

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

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PATOGENIA DAS  
LESÕES NO ENCÉFALO DE CÃES NATURALMENTE  
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Tatianna Frate Schwardt**  
Médica Veterinária

Araçatuba – SP  
2011

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

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PATOGENIA DAS  
LESÕES NO ENCÉFALO DE CÃES NATURALMENTE  
ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Tatianna Frate Schwardt**

**Orientadora: Prof. Adjunto Mary Marcondes**

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

Araçatuba – SP  
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S399c      Schwardt, Tatianna Frate.  
              Contribuição ao estudo da patogenia das lesões no  
              encéfalo de cães naturalmente acometidos por leishmaniose  
              visceral / Tatianna Frate Schwardt. – Araçatuba : [s.n.], 2011  
              72 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

              Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,  
              Faculdade de Medicina Veterinária  
              Orientadora: Profa. Dra. Mary Marcondes

              1. TCD3+ 2. TCD4+ 3. TCD8+ 4. Linfócitos 5. Macrófagos  
              6. *Leishmania chagasi*

CDD 636.70896

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**TATIANNA FRATE SCHWARDT** - nascida em 08 de dezembro de 1981 na cidade de São Paulo – SP. Médica Veterinária formada pela Universidade Metodista de São Paulo no ano de 2006. Realizou residência médico veterinária na área de clínica, cirurgia e anestesiologia veterinária, com ênfase em clínica médica de pequenos animais no Hospital Veterinário Luis Quintiliano de Oliveira, na Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Araçatuba com início no ano de 2007 e término em 2009. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração em Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Câmpus de Araçatuba – SP, em março de 2009, sob orientação da Professora Adjunto Mary Marcondes.



*"Se você quiser fazer algo que julgue impossível, comece pelo mais fácil, depois faça o mais difícil. E quando você menos se der conta...  
O impossível estará feito..."*

*São Francisco de Assis*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha orientadora, Mary Marcondes, pelo incentivo, confiança, amizade e apoio durante todas as etapas deste projeto. Por ter deixado inúmeras vezes suas coisas de lado pra me ajudar e principalmente por entender minhas dificuldades na execução desse projeto, sempre me apoiando em todas as minhas decisões. Obrigada pelos conselhos, pelos desabafos e pelos ensinamentos. Muito mais que uma orientadora, você se tornou uma amiga. Vou sentir MUITO sua falta!

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Elisabeth Frate e Lutz Schwardt** que desde o início me apoiaram e me incentivaram na realização deste sonho. Muito obrigada pela confiança, pelo orgulho, pelas orações e pelo amor que sempre estiveram presentes.

Ao meu padrasto, **Edison Gomes Baião**, pela nossa convivência de tantos e tantos anos, por ter acreditado nos meus ideais, por ter me apoiado em tudo nos últimos 20 anos.....para mim, você é como um segundo pai!

Ao meu tio **Sérgio Frate**, pelo apoio, pelo amor, pelo incentivo, pela coragem para superar obstáculos e por ser um verdadeiro exemplo para mim!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus por estar sempre ao meu lado, guiando todos os meus caminhos.

Aos meus pais, Elisabeth Frate e Lutz Schwardt, por todo apoio, dedicação, amor e incentivo durante toda essa jornada de aprendizado. Vocês são o meu exemplo de vida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa (processo 2009/12535-0) para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Márcia Dalastra Laurenti e a auxiliar de laboratório Thaise Tomokane pela ajuda fundamental na conclusão deste projeto e as pós-graduandas Fernanda, Carolina, Mariana, Kelly, Camila e Marina pela excelente convivência durante a minha estadia no LIM-50.

À professora Gisele Machado Fabrino por ter aberto as portas de seu laboratório de imunoistoquímica, por toda a orientação, paciência e dedicação na realização de todas as etapas deste trabalho, desde as necrópsias até as análises imunoistoquímicas.

Ao Professor Wagner Luís Ferreira por todo apoio e amizade que fizeram com que os dois anos de residência fossem inesquecíveis. Você é um exemplo para mim!

Ao meu namorado Victor Hugo Mendonça, pelo amor, cumplicidade, confiança, amizade e por me suportar principalmente na fase inicial do projeto.

À minha “irmã” de coração Juliana Pelloi Vides, por me apoiar incondicionalmente em todas as minhas decisões (mesmo as mais insanas...), por estar do meu lado em todos os momentos, literalmente rindo e chorando comigo em todas as horas. Além, de assumir todos os meus problemas como se fossem seus.....cuidando dos animais que eu “adotava” do CCZ, cuidando dos que eu colocava na sua casa, e assumindo meu projeto quando eu não tinha condições de continuar sozinha. Obrigada pelos conselhos, risadas e pela sua amizade. Não consigo nem mensurar a falta que você vai fazer.

À minha outra irmã Marcella Mendonça por se fazer tão presente mesmo tão distante, pelos conselhos e pela amizade de 25 anos.

À minha amiga Lívia que apareceu do nada na minha vida e em horas viramos melhores amigas de “infância”. Você é especial demais pra mim e eu te admiro muito. Muito obrigada por todos os momentos de apoio, conselhos, cumplicidade, risadas.....Obrigada por tudo! Torço muito por você, sou sua fã....

Ao amigo Acácio, que me ajudou em todas as etapas desse projeto, sempre me aconselhando, me ajudando e estando ao meu lado. Porque com a gente foi “amizade a primeira vista”.

As minhas amigas Evezinha e Miloca por alegrarem meus dias, e por terem virado minhas melhores amigas em tão pouco tempo. Obrigada pelas nossas conversas, pelos desabafos, pelos ótimos momentos. Vou sentir muito a falta de vocês. Eve, nunca vou me esquecer do seu apoio no início desse projeto quando eu quase abandonei tudo.... Amo vocês!

Aos meus amigos Caio e João por serem meus confidentes, por ouvirem meus desabafos e aguentarem meu mau-humor! João, muito obrigada por ter aguentado meu péssimo humor principalmente nas visitas intermináveis ao CCZ, nas coletas e nas necrópsias e Caio, muito obrigada por todos os conselhos e por toda ajuda nessa fase final do projeto, pela paciência de horas a fio separando lâminas e blocos de sistema nervoso.

Aos meus fiés amigos, Gabriel (por tantas vezes ter se oferecido pra ajudar nas necrópsias), Ferdinando (meu eterno R1!!), Tai, Sil, Ludi e o pessoal da anestesia que eu amo: Carol e Jô (minhas amigas queridas da residência!), Vé e Jú.

As minhas amigas Mari, Ritinha, Rita Maria, Vi, Nayara, Carol, Naty, Pri, Mai, Gabi e Drica pela enorme amizade, por entenderem minha ausência e sempre darem um jeitinho de me encontrar em São Paulo, independente do dia e do horário doido que eu chego, pelos anos e anos de amizade.....Amo cada uma de vocês!

Ao amigo Guilherme, por toda a ajuda no laboratório de imunistoquímica, pela paciência e pelas inúmeras explicações. Sua ajuda foi fundamental na elaboração deste projeto.

Ao meu mais novo amigo Guto, que eu ganhei de presente do laboratório de imunistoquímica... Obrigada pelos desabafos, pelas risadas, pelas confidências. Adoro você!

A professora Valéria Oliva, por ter me ajudado sendo minha conselheira por diversas vezes, durante a residência e em algumas fases do mestrado. Muito obrigada!

À Professora Maria Cecília Rui Luvizotto por toda orientação no processamento do material para o exame histopatológico, sempre com muita dedicação, e também por todos os conselhos pessoais.

As profesores Wagner Luís Ferreira e Daniela Bernadete Rozza por, no momento da minha qualificação, serem atenciosas e contribuírem para a melhoria do projeto.

À professora Sílvia Helena Venturolli Perri, pela colaboração na realização da análise estatística.

Aos funcionários da Biblioteca do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, pelo auxílio.

Aos meus queridos e mais que amados filhos, “Nicolas Cage”, “Charge”, “Catitinha”, “Thomas” e “Muriel”, por alegrarem a minha vida.....

E por último e mais importante, a todos os cães que participaram do projeto.

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Animais.....	27
3.2 Exame citológico de linfonodo e medula.....	28
3.3 Colheita de sangue total.....	28
3.4 Pesquisa de anticorpos anti- <i>Neopora caninum</i> e <i>Toxoplasma gondii</i> .....	28
3.5 Reação de imunoistoquímica.....	29
3.6 Análise estatística.....	30
<b>4.RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 Reação de imunoistoquímica para <i>Leishmania</i> sp.....	33
4.2 Reação de imunoistoquímica para linfócitos CD3+.....	34
4.3 Reação de imunoistoquímica para linfócitos CD4+.....	35
4.4 Reação de imunoistoquímica para linfócitos CD8+.....	36
4.5 Reação de imunoistoquímica para macrófagos.....	37
<b>5.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>6.CONCLUSÕES.....</b>	<b>45</b>
<b>7.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 - Fotomicrografia de corte histológico de córtex frontal de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Imunoistoquímica para pesquisa linfócitos CD3+, obj. 40x (A) e 100x (B). Observar marcação positiva para anticorpo anti-CD3. Araçatuba-SP, 2011 ..... 35

FIGURA 2 - Fotomicrografia de corte histológico de córtex frontal de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Imunoistoquímica para pesquisa linfócitos CD4+, obj. 40x. Observar marcação positiva para anticorpo anti-CD4. Araçatuba-SP, 2011..... 36

FIGURA 3 - Fotomicrografia de corte histológico de mesencéfalo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Imunoistoquímica para pesquisa linfócitos CD8+, obj. 40x. Observar marcação positiva para anticorpo anti-CD8 na ponta da seta. Araçatuba-SP, 2011..... 37

FIGURA 4 - Fotomicrografia de corte histológico de lobo piriforme de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Imunoistoquímica para pesquisa macrófagos Observar marcação antigênica na ponta da seta. obj. 40x. Araçatuba-SP, 2011..... 38

**LISTA DE TABELAS**

Página

<b>TABELA 1</b> - Mediana (Md), valor mínimo (Min) e máximo (Max) da soma dos escores utilizados para determinar a imunomarcção para linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos (MO) no tecido nervoso de 41 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, sem (controle) e com (neurológico) presença de sintomas neurológicos. Araçatuba-SP, 2011.....	38
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE QUADROS

Página

**QUADRO 1** - Idade, título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (RIFI Toxo) e anti-*Neospora caninum* (RIFI Neo) e alterações clínicas observados em 31 cães sem raça definida, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, sem a presença de sintomas neurológicos (grupo controle)..... 32

**QUADRO 2** - Idade, título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (RIFI Toxo) e anti-*Neospora caninum* (RIFI Neo) e alterações clínicas observados em 10 cães sem raça definida, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com sintomas neurológicos (grupo neurológico)..... 33

## CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA PATOGENIA DAS LESÕES DO ENCÉFALO DE CÃES NATURALMENTE ACOMETIDOS POR LEISHMANIOSE VISCERAL.

