

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

**DETECÇÃO DAS METALOPROTEINASES-2 E -9 NO
PLEXO CORÓIDE E NO LIQUOR DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania
chagasi***

Natalia Ribeiro Marangoni
Bióloga

ARAÇATUBA – SP
2009

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

**DETECÇÃO DAS METALOPROTEINASES-2 E -9 NO
PLEXO CORÓIDE E NO LIQUOR DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania
chagasi***

Natalia Ribeiro Marangoni

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Fabrino Machado

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

ARAÇATUBA – SP
2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NATALIA RIBEIRO MARANGONI – nascida em Lins/SP no dia 10 de outubro de 1985, concluiu graduação em Ciências Biológicas pela Fundação Educacional de Penápolis, FUNEPE – Penápolis/SP, no ano de 2007. Durante a graduação, no período de 2005 a 2007, realizou estágio de iniciação científica no DAPSA do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, com apoio financeiro da FAPESP nos últimos dois anos do período. Possui três trabalhos publicados como co-autora, leciona na Faculdade de Saúde São Paulo, FASSP – Penápolis e cursa Pós Graduação em Ciência Animal do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Araçatuba, na Área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica.

“Sucesso é quando você faz o que sempre fez, só que todo mundo percebe.”

(Adriana Falcão)

Dedico este trabalho àquele que tudo fez: a Deus e aos anjos que Ele deixou aqui na Terra para cuidarem de mim, sempre me apoiando e enxugando minhas lágrimas, meus pais Walter