIARELLO, V.J.; WISPELWEY, B.; LONG, W.J.; SCHELD, W.M. Recombinant human interleukin-1 induces meningitis and blood-brain barrier injury in the rat. Characterization and comparison with tumor necrosis factor. **The Journal of Clinical Investigation**, v.87, n.4, p.1360-1366, 1991.

QUAN, N.; MHLANGA, J.D.M.; WHITESIDE, M.B.; MCCOY, A.N.; KRISTENSSON, K.; HERKENHAM, M. Chronic overexpression of proinflammatory cytokines and histopathology in the brains of rats infected with *Trypanosoma brucei*. **The Journal of Comparative Neurology**, v.414, n.1, p.114-130, 1999.

QUAN, N.; WHITESIDE, M.; HERKENHAM, M. Time course and localization patterns of interleukin-1 β messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. **Neuroscience**, v.83, n.1, p.281-293, 1998.

RANASINGHE, S.; ROGERS, M.E.; HAMILTON, J.G.C.; BATES, P.A.; MAINGON, R.D.C. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.9, p.875-882, 2008.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.28, n.1-3, p.87-95, 2009.

ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G.N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends in Neurosciences**, v.23, n.12, p.618-625, 2000.

SAMOILOVA, E.B.; HORTON, J.L.; CHEN, Y. Acceleration of experimental autoimmune encephalomyelitis in interleukin-10-deficient mice: roles of interleukin-10 in disease progression and recovery. **Cellular Immunology**, v.188, n.2, p.118-124, 1998.

SANCHEZ, M.A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.70, n.6, p.618-624, 2004.

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.D.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v.150, n.4, p.283-290, 2007.

SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.88, n.1-2, p.21-30, 2002.

SÃO PAULO (ESTADO). SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN) E COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS (CCD) SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. São Paulo: A Secretaria, 2006. 161 p.

SAUNDERS, N.R.; EK, C.J.; HABGOOD, M.D.; DZIEGIELEWSKA, K.M. Barriers in the brain: a renaissance? **Trends in Neurosciences**, v.31, n.6, p.279-286, 2008.

SAWADA, M.; SUZUMURA, A.; HOSOYA, H.; MARUNOUCHI, T.; NAGATSU, T. Interleukin-10 inhibits both production of cytokines and expression of cytokine receptors in microglia. **Journal of Neurochemistry**, v.72, n.4, p.1466-1471, 1999.

SCHLÜTER, D.; KAEFER, N.; HOF, H.; WIESTLER, O.D.; DECKERT-SCHLÜTER, M. Expression pattern and cellular origin of cytokines in the normal and *Toxoplasma gondii*-infected murine brain. **American Journal of Pathology**, v.150, n.3, p.1021-1035, 1997.

SCHULZ, M.; ENGELHARDT, B. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Cerebrospinal Fluid Research**, v.2, n.1, p.8, 2005.

SNYDMAN, D.R.; WALKER, M.; KUBLIN, J.G.; ZUNT, J.R. Parasitic central nervous system infections in immunocompromised hosts: malaria, microsporidiosis, leishmaniasis, and african trypanosomiasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.1, p.115-125, 2006.

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

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v.85, n.2, p.138-147, 2006.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S.; OKANO, F.; JAFFE, C.L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **International Journal for Parasitology**, v.35, n.1, p.63-73, 2005.

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J.F. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v.59, n.7, p.561-574, 2000.

SZABO, S.J.; SULLIVAN, B.M.; STEMMANN, C.; SATOSKAR, A.R.; SLECKMAN, B.P.; GLIMCHER, L.H. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN- γ production in CD4 and CD8 T cells. **Science**, v.295, n.5553, p.338-342, 2002.

TAKATA, F.; DOHGU, S.; MATSUMOTO, J.; TAKAHASHI, H.; MACHIDA, T.; WAKIGAWA, T.; HARADA, E.; MIYAJI, H.; KOGA, M.; NISHIOKU, T.; YAMAUCHI, A.; KATAOKA, Y. Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor-alpha, releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. **Journal of Neuroinflammation**, v.8, n.1, p.106, 2011.

TARLOW, M.J.; JENKINS, R.; COMIS, S.D.; OSBORNE, M.P.; STEPHENSL, S.; STANLEY, P.; CROCKER, J. Ependymal cells of the choroid plexus express tumour necrosis factor- α 1. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v.19, n.4, p.324-328, 1993.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v.35, n.suppl 2, p.W71-W74, 2007.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v.46, n.11, p.1724-1743, 2005.

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

VIÑUELAS, J.; GARCIA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v.101, n.1, p.23-27, 2001.

WATFORD, W.T.; MORIGUCHI, M.; MORINOBU, A.; O'SHEA, J.J. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. **Cytokine & growth factor reviews**, v.14, n.5, p.361-368, 2003.

WOLBURG, H.; PAULUS, W. Choroid plexus: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v.119, p.75-88, 2010.

YONG, V.W.; MOUMDJIAN, R.; YONG, F.P.; RUIJS, T.C.; FREEDMAN, M.S.; CASHMAN, N.; ANTEL, J.P. γ -Interferon promotes proliferation of adult human astrocytes in vitro and reactive gliosis in the adult mouse brain in vivo. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.88, n.16, p.7016-7020, 1991.

YOUNG, H.A.; HARDY, K.J. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.58, n.4, p.373-381, 1995.

YOUNG, H.A.; HODGE, D.L. Interferon- γ . In: H.L. HENRY; A.W. NORMAN (Eds.) **Encyclopedia of Hormones**. New York: Academic Press, 2003. p.391-397.