**Resumo** - A Leishmaniose visceral em cães é descrita como uma doença de caráter crônico na qual os principais sintomas são perda progressiva de peso, caquexia, lesões dermatológicas, e recentemente, a doença tem sido relacionada com quadros neurológicos. Um total de 41 cães portadores de leishmaniose visceral, foram divididos em dois grupos. O primeiro composto por cães sem sintomas neurológicos (n=31) e o segundo grupo composto por cães com sintomas neurológicos (n=10). Amostras de encéfalo foram coletadas e armazenadas em formalina tamponada, para realização de imunoistoquímica para a pesquisa de formas amastigotas da *Leishmania* sp., linfócitos T CD3+, CD4+ e CD8+ e macrófagos. Não foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* sp. Linfócitos T CD3+ estavam presentes em 24/31 (77,4%) dos cães sem sintomas neurológicos e em todos os cães do segundo grupo (p=0,0011). Linfócitos T CD4+ e CD8+ raramente foram observados, apresentando imunomarcagem para CD4+ em 10/41 (24,3%) dos cães e em metade dos animais do grupo neurológico (p=0,0090). A presença de CD8+ foi detectada em 4/10 (40%) dos cães com doenças neurológicas (p=0,0021). Macrófagos foram observados em 38/41 (92,6%) cães, sem diferença estatística significativa entre os dois grupos (p= 0,7664).

**Palavras-chave:** TCD3+, TCD4+, TCD8+, linfócitos, macrófagos, *Leishmania chagasi*

## CONTRIBUTION TO THE PATHOGENESIS OF THE BRAIN LESIONS IN DOGS NATURALLY AFFECTED WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

**SUMMARY** - Visceral leishmaniasis in dogs is described as a chronic disease whose main symptoms are progressive weight loss, dermatologic lesions and, recently, the disease has been associated to neurologic disorders in dogs. A total of 41 *Leishmania chagasi* infected dogs were divided into two groups. The first composed of dogs without neurological signs (n=31) and the second by dogs with neurological disorders (n=10). Brain samples were collected, stored in 10% buffered formalin and subjected to immunohistochemical examination for amastigotes forms of *Leishmania* sp, CD3+, CD4+ and CD8+ T lymphocytes and macrophages. Immunohistochemistry not revealed amastigote any forms of *Leishmania* sp. CD3+ T lymphocytes were present in 24/31 (77,4%) dogs without neurological signs and in all dogs from the second group (p=0.0011). CD4+ and CD8+ were rarely observed, with CD4+ immunostaining in 10/41 (24,3%) dogs, from which half of them had neurological disease (p=0.0090). The presence of CD8+ was detected only in 4/10 (40%) dogs from neurological group (p=0.0021). Macrophages were detected in 38/40 (92,6%) dogs, without significant differences between groups (p=0.7664).

**Keywords:** TCD3+, TCD4+, TCD8+, lymphocytes, macrophages, *Leishmania chagasi*

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma antropozoonose causada por um protozoário do gênero *Leishmania*, sendo a *Leishmania infantum chagasi* o agente etiológico da doença nas Américas. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a doença afeta cerca de 2 milhões de pessoas por ano. Nas Américas a leishmaniose visceral americana, ou calazar neotropical, acomete indivíduos desde o México até a Argentina, com cerca de 90% dos casos humanos procedentes do Brasil. Dos 27 estados brasileiros, 23 já apresentam casos da doença.

Até o presente momento, de todos os animais identificados como reservatórios da doença o cão é considerado o mais importante, constituindo-se no principal elo na cadeia de transmissão da leishmaniose visceral. No cão a leishmaniose visceral causa freqüentemente uma doença sistêmica crônica, clinicamente caracterizada por febre, anemia, perda progressiva de peso, lesões dermatológicas, problemas renais, distúrbios locomotores, diáteses hemorrágicas e alterações oftálmicas.

Entre os poucos relatos de alterações neurológicas descritas em cães com leishmaniose visceral cita-se, a ocorrência de tremores, convulsões, inclinação de cabeça e andar em círculos, porém pouco se sabe sobre a fisiopatogenia da doença no sistema nervoso central.

Para tentar elucidar a patogenia da doença no sistema nervoso central propusemos neste estudo pesquisar a presença de *Leishmania* sp., macrófagos e de algumas classes de linfócitos T no encéfalo de cães com leishmaniose visceral, na tentativa de determinar se os sintomas neurológicos são decorrentes da presença do parasita ou de uma resposta inflamatória no tecido nervoso.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

A leishmaniose visceral é uma enfermidade causada por um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae (DOFLEIN, 1901) e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). Tem como agente etiológico leishmanias do complexo donovani, que compreendem a *Leishmania donovani*, na Ásia e África; a *Leishmania infantum* na Ásia, Europa e África e a *Leishmania chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937) nas Américas.

As leishmanias são protozoários pleomórficos, com formas flageladas, que se desenvolvem no tubo digestório de um inseto vetor, e formas aflageladas ou amastigotas, que vivem e se multiplicam no interior de células do sistema mononuclear fagocitário de hospedeiros vertebrados, tais como os seres humanos e os cães (SLAPPENDEL; FERRER, 1998). Os cães possuem grande importância epidemiológica no ambiente doméstico. Enquanto a prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas pode ser superior a 50%, a prevalência da doença varia entre três e 10% (FERRER, 2002).

Os vetores implicados na transmissão das leishmanioses são flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (BANETH, 2006). A principal espécie transmissora nas Américas é a *Lutzomyia longipalpis*, conhecida popularmente no Brasil como mosquito palha, birigüi ou tatuquira (REY, 2001); no entanto foram identificadas outras espécies que agem como vetores tais como a *Lutzomyia cruzi* encontrada no Mato Grosso do Sul (SANTOS et al., 1998).

O principal mecanismo de transmissão da doença ocorre quando as fêmeas de *Lutzomyia longipalpis*, infectadas com formas promastigotas, alimentam-se em hospedeiros susceptíveis. Durante o repasto sanguíneo estas formas são inoculadas juntamente com a saliva do inseto, promovendo uma resposta inflamatória local e levando a sua fagocitose por células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente os macrófagos. No interior dos macrófagos as formas promastigotas perdem o flagelo diferenciando-se em amastigotas, que se multiplicam por sucessivas divisões binárias. As células densamente parasitadas rompem-se liberando estas formas, que serão fagocitadas por novos macrófagos. Ocorre, então, a disseminação hematogena

e linfática para tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados (FERRER, 2002; MICHALICK ; GENARO, 2007).

O diagnóstico clínico da leishmaniose visceral é difícil de ser realizado, uma vez que as manifestações clínicas da doença envolvem o comprometimento de praticamente todos os sistemas do organismo, mimetizando uma gama de enfermidades que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial. Deste modo, a confirmação da doença deve ser feita por meio de exames laboratoriais tais como pesquisa de anticorpos séricos, exame parasitológico direto em esfregaços de órgãos linfóides ou por imunistoquímica e reação em cadeia de polimerase (PCR). A técnica de imunistoquímica, além de ser um importante instrumento de diagnóstico em pacientes com baixa carga parasitária, pode ser utilizada para melhor estudar a patogenia da doença nos vários tecidos acometidos (BEENA et al., 2003; TAFURI et al., 2004).

Em camundongos inoculados com *Leishmania sp.*, demonstrou-se que os macrófagos infectados por parasitos atuam como células apresentadoras de antígenos aos linfócitos T do tipo CD4+. Estes linfócitos são estimulados a produzir interleucinas e, dependendo do perfil estimulado, ocorre proliferação de duas sub-populações de linfócitos T auxiliares, Ta1 ou Ta2. Além de agirem como células apresentadoras de antígenos no início da resposta imune, os macrófagos afetam o curso da infecção secretando interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), que aumentam a eficiência das células fagocíticas e de linfócitos citotóxicos (BARBIÉRI, 2006; MICHALICK ; GENARO, 2007).

A IL-12, liberada no início do processo inflamatório, desempenha um papel crucial no controle da doença, já que influencia a resposta imune inata e a subsequente ativação de células T auxiliares CD4+ do tipo 1 (Ta1). Quando ativadas, as células Ta1 produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 2 (IL-2) e o interferon gama (IFN- $\gamma$ ), um potente indutor da formação de superóxido e óxido nítrico pelos macrófagos. Esses radicais livres são tóxicos para os parasitos, podendo levar

ao controle do parasitismo com eliminação da infecção (BARBIÉRI, 2006; MICHALICK; GENARO, 2007).

Os macrófagos da derme são as células hospedeiras mais parasitadas sendo também as células efectoras mais importantes na produção de óxido nítrico. Por sua vez, as células epidérmicas de Langerhans são essenciais na indução da resposta imune específica, por serem responsáveis pelo transporte de parasitos aos linfonodos regionais, local onde esta resposta se inicia. No tocante aos outros tipos celulares que participam da resposta inicial, devem-se considerar os leucócitos polimorfonucleares (PMN), que são importantes na fagocitose dos parasitos, os quais, com o auxílio de imunoglobulinas e do sistema complemento, possuem ação leishmanicida (LAURENTI et al., 1996).

A ativação de linfócitos Ta2 leva à produção de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 10 (IL-10), com subseqüente proliferação de linfócitos B e produção de anticorpos. A produção de anticorpos, principalmente IgG, é muito elevada, no entanto não é capaz de controlar a infecção (BARBIÉRI, 2006; MICHALICK ; GENARO, 2007). Desta forma, a resposta Ta1 está associada à capacidade do hospedeiro em controlar a infecção, e a resposta Ta2 mais correlacionada com a progressão da doença. A indução preferencial de linfócitos Ta1 ou Ta2 depende de alguns fatores, como a dose infectante, o mecanismo de apresentação do antígeno, a via de inoculação e o padrão genético do hospedeiro (BARBIÉRI, 2006; CIARAMELLA; CORONA, 2003; FERRER, 2002; GENARO, 2007 ).

O quadro clínico em cães é semelhante ao de humanos, exceto pelo desenvolvimento de lesões de pele e, neste sentido, a espécie canina assume singular papel como modelo experimental da doença (KONTOS; KOUTINAS, 1993). Os cães podem apresentar sintomas inespecíficos, tais como febre irregular por longos períodos, anemia, linfadenopatia, hepato e esplenomegalia e perda progressiva de peso evoluindo para caquexia (BANETH, 2006; GENARO, 1993). As lesões cutâneas são frequentes e apresentam padrões variados, que compreendem uma excessiva descamação

da epiderme, áreas de alopecia, ulcerações e onicogribose (FEITOSA et al., 2000; SCOTT et al., 2001).

A principal causa da morte de cães com a doença é a insuficiência renal, decorrente de quadros de glomerulonefrite e de nefrite intersticial. Alguns cães apresentam alterações digestórias devido à presença de ulcerações de mucosa gástrica e intestinal. Pode-se verificar também diáteses hemorrágicas, tais como epistaxe, e alterações oftálmicas como ceratoconjuntivite e uveíte. Muitos cães desenvolvem problemas locomotores com manifestações clínicas decorrentes de poliartrite, polimiosite e até osteomielite (NOLI, 1999; FEITOSA et al., 2000; BANETH, 2006).

Apesar de pouco freqüentes, existem relatos de alterações neurológicas em cães com leishmaniose visceral, com ou sem a participação de outros agentes etiológicos oportunistas. Dentre eles citam-se convulsões generalizadas, mioclonias, vocalização, anisocoria, midríase bilateral, nistagmo, paralisia de nervos cranianos, inclinação da cabeça, andar em círculos, ataxia, tremor de intenção, tetraparesia e tetraplegia (MARCONDES, 2007). Apesar desses relatos, a patogenia da doença no sistema nervoso não está totalmente esclarecida.

Em condições normais o sistema nervoso central (SNC) é considerado um lugar imunologicamente privilegiado, devido a presença da barreira hematoencefálica. A função da barreira é limitar a passagem de leucócitos e macromoléculas para dentro do sistema nervoso, protegendo-o, desta forma, contra patógenos e células encontradas na circulação periférica (GALEA et al., 2007; ABBOT et al., 2010). A barreira hematoencefálica é composta por células endoteliais cujas junções intercelulares, denominadas “tigh junctions”, são responsáveis por limitar a passagem de macromoléculas para o interior do sistema nervoso central (BALLABH et al., 2004). No entanto, em condições inflamatórias a presença de citocinas pode aumentar a permeabilidade da barreira e, desta forma, facilitar a entrada de patógenos e de leucócitos (BALLABH et al., 2004).

Abreu-Silva et al. em 2003 concluíram que *Leishmania amazonense* pode atravessar a barreira hematoencefálica ao encontrarem alterações

histopatológicas do sistema nervoso central de camundongos experimentalmente inoculados com *Leishmania amazonensis*, agente etiológico da leishmaniose tegumentar. Os animais apresentavam um infiltrado inflamatório nas meninges, composto por células mononucleares e neutrófilos, sem evidências da presença de formas amastigotas do parasita. Todavia, observaram-se macrófagos parasitados, mastócitos, linfócitos e polimorfonucleares no interior do parênquima cerebral.

Um dos poucos relatos de alterações neurológicas centrais em seres humanos data de 1996, quando Prasad e Sen descreveram um caso de meningite crônica em um menino de 10 anos, portador de leishmaniose visceral. Os sintomas neurológicos se iniciaram um ano após o diagnóstico da doença e foram tratados sem sucesso, com ocorrência de várias recidivas, durante um ano e oito meses. Muito embora várias amostras de liquor tenham sido colhidas no decurso da enfermidade, nenhuma delas evidenciou a presença de formas amastigotas. Somente após uma esplenectomia é que foram observadas leishmanias no liquor.

Alguns estudos realizados em cães demonstram a ocorrência de lesões no sistema nervoso central de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, mesmo na ausência de sintomas neurológicos. As alterações mais comumente observadas foram coroidite, degeneração waleriana das células de Purkinge, satelitose, degeneração neuronal, neuronofagia, leptomeningite com intenso infiltrado inflamatório e gliose (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NIETO et al., 1996; IKEDA et al., 2007). Apesar da ausência de sintomas neurológicos, os animais apresentavam lesões inflamatórias e degenerativas do sistema nervoso central, sugerindo o comprometimento lento e progressivo do SNC dos animais infectados (IKEDA et al., 2007).

Apesar de Nieto et al. (1996) e Viñuelas et al. (2001) terem identificado formas amastigotas de *Leishmania* sp em células ependimárias, linfócitos e macrófagos do plexo coróide e das meninges de cães acometidos pela doença, Ikeda et al. (2007), Marcondes (2008) e Melo et al. (2009b) não encontraram evidências do parasito no sistema nervoso central. Os primeiros autores,

porém, verificaram intensa marcação antigênica no interior de vasos sanguíneos.

Uma evidência de ruptura da barreira hematoencefálica em cães com leishmaniose visceral é a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp no liquor desses animais. Garcia-Alonso et al. (1996), Lima et al. (2003), Feitosa et al. (2005) e Melo et al. (2009b) identificaram a presença de IgG líquórica em cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, mesmo na ausência de sintomas neurológicos. De acordo com os primeiros autores, a origem das imunoglobulinas presentes no liquor não está clara; entretanto, elas podem ser provenientes de uma lesão da barreira hematoencefálica, uma vez que foram encontrados extensos depósitos de antígenos de *Leishmania* sp e de imunoglobulinas nos espaços intersticiais e intravasculares do plexo coróide desses cães. Outra possibilidade é que a transferência de antígenos de leishmania para o sistema nervoso central tenha levado a uma produção intratecal de anticorpos, como ocorre nos casos de malária.

Apesar de ausência de formas amastigotas no liquor e no tecido nervoso da grande maioria de cães acometidos por leishmaniose visceral, Gonçalves et al. (2004) identificaram o DNA do parasito no liquido cefalorraquidiano de cães naturalmente acometidos pela doença, sugerindo que há passagem de parasitos ou fragmentos destes pela barreira hematoencefálica.

Se animais com leishmaniose visceral possuem alterações histopatológicas no sistema nervoso central e nem sempre se identificam formas amastigotas do parasito no interior do tecido, deve haver a participação do sistema imune no desenvolvimento das lesões neurológicas (MARCONDES, 2008). Uma das ferramentas para a avaliação da resposta imune nos diversos tecidos é a identificação de linfócitos e de imunoglobulinas. Os linfócitos expressam um grande número de moléculas, ou marcadores, em sua superfície, que podem ser utilizados para distinguir várias populações celulares. O sistema CD (cluster of differentiation), cujo termo significa grupo de diferenciação, é uma nomenclatura que se refere a grupos de anticorpos que se ligam especificamente a um determinado marcador na célula. Assim,

permitem a identificação de vários tipos de linfócitos (ROITT, 2004; TIZARD, 2004).

Os linfócitos T possuem um receptor antigênico de superfície chamado TCR. Este receptor é composto por seis glicoproteínas, duas das quais se ligam ao antígeno. As outras quatro amplificam o sinal gerado pela ligação antigênica e o transmitem para a célula. Existem dois diferentes tipos de receptores TCR; um formado por duas cadeias de proteínas denominadas  $\gamma$  e  $\delta$ , e outro pelas cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . Em seres humanos, nos ratos e provavelmente na maioria dos animais não ruminantes, entre 90 e 99% dos linfócitos T possuem receptores  $\alpha/\beta$ . As cadeias  $\alpha/\beta$  estão associadas, por sua vez, a outras proteínas denominadas complexo CD3. Linfócitos CD3  $\alpha/\beta$  podem ser subdivididos em duas populações distintas não sobrepostas: uma que apresenta o marcador CD4 composta por linfócitos auxiliares, e outra que possui o receptor CD8 e que é predominantemente citotóxica (ROITT, 2003; TIZARD, 2004).

A relação entre células CD4+ e CD8+ na circulação pode ser usada para estimar a função linfocitária. Uma elevação na quantidade de CD4+ implica em reatividade linfocitária elevada devido ao predomínio das células auxiliares. Por outro lado, uma elevação das células CD8+ evidencia reatividade linfocitária deprimida. A molécula CD4+ não está restrita apenas aos linfócitos T auxiliares, mas em algumas espécies animais também pode ser encontrada em monócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (TIZARD, 2004).

Marcondes (2008), avaliando por meio de imunoistoquímica o sistema nervoso central de 39 cães com leishmaniose visceral, dos quais 21 possuíam sintomas neurológicos, observou marcação antigênica para linfócitos CD3+ e macrófagos principalmente em região perivascular e no plexo coróide do ventrículo lateral, variando em intensidade de acordo com o fragmento de tecido analisado. A autora observou uma diferença estatisticamente significativa entre as imunomarcações de cães assintomáticos e daqueles com quadro neurológico, sugerindo que os sintomas neurológicos associados à leishmaniose visceral, numa fase mais avançada da doença, são decorrentes

de uma reação do sistema imune e não da presença do parasito no tecido nervoso.

Resultados semelhantes foram observados por Melo et al. (2009b), que verificaram que os linfócitos T CD3+ eram o principal componente do infiltrado inflamatório do plexo coróide e do parênquima cerebral de cães portadores de leishmaniose visceral. Segundo os autores, a entrada de leucócitos no encéfalo sugere a participação dessas células na patogênese dos distúrbios neurológicos durante estágios avançados da doença, e confirmam que o plexo coróide tem importante participação no influxo de células T para dentro do SNC.

Apesar de terem sido observados no sistema nervoso central de cães com leishmaniose visceral, não está claro ainda como os linfócitos T penetram neste tecido. Um fator que poderia facilitar sua entrada é a presença de metaloproteinases (MMP), enzimas também conhecidas como gelatinases, que atuam na remodelação da matriz extracelular e estão envolvidas em várias afecções do sistema nervoso. Elas possuem capacidade de degradação da barreira hematoencefálica e participam nos processos inflamatórios, favorecendo a migração leucocitária (MACHADO et al., 2010; MELO et al., 2011).

Com o objetivo de avaliar se existe participação da MMP-2 e MMP-9 na patogênese das alterações neurológicas de cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, Machado et al. (2010) avaliaram fragmentos de sistema nervoso central de três grupos de cães; oligosintomáticos, sintomáticos sem alterações neurológicas e sintomáticos com sintomas neurológicos. Os resultados permitiram concluir que o tecido nervoso de cães com LV não possui metaloproteinases ativas, apesar de que os elevados níveis das proMMP-2 e 9 (pró-enzimas), indicam um estado pró-inflamatório do mesmo.

Partindo-se da hipótese de que o quadro neurológico em cães acometidos pela leishmaniose visceral seja decorrente de uma reação do sistema imune, e não ocasionado por ação direta do parasito, o presente ensaio teve como objetivos pesquisar a presença de *Leishmania* sp., linfócitos

T CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos em tecido de sistema nervoso central, na tentativa de compreender melhor a patogênese da doença.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Foram utilizados 41 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, provenientes do município de Araçatuba, São Paulo, área endêmica para leishmaniose visceral. Os cães foram subdivididos em dois grupos, de acordo com a presença ou não de sintomas neurológicos. Todos os animais selecionados para o estudo foram submetidos a exame físico e em seguida a um exame neurológico completo que incluía avaliação de nervos cranianos, reflexos espinhais e reações posturais. Realizou-se também sorologia para toxoplasmose e neosporose em cada cão.

Os animais foram selecionados após diagnóstico parasitológico da doença, baseado no achado de formas amastigotas do parasito em esfregaços obtidos por punção biópsia aspirativa de órgãos linfóides (medula óssea e linfonodos poplíteos). Depois da colheita de sangue total os cães recebiam uma pré anestesia com acepromazina<sup>1</sup>, seguida de uma indução e manutenção anestésica com pentobarbital sódico<sup>2</sup>. Após este procedimento, com os cães ainda em plano anestésico, aplicava-se uma ampola de cloreto de potássio<sup>3</sup> por via intravenosa, em cumprimento ao Decreto no. 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devem ser submetidos à eutanásia. Em seguida os animais eram necropsiados e colhia-se o encéfalo para obtenção de amostras de tecido nervoso para serem avaliadas por meio de reações de imunistoquímica.

---

<sup>1</sup> Acepran 0,2% - Univet AS Indústria Veterinária – São Paulo, SP

<sup>2</sup> Hypnol 3% - Fontelever – Itapira, SP

<sup>3</sup> Cloreto de potássio a 19, 1% - Darrow – Rio de Janeiro, RJ

### **3.2 Exame citológico de linfonodo e medula óssea**

O exame citológico de medula óssea e linfonodo poplíteo foi realizado por meio de punção biópsia aspirativa. As punções de linfonodo poplíteo eram realizadas com agulha 25 x 8 mm acoplada a seringa de 10 ml, e as punções de medula óssea eram realizadas com agulha 40 x 16 mm, acoplada a seringa de 20 ml, inserida na região da crista ilíaca. Do material obtido da punção eram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro e, em seguida, as lâminas eram coradas com corante hematológico de rotina<sup>1</sup> e observadas em microscópio com objetiva de 100x para pesquisa dos parasitos.

### **3.3 Colheita de sangue total**

A colheita de sangue total foi realizada por meio de punção da veia jugular com auxílio de agulhas 30 x 8 acopladas a seringas de 20 ml. O sangue total foi centrifugado a 3.000 rpm., durante 5 minutos, para total separação do soro. O volume recuperado de soro foi dividido em tubos do tipo “ependorf” e congelados a -20° C, até o momento do processamento para pesquisa de anticorpos séricos anti-*Neospora caninum* e anti-*Toxoplasma gondii*.

### **3.4 Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii***

As reações de imunofluorescência indireta, utilizadas para a detecção de anticorpos anti-*N. caninum* e anti-*T. gondii* foram realizadas de acordo com Dubey et al. (1988) e Camargo (1974), respectivamente, estabelecendo-se como ponto de corte 1:50 para neosporose e 1:16 para toxoplasmose.

---

<sup>1</sup> Panótico Rápido - Laborclin – Curitiba, PR

### 3.5 Reação de Imunoistoquímica

Todos os cães foram necropsiados pela técnica empregada rotineiramente no Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Campus de Araçatuba, realizando-se o exame externo do cadáver, evisceração e exame detalhado das alterações macroscópicas presentes nos órgãos. O encéfalo foi colhido como um todo e separado por um corte na fissura longitudinal do cérebro.

Os hemisférios cerebrais foram fixados em formalina a 10% tamponada com fosfatos pH 7,2 e, após um período de aproximadamente 24 horas colheu-se um fragmento do córtex frontal, lobo piriforme, plexo coróide do ventrículo lateral, mesencéfalo e cerebelo para inclusão em parafina. Os cortes foram confeccionados em lâminas silanizadas para análise imunoistoquímica e pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp, linfócitos T CD3+, CD4+, CD8+, e macrófagos. Para a realização das reações de imunoistoquímica os cortes foram desparafinizados e hidratados, e a recuperação antigênica foi realizada com tratamento dos cortes em tampão EDTA para linfócitos CD8+ e tampão citrato para os demais antígenos. A detecção de linfócitos CD4+ e CD8+ foi realizada utilizando-se o kit CSA<sup>1</sup> e os procedimentos foram seguidos de acordo com as indicações do kit. Para detecção de linfócitos T CD4+ e CD8+, utilizou-se o anticorpo monoclonal de camundongo<sup>2,3</sup>. Para a detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp, linfócitos CD3+ e macrófagos os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio a 2% (10 volumes) para bloqueio da peroxidase endógena, seguido da incubação com leite desnatado 6% em PBS 0,05% para bloqueio de ligações inespecíficas. Para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp utilizou-se um anticorpo primário anti-*Leishmania chagasi*, produzido em camundongo pelo Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, adsorvido com pó de sistema nervoso central de cão normal.

---

<sup>1</sup> CSA - Amplification Catalised System – K150011-Dako North America, INC- Via Real, CA

<sup>2</sup> NCL-L-CD4-1F6 – Novocastra Laboratories LTD, New Castle, UK

<sup>3</sup> NCL-CD8-295 - Novocastra Laboratories LTD, New Castle, UK

Para detecção de linfócitos T CD3<sup>+</sup>, utilizou-se o anticorpo policlonal de coelho anti-CD3 humano<sup>1</sup>, para a detecção de macrófagos, utilizou-se o anticorpo de rato anti-macrófago humano<sup>2</sup>. As lâminas foram então incubadas por 18 horas em câmara úmida. Após lavagem com solução tampão PBS e Tween 20 a 0,05%, foram submetidas a nova incubação com anticorpo secundário biotilado<sup>3</sup> novamente, submetidos à lavagem com tampão PBS, e posteriormente incubadas com streptavidina-peroxidase<sup>4</sup> a 37°C, por mais 45 minutos. A reação final foi revelada com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na presença de 3,3'-diaminobenzidina<sup>5</sup>. A contra-coloração do tecido foi feita com hematoxilina de Harris. Após a desidratação dos cortes, as lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando-se resina, e foram observadas em microscopia óptica comum para avaliar a presença e a localização de formas amastigotas de *Leishmania* sp e anticorpos. Como controle positivo das reações foram utilizados cortes histológicos de tonsila palatina humana, linfonodo canino e pele canina. As imunomarcações foram analisadas de forma semi-quantitativa e classificadas comparativamente de acordo com a sua intensidade. A classificação foi definida em cruces da seguinte forma: (-) ausente; (+) raras; (++) leve; (+++) moderada; (++++) intensa. Para a realização da análise estatística, as cruces foram substituídas por números de zero a quatro, e utilizou-se a somatória dos escores das cinco regiões encefálicas. Dessa forma, um cão com marcação ausente nas cinco regiões receberia um escore de zero, enquanto um cão com marcação intensa nas cinco regiões receberia um escore de 20.

### 3.6. Análise Estatística

Para a comparação dos grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando-se o programa SAS – Statistical Analysis System (1999). As análises foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

---

<sup>1</sup> A0452- Dako North America, Inc- Via Real, CA

<sup>2</sup> MCA874G- AbD Serotec – Morphosys Co- Munich, Germany

<sup>3</sup> K0690 - Dako North America, Inc. – Via Real, CA

<sup>4</sup> Kit LSAB - Dako North America, Inc. – Via Real, CA

<sup>5</sup> DAB - Sigma Aldrich – St. Louis, MO

#### 4. RESULTADOS

Quarenta e um cães sem raça definida, sendo 25 machos e 16 fêmeas, com idade variando de um a oito anos, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, foram incluídos no presente estudo. Nove (21,9%) eram assintomáticos e trinta e um (75,6%) apresentavam algum sintoma da doença. As alterações clínicas mais frequentemente observadas foram emagrecimento, caquexia, lesões cutâneas, hepato e esplenomegalia, linfadenomegalia, palidez de mucosas e alterações oftálmicas. Como o objetivo do estudo foi pesquisar imunomarcações no sistema nervoso central destes cães, com o intuito de melhor compreender a fisiopatogenia da doença, os animais foram subdivididos de acordo com a presença ou não de sintomas neurológicos, de modo que foram compostos dois grupos, o primeiro constituído por 31 cães sem envolvimento neurológico (Grupo controle) e o segundo constituído por 10 animais com sintomas neurológicos (Grupo neurológico). Dentre as alterações neurológicas observou-se convulsões generalizadas em três cães, lesão de nervos cranianos em dois, locomoção atáxica de membros pélvicos em quatro e, tetraparesia e andar em círculos em um animal cada. Os quadros 1 e 2 apresentam a resenha e as alterações clínicas observadas em cada animal dos grupos controle e neurológico, respectivamente, bem como os títulos de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e anti-*Neospora caninum*.

**Quadro 1** - Idade, título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (RIFI Toxo) e anti-*Neospora caninum* (RIFI Neo) e alterações clínicas observados em 31 cães sem raça definida, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, sem a presença de sintomas neurológicos (grupo controle).

Cão	Idade (anos)	RIFI Toxo	RIFI Neo	Sintomas
C1	2	1:16	1:50	Assintomático
C2	1	neg.	neg.	hepatomegalia, lesões cutâneas
C3	1	neg.	1:50	Assintomático
C4	2	neg.	neg.	Assintomático
C5	10	neg.	1:50	aumento de linfonodos pré-escapulares, secreção nasal purulenta
C6	3	1:16	neg.	Esplenomegalia
C7	6	1:16	1:6400	onicogribose, lesões cutâneas
C8	2	neg.	1:200	aumento de linfonodos poplíteos
C9	2	neg.	1:200	linfadenomegalia generalizada
C10	3	1:64	1:200	atrofia de musculatura temporal, ceratoconjuntivite, anemia
C11	4	neg.	1:1600	linfadenomegalia generalizada
C12	5	neg.	1:200	linfadenomegalia generalizada, rarefação pilosa em dorso
C13	8	1:256	1:100	Linfadenomegalia
C14	3	1:16	1:200	Assintomático
C15	4	neg.	neg.	Hepatomegalia
C16	2	neg.	neg.	aumento de linfonodos poplíteos
C17	3	neg.	neg.	aumento de linfonodos poplíteos
C18	2	1:16	1:200	Assintomático
C19	5	1:64	1:3200	onicogribose, anemia
C20	2	neg.	neg.	linfadenomegalia generalizada
C21	2	1:16	1:1600	Assintomático
C22	2	1:16	1:200	Assintomático
C23	2	neg.	neg.	onicogribose, lesões crostosas em ponta de orelha
C24	7	neg.	1:200	Assintomático
C25	4	1:16	1:200	linfadenomegalia generalizada
C26	6	1:64	1:50	ceratoconjuntivite seca, ulceração cutânea
C27	2	neg.	1:2600	linfadenomegalia generalizada
C28	2	neg.	1:200	Onicogribose
C29	3	neg.	neg.	linfadenomegalia generalizada
C30	5	1:16	1:1600	linfadenomegalia generalizada
C31	1	1:64	1:400	Assintomático

**Quadro 2** - Idade, título de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* (RIFI Toxo) e anti-*Neospora caninum* (RIFI Neo) e alterações clínicas observados em 10 cães sem raça definida, naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, com sintomas neurológicos (grupo neurológico).

CÃO	Idade (anos)	RIFI Toxo	RIFI Neo	SINTOMAS
N1	1	neg.	neg.	convulsões generalizadas
N2	3	neg.	1:100	convulsões generalizadas
N3	5	1:256	1:3200	locomoção atáxica, espasticidade, hipermetria
N4	3	neg.	neg.	locomoção atáxica
N5	2	neg.	neg.	incapacidade para movimentação da mandíbula, tremor de intenção
N6	1	neg.	neg.	tetraparesia, nistagmo, estrabismo posicional, ceratoconjuntivite seca
N7	1	neg.	neg.	convulsões generalizadas, paresia de membros pélvicos
N8	1	neg.	neg.	locomoção atáxica
N9	4	neg.	neg.	locomoção atáxica, quedas, midríase bilateral, alopecia periocular
N10	3	neg.	neg.	inclinação de cabeça, andar em círculos para a direita

#### 4.1 Reação de imunoistoquímica para *Leishmania sp.*

Dos 41 encéfalos analisados, não foram observadas formas amastigotas de *Leishmania sp.*. Foram observadas, em 23 cães, áreas de marcação antigênica inespecífica no interior de vasos sanguíneos. Os resultados das marcações antigênicas para *Leishmania sp.*, de cada um dos fragmentos de sistema nervoso central avaliados em cada animal, encontram-se apresentados nos anexos A a SS.

## **4.2 Reação de imunistoquímica para linfócitos CD3+**

Em 34/41 (82,9%) cães foram observadas linfócitos CD3+, variando em intensidade de acordo com o fragmento analisado. Todos os cães com sintomas neurológicos e 24/31 (75,6%) cães sem sinais de envolvimento neurológico apresentaram imunomarcção para CD3+ (Figura 1). Destes, quatro não apresentavam sintomas evidentes da doença. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0011$ ) entre as imunomarcções do grupo controle e dos cães com sintomas neurológicos (Tabela 1). Os últimos apresentaram uma maior intensidade de marcação antigênica quando comparado ao grupo sem sintomas neurológicos, no entanto, na maior parte dos animais a marcação antigênica variou de rara (+) a moderada (+++). As regiões que mais apresentaram imunomarcção para CD3+ foram o lobo frontal, o mesencéfalo e o cerebelo, sem correlação com os achados clínicos observados nos animais com sintomas neurológicos. Os resultados das marcações antigênicas para linfócitos CD3+, de cada um dos fragmentos de sistema nervoso central avaliados em cada animal, encontram-se apresentados nos anexos A a SS.

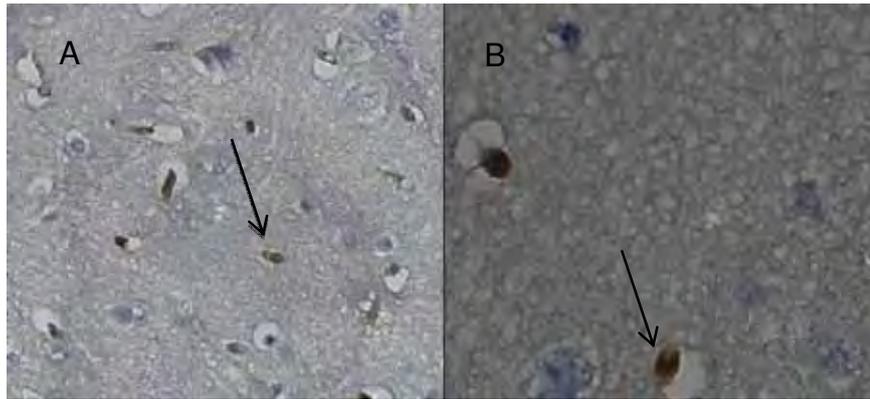


FIGURA 1: Fotomicrografia de corte histológico de córtex frontal de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Imunoistoquímica para pesquisa linfócitos CD3+, obj. 40x (A) e 100x (B). Observar marcação positiva para anticorpo anti-CD3. Araçatuba-SP, 2011.

### 4.3 Reação de imunoistoquímica para linfócitos CD4+

Em 10/41 (24,3%) cães foram observados linfócitos CD4+. A marcação deste tipo celular foi mais evidente no grupo de cães com sintomas neurológicos. Dos animais com quadro neurológico 5/10 (50%) apresentaram imunomarcações (Figura 2). Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0090$ ) entre as imunomarcações dos cães do grupo sem envolvimento clínico neurológico e daqueles com sintomas neurológicos (Tabela 1). A marcação variou de leve (+) a intensa (++++), e as regiões que mais apresentaram marcações foram o plexo coróide e o mesencéfalo. Os resultados das marcações antigênicas para linfócitos CD4+, de cada um dos fragmentos de encéfalo avaliados em cada animal, encontram-se apresentados nos anexos A a SS.

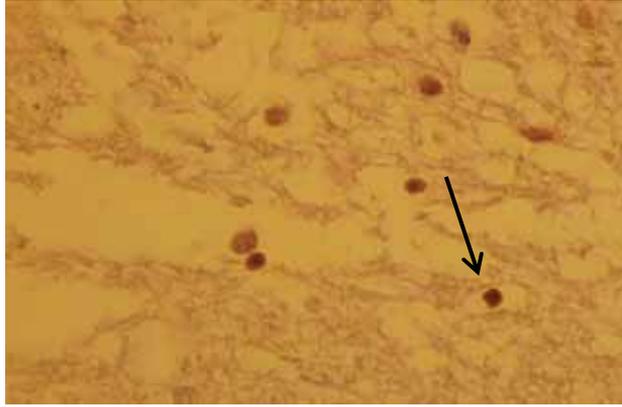


FIGURA 2: Fotomicrografia de corte histológico de córtex frontal de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Imunoistoquímica para pesquisa linfócitos CD4+, obj. 40x. Observar marcação positiva para anticorpo anti-CD4. Araçatuba-SP, 2011.

#### 4.4 Reação de imunoistoquímica para linfócitos CD8+

Dos 41 cães analisados, apenas quatro (9,7%) apresentaram marcação antigênica para linfócitos CD8+ (Figura 3), sendo todos com sintomas neurológicos, divergindo estatisticamente ( $p=0,021$ ) do grupo controle (Tabela 1). A marcação antigênica variou em intensidade de acordo com a região analisada. Um animal apresentou raros linfócitos CD8+, dois animais apresentaram marcação moderada e um único cão apresentou marcação intensa. Os resultados das marcações antigênicas para linfócitos CD8+, de cada um dos fragmentos de sistema nervoso central avaliados em cada animal, encontram-se apresentados nos anexos A a SS.

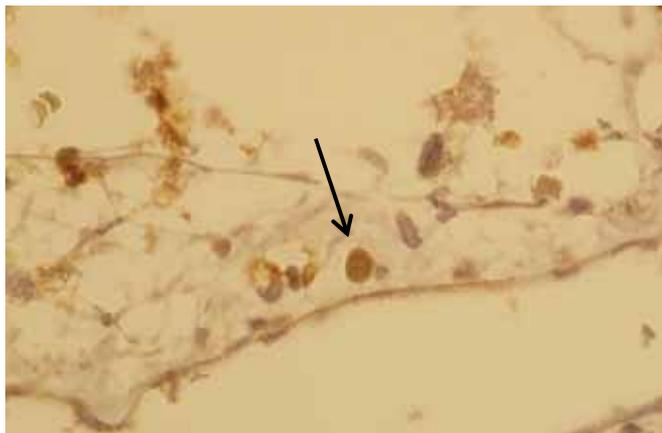


Figura 3: Fotomicrografia de corte histológico de mesencéfalo de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Imunoistoquímica para pesquisa linfócitos CD8+, obj. 100x. Observar marcação positiva para anticorpo anti-CD8 na ponta da seta. Araçatuba-SP, 2011.

#### 4.5 Reação de imunoistoquímica para macrófagos

Em 38/41 (92,6%) cães estudados foram observados macrófagos no sistema nervoso central (Figura 4), principalmente em região de plexo coróide e cerebelo. Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p= 0,7664$ ) (Tabela 1). Na maior parte dos animais, a marcação antigênica variou de rara (+) a leve (++) . Os resultados das marcações antigênicas para macrófagos, de cada um dos fragmentos de sistema nervoso central avaliados em cada animal, encontram-se apresentados nos anexos A a SS.

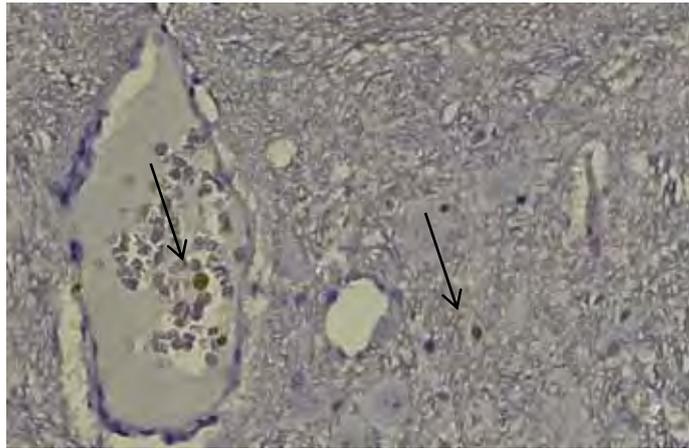


Figura 4: Fotomicrografia de corte histológico de lobo piriforme de cão naturalmente acometido por leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Imunoistoquímica para pesquisa macrófagos. Observar marcação antigênica na ponta da seta. obj. 40x. Araçatuba-SP, 201

**Tabela 1** - Mediana (Md), valor mínimo (Min) e máximo (Max) da soma dos escores utilizados para determinar a imunomarcação para *Leishmania* sp, linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos (MO) no tecido nervoso de 41 cães naturalmente acometidos por leishmaniose visceral, sem (controle) e com (neurológico) presença de sintomas neurológicos.

Marcadores	Controle (n=31)		Neurológico (n=10)		p <sup>(1)</sup>
	Md	Min - Máx	Md	Min-Máx	
CD3+	2	0-9	7	3-11	0,0011
CD4+	0	0-4	1	0-7	0,0090
CD8+	0	0-0	0	0-4	0,0021
MO	2	0-8	3	0-12	0,7664

<sup>(1)</sup> Teste de Mann-Whitney

## 5. DISCUSSÃO

Embora 31,7% (13/41) dos cães não apresentassem evidências de sintomas da doença quando do exame físico, 65,8% (27/41) dos animais possuíam sintomas tais como emagrecimento, linfadenopatia e lesões cutâneas, comumente observados em animais infectados (BANETH, 2006). Embora a leishmaniose visceral canina seja uma doença sistêmica crônica, a literatura a respeito de animais com comprometimento neurológico é escassa. Os sintomas neurológicos observados nos cães com leishmaniose visceral do presente estudo sugeriram, em alguns casos, a ocorrência de lesões focais, como nos animais que apresentavam lesões de nervos cranianos e andar em círculos. As alterações de nervos cranianos compreenderam a lesão do nervo trigêmio e de hipoglosso no cão N5, sugerindo lesão em tronco encefálico, levando a uma paralisia de mandíbula e de língua, respectivamente. O mesmo animal, no entanto, apresentava tremor de intenção, evidenciando um comprometimento cerebelar.

A observação de animais com sinais de comprometimento neurológico restrito a algumas regiões encefálicas, tal como o que ocorreu com outro cão cujos sintomas evidenciavam uma lesão em sistema vestibular central do lado direito (N10), dificultam o diagnóstico de leishmaniose visceral, como salientado por Marcondes (2008). Nesses casos geralmente suspeita-se de lesões estruturais focais. Tais achados chamam a atenção para o risco de subdiagnóstico da doença, uma vez que a bibliografia indexada é muito pobre no que tange à descrição de quadros neurológicos em animais infectados por *Leishmania infantum chagasi*.

Nenhum dos dois cães com lesões focais (N5 e N10) possuía títulos de anticorpos anti-*T. gondii* ou anti-*N. caninum*, agentes que tem sido observados em associação com infecções por *Leishmania chagasi* em áreas endêmicas (GENNARI et al., 2006), descartando a possibilidade de participação desses agentes infecciosos na etiopatogenia dos sintomas neurológicos. Apesar de não ter feito parte do presente estudo, em alguns animais foi realizado o exame histopatológico do sistema nervoso central. Nos dois cães verificou-se a presença de um infiltrado perivascular linfoplasmocitário, satelitose e

neuronofagia, sem observação de cistos ou lesões localizadas nas áreas acometidas, compatíveis com acidente vascular cerebral, neoplasia ou meningoencefalite granulomatosa, distúrbios que foram considerados também quando da elaboração do diagnóstico diferencial, apesar da idade dos cães.

Um dos cães com sintomas neurológicos (N3), que apresentava locomoção atáxica, hipermetria e espasticidade de membros, possuía elevados títulos de anticorpos anti-*T.gondii* e anti-*N. caninum* (1:256 e 1:3200, respectivamente), confirmando a associação entre os agentes infecciosos relatada por Gennari et al. (2006). No entanto, o exame histopatológico do sistema nervoso central não evidenciou a presença de cistos dos parasitas.

Nos animais do presente estudo houve uma maior proporção de cães com título de anticorpos anti-*N. caninum* (24 cães; 58,53%) quando comparado aos cães com anticorpos anti-*T. gondii* (15 cães; 36,58%), discordando dos achados de Gennari et al. (2006) que verificaram 32,6% de sororeatividade para neosporose e 41% para toxoplasmose em cães com leishmaniose visceral provenientes da mesma área endêmica. Os títulos de anticorpos foram mais elevados quando se tratava de neosporose, principalmente nos cães sem evidências de sintomas neurológicos. Apesar destes resultados, não é possível creditar a esses agentes infecciosos as alterações observadas no sistema nervoso dos cães do presente estudo, uma vez que oito (80%) cães com alterações neurológicas não possuíam anticorpos séricos contra esses parasitos.

Dos 41 cães, não foram identificadas marcações antigênicas para formas amastigotas de *Leishmania* sp. Tais achados concordam com os estudos anteriores realizados por Marcondes (2008) e Dias e colaboradores (2010), em que não havia sido identificada a presença do parasito no tecido nervoso de cães naturalmente infectados, mesmo na presença de envolvimento neurológico. Em grande parte dos cortes de sistema nervoso central verificou-se marcação antigênica no interior de vasos sanguíneos, principalmente no plexo coróide, indicando a presença de antígenos de leishmania circulantes, corroborando com os achados de Marcondes (2008).

A ausência de formas amastigotas no tecido nervoso dos cães do presente estudo, demonstra a dificuldade do parasito em ultrapassar a barreira hematoencefálica, fato também relatado por Marcondes (2008) e Melo (2009). A ausência do parasito no encéfalo de cães com e sem sintomas neurológicos sugere a participação do sistema imune na patogenia do quadro, independente da presença do parasito.

As reações imunes que ocorrem no tecido nervoso acontecem de uma forma distinta do resto do organismo, provavelmente devido a características anatômicas locais. Deste modo, a relativa ausência de drenagem linfática do parênquima, de células endógenas apresentadoras de antígenos e a barreira hematoencefálica interferem nas respostas imunes (RANSOHOFF et al., 2003). O CD3+ é uma importante molécula do receptor antigênico presente na membrana de linfócitos T (ROITT, 2004). Nos animais do presente estudo foram detectadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo neurológico no que tange a presença desse tipo celular, com evidente aumento de marcação no segundo grupo, sugerindo a participação de linfócitos T na patogenia da doença no sistema nervoso central. Tais achados diferem das observações de Marcondes (2008) que, ao avaliar 39 cães com leishmaniose visceral, dos quais 21 possuíam sintomas neurológicos, verificou marcação antigênica semelhante nos animais de ambos os grupos.

Os cães com sintomas neurológicos apresentaram linfócitos T CD3+ em lobo frontal, mesencéfalo e cerebelo, com raras células identificadas no plexo coróide, fato que discorda dos achados de Melo e Machado (2009), que verificaram a presença de intenso infiltrado inflamatório com marcação antigênica para linfócitos CD3+ na região do plexo coróide de 41 cães portadores de leishmaniose visceral sem quadro neurológico. Nos animais do presente estudo, foram verificadas apenas marcações inespecíficas quando da avaliação do plexo coróide, sem que pudéssemos afirmar que se tratavam de células CD3+. Uma das possíveis razões para tal diferença pode residir no fato de que não se conhece o tempo de evolução da doença nos animais utilizados em ambos os estudos. Desta forma, pode ser que dependendo da fase da doença haja uma maior quantidade de células no plexo coróide, que, segundo

Melo et al. (2009a) pode ser o local de entrada do parasito no sistema nervoso central.

Enquanto as moléculas CD3<sup>+</sup> encontram-se presentes em todas as subespécies de linfócitos T, incluindo T auxiliares, T citotóxicos e T $\gamma\delta$ , o CD4<sup>+</sup> pode ser observado em receptores de células T auxiliares (Th), neutrófilos e macrófagos, e o CD8<sup>+</sup> em receptores de linfócitos T citotóxicos. Apesar de linfócitos T CD3<sup>+</sup> terem sido identificados em todos os cães com sintomas neurológicos, o mesmo não aconteceu com linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Em apenas dez (24,3%) animais foram observados linfócitos CD4<sup>+</sup>, sendo a marcação antigênica mais evidente no grupo de cães com sintomas neurológicos, onde se identificou este tipo celular em metade dos animais. A imunomarcagem variou de leve (+) a intensa (++++), e as regiões que mais apresentaram estas células foram o plexo coróide e o mesencéfalo. Não existem estudos na literatura compilada que tenham investigado a participação dessa classe de linfócitos no sistema nervoso central de indivíduos acometidos por leishmaniose visceral, seja canina ou humana. No entanto, sabe-se que hospedeiros susceptíveis ao desenvolvimento clínico da leishmaniose visceral apresentam uma apoptose de células T CD4<sup>+</sup> e uma diminuição na produção de citocinas por linfócitos Th1, levando a uma falha na imunidade celular, com consequente imunossupressão severa (AGOSTINO et al., 2005). Talvez esse mesmo tipo de resposta a infecção se reflita no sistema nervoso central de cães acometidos pela doença.

De forma semelhante, dos 41 cães avaliados, apenas quatro cães (9,7%), todos com sintomas neurológicos, apresentaram marcação antigênica para linfócitos CD8<sup>+</sup>. Estes resultados diferem daqueles observados por Abreu-Silva et al. (2003), que encontraram um grande número de linfócitos CD8<sup>+</sup> como o principal componente do infiltrado inflamatório presente no sistema nervoso central de camundongos, após uma infecção experimental com *L. amazonenses*. No entanto, esses animais foram submetidos a eutanásia oito meses após a infecção experimental com o parasito, fato este que pode explicar a maior migração para o sistema nervoso central destas células em relação a outros tipos de linfócitos.

Apesar da ausência de estudos investigando a participação de linfócitos CD8+ nas lesões do sistema nervoso central de cães com leishmaniose visceral, em casos de encefalite pelo vírus da cinomose os linfócitos CD8+ aparecem no tecido nervoso em fases mais crônicas da doença (WÜNSCHMAN et al. 1999). Isto poderia explicar o fato da ausência de marcação antigênica ter sido observada nos cães sem sintomas neurológicos e da pouca marcação em cães do grupo neurológico. Não se pode afirmar em que fase da infecção estes animais se encontravam, mas pelo fato da legislação brasileira exigir que se faça a eutanásia de cães com leishmaniose visceral, os mesmos acabam não evoluindo para fases mais avançadas da doença, principalmente em se tratando de alterações neurológicas.

Uma das possíveis explicações para a presença de linfócitos CD3+ e da pequena quantidade de linfócitos CD4+ e CD8+ no tecido nervoso dos cães do presente estudo, reside no fato de que uma subpopulação de células CD3+CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> compreendem os linfócitos TCD3+ $\gamma\delta$ . Estes encontram-se significativamente aumentados no sangue de pacientes com leishmaniose visceral, indicando que devem possuir um importante papel na resposta imune primária ao parasito (RAZZIUDIN et al., 1992; RUSSO, et al 1993). Estas células secretam altos níveis de fator de crescimento e de fator de diferenciação de linfócitos B, importantes no desenvolvimento da resposta imune humoral, levando a produção de imunoglobulinas, que agravam o quadro de leishmaniose visceral (RAZZIUDIN et al., 1992)

De maneira geral, as lesões histopatológicas em animais com leishmaniose visceral compreendem uma reação inflamatória intensa crônica, consistindo de células mononucleares, principalmente em órgãos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário. No sistema nervoso, as células da glia parecem exercer um importante papel na patogênese da leishmaniose visceral, uma vez que a micróglia é ativada e sofre maturação por estímulos decorrentes da presença de patógenos, injúria cerebral e interações com células T (MELO et al., 2009b). No presente estudo foram observadas marcações antigênicas para macrófagos tanto nos animais sem alterações neurológicas como naqueles com sintomas de lesão do sistema nervoso central, demonstrando a participação destas células na patogenia da doença

independente da presença do quadro neurológico, e corroborando os achados de Marcondes (2008) que, no entanto, encontrou uma maior marcação em cães com sintomas neurológicos. As células da micróglia tem importante função como apresentadoras de antígenos, e podem induzir o crescimento, a sobrevivência e a produção de citocinas pelas células T. Em doenças que envolvem ativação de linfócitos T em órgãos linfóides, a microglia e macrófagos derivados do sangue podem interagir com células T CD4+ e regular tanto a resposta Th1 como Th2 (MELO et al., 2009a).

## **6. CONCLUSÕES**

Baseando-se nos resultados do presente estudo, é possível concluir que o quadro neurológico associado à leishmaniose visceral parece ser decorrente de uma reação do sistema imune e não da presença do parasito no tecido nervoso. Os sintomas neurológicos observados podem estar relacionados com a presença de linfócitos T e, portanto, com um mecanismo de imunidade celular. No entanto, novos estudos precisam ser realizados para verificar a participação de outros tipos de fenótipos de linfócitos T nos quadros neurológicos associados a doença.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, N.J.; PATABENDIGE, A.A.K.; DOLMAN, D.E.M.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of disease**, v.37, n.1, p. 13-25, 2009.

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

AGOSTINO, P.D.; POTESTIO, M.; ROMANO, G.C.; MILANO, S.; FERLAZZO, V.; AQUINO, A. ; CARUSO, R.; VITALE, G.; MANSUETO, S.; CILLARI, E. CD4+/CCR5+ and CD4+/CCR3+ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in patients with acute visceral leishmaniasis. **Proceeding.....** p. 250, 2005. Sicily, Italy.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiology of Diseases**. v.16, n.1, p1-13, 2004.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.28, n.7, p.329-337. 2006.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 685-698

BEENA, K.R.; RAMESH, V.; MUKHERJEE, A. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.30, p.616-620, 2003.

CAMARGO, M.E. Introdução as técnicas de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v.10, n.4, p.143-171, 1974.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: Clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.25, n.5, p.358-368, 2003.

CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do Gênero *Leishmania* patogênica para o homem. **O Hospital**. v. XI, n.2, p.5-9, 1937.

DIAS, M.L.M.; CASTRO, M.B.; BARROS, R.M. Estudo histopatológico do sistema nervoso de animais com leishmaniose visceral canina no Distrito Federal. **Anais da 62<sup>o</sup> reunião anual da SBPC**, 2010.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. *Toxoplasmosis of animals and man*. Boca Raton: CRC, 1988.

FEITOSA, M.F.; 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). **Clinica Veterinária**, n. 28, p.36-44, 2000.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; BONELLO, F.L.; CIARLINI, P.C.; GONÇALVES, M.E.; LIMA, V.M.F.; PERRI, S.H.V. Avaliação líquórica de cães, com e sem sintomatologia neurológica naturalmente acometidos por leishmaniose visceral. **Veterinária Notícias**, v.11, n.2, p.61-69, 2005.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2., 2002, Sevilla, Spain. **Proceeding...** Salamanca: Intervet bv, 2002. p. 21-24.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V.H. What is immune privilege (not)? **Trends in Immunology**, v.28, n.1, p.12-18, 2007.

GARCÍA-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, n.11, p.539-546, 1996.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. 1993, 202f. Tese (Doutorado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.

GENNARI, S.M.; FRANCO, W.A.C.; FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LIMA, V.M.F.; AMAKU, M. Presence of anti-Neospora caninum and Toxoplasma gondii antibodies in dogs with visceral leishmaniosis from the region of Araçatuba, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.613-619, 2006.

GONÇALVES, ME; PEREIRA, F.V.; DIAS, A.K.K.; IRIKURA, S.; NUNES, C.M.; MARCONDES, M. Detecção de DNA de Leishmania sp em líquido de cães procedentes de área endêmica para leishmaniose visceral canina. In **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses**. Ouro Preto, MG, 2004.

IKEDA, F.A.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; FEITOSA, M.M.; MACHADO, G.F.; PERRI, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.1, p.5-11, 2007.

KONTOS, V.J.; KOUTINAS, A.F. Old World Canine Leishmaniasis. **Compendium on Continuing Education Small Animal**, v.15, n.7, p.949-959, 1993.

LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P.; SOTTO, M.N.; SINHORINI, I.L.; GOTO, H. The role of complement in the acute inflammation process in the skin and in the host-parasite interaction in hamster inoculated with *L. (L.) chagasi*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 77, n.1, p.15-24, 1996.

LIMA, V.M.F; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n.4, p.485-489, 2003.

MACHADO, G.F.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; MARCONDES, M.; PERRY, 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**, vol. 136, p. 340-345, 2010.

MARCONDES, M. Leishmaniose uma zoonose. In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS ANIMAIS, 7; 2007, São Paulo, São Paulo, **Anais...** São Paulo, p. 211, 2007.

MARCONDES, M. Envolvimento do sistema nervoso central na leishmaniose visceral canina. 2009. 154f. Tese (Livre-docência). Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista – Araçatuba, 2008.

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

MELO, G.D., MARANGONI, N.R.; MARCONDES, M.; LIMA, V.L.M., MACHADO, G.F. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniasis: A preliminary report. **The Veterinary Journal**, vol. 188, p. 243-245, 2011.

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, p. 248-256, 2009b.

MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p.67-83.

NIETO, C.G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCÍA-ALONSO, M.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Veterinary Record**, v.139, n.14, p.346-347, 1996.

NOLI, C. Leishmaniosis canina. **Waltham Focus**. v.9, n.2, p.16, 1999.

PRASAD, L.S.N.; SEN, S. Migration of leishmania donovani amastigotes in the cerebrospinal fluid. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n.6, p. 652-654, 1996.

RANSOHOFF, M.R.; KIVISÄKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nature**, v.3, p.569-581, 2003.

RAZIUDDIN, S.; TELMANASI, A.W.; EL-AWAD, M.E.; AMAURI, O.; AL-JANADI, M. Gamma-delta T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. **Europe Journal of Immunology**, v. 22, p. 1143-1148, 1992.

REY, L. **Parasitologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. P.214-240.

ROITT, I.M.; DELVES, P.J. **Fundamentos de Imunologia**, 10.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2003, 490 p.

ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. **British Medical Journal**, v.2, p.1401,1903.

RUSSO, D.M; ARMITAGE, R.J.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.; GRABSTEIN, K.H.; REEED, S.G. Antigen-reactive gamma-delta T cell in human leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 7., p. 3712-3718, 1993.

SANTOS, S.O.; ARIAS, J.; RUBEIRO, A.A.; PAIVA, H.M.; FREITAS, R.A.; MALACCO, M.A. Incrimination of Lutzomyia cruzi as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical Veterinarian Entomology**, v.12, n.3, p.315-317, 1998.

SCOTT, D.W.; WILLIAM, H.M.; GRIFFIN, G.E. Viral, rickettsial and protozoal skin disease. **Small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia: Saunders, 2001. p.517.- 542.

SLAPPENDEL, R.J.; FERRER, L. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Clinical microbiology and infectious diseases of the dog and cat**. 2 ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 1998. p.450- 458.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L, ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 7 ed. Philadelphia: Elsevier, 2004. 494p.

VIÑUELAS, J.; GARCÍA-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.

WÜNSCHMANN, A; ALLDINGER, S.; KREMMER, E; BAUMGÄRTNER, W; Identification of CD4+ and CD8+ T cells subsets and B in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute, and chronic demyelinating distemper encephalitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.67, n.2, p. 101-106, 1999.

## ANEXOS

**ANEXO A:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C1) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C1</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	++	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	-	-	+++

**ANEXO B:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C2) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C2</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	+	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	++	+	-	-	-

**ANEXO C:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C3) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C3</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	+	-	-	++++

**ANEXO D:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C4) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C4</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	++	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	+	+	-	-

**ANEXO E:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C5) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C5</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	+	-	++
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	-	+

**ANEXO F:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C6) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C6</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	-	+

**ANEXO G:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C7) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C7</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	+	-	-	++
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	+	-	+++	-

**ANEXO H:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C8) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C8</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+++	-	+++	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	-	+

**ANEXO I:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C9) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C9</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	+	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	+	-	-	+

**ANEXO J:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C10) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C10</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	+	-	+	-

**ANEXO L:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C11) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C11</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	+	-	-

**ANEXO M:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C12) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C12</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	+	-	-	-

**ANEXO N:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C13) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C13</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	+++	-	+++	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	+	-

**ANEXO O:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C14) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C14</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	+	-
<b>CD3+</b>	-	++	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	-	-

**ANEXO P:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C15) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C15</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	++++	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	-	+	-

**ANEXO Q:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C16) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C16</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	+
<b>CD3+</b>	++	++	+	+	++
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	+	-	+	+

**ANEXO R:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C17) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C17</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	++	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	+	+	+

**ANEXO S:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C18) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C18</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	+	-	+	-

**ANEXO T:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C19) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C19</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	++++	++++
<b>CD4+</b>	-	-	-	+	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	+	-	-

**ANEXO U:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C20) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C20</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	++	++	-	+	++
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	+	-	+	+

**ANEXO V:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C21) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C21</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+	+	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	+	-	-	-

**ANEXO X:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C22) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C22</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	+	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	++	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	++	-	++	+	+

**ANEXO Z:** Resultados da reação de imunistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C23) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C23</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	++++	-
<b>CD4+</b>	-	-	++	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	-	+	+

**ANEXO AA:** Resultados da reação de imunistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C24) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C24</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	++	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+++	+	++	++	-

**ANEXO BB:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C25) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C25</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	+	-	+

**ANEXO CC:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C26) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C26</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	++	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	-	-	-

**ANEXO DD:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C27) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C27</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	++++	+++	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	+	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	-	-

**ANEXO EE:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C28) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C28</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	++	+	++	++++
<b>CD4+</b>	-	+	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	+	-	++

**ANEXO FF:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C29) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C29</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	++	+	+

**ANEXO GG:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C30) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C30</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+++	++	++	-	-
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	-	-	+	-

**ANEXO HH:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (C31) portador de leishmaniose visceral sem sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal C31</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	+	-	-
<b>CD3+</b>	++	-	-	++++	++
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	+	-

**ANEXO II:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N1) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N1</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+	+++	++	+	++
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+	+	-	-	+

**ANEXO JJ:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N2) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N2</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+++	-	-	+++	++++
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	++++	-
<b>Macrófagos</b>	-	+	+	-	+

**ANEXO LL:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N3) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N3</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	++	+	++	+	+
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	++	-	-	+	++

**ANEXO MM:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N4) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N4</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	-	+	++	-	-
<b>CD4+</b>	-	++	++	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	++	+	+	++	++

**ANEXO NN:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N5) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N5</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+	-	++	+++	-
<b>CD4+</b>	-	-	+++	++++	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	+++	++	++	+	++++

**ANEXO OO:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N6) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N6</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+	-	+	-	+
<b>CD4+</b>	++	-	-	-	+++
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	+	-	-	+

**ANEXO PP:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N7) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N7</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	++++	++	+	++	+
<b>CD4+</b>	++	+	-	-	+++
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	+++
<b>Macrófagos</b>	-	+	-	-	-

**ANEXO QQ:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N8) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N8</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+	++	+	-	+
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	+++	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	-	-

**ANEXO R:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N9) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N9</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	++	-	++	-	++
<b>CD4+</b>	-	-	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	-	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	+	+	-	-

**ANEXO SS:** Resultados da reação de imunoistoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., linfócitos CD3+, CD4+, CD8+ e macrófagos no lobo frontal (LF), plexo coróide (PC), mesencéfalo (MES), lobo piriforme (LP) e cerebelo (CER) de cão (N10) portador de leishmaniose visceral com sintomas neurológicos. Araçatuba – SP, 2011

<b>Animal N10</b>	<b>LF</b>	<b>PC</b>	<b>MES</b>	<b>LP</b>	<b>CER</b>
<b><i>Leishmania</i> sp.</b>	-	-	-	-	-
<b>CD3+</b>	+++	++	+	++	+++
<b>CD4+</b>	-	+	-	-	-
<b>CD8+</b>	-	+	-	-	-
<b>Macrófagos</b>	-	-	-	-	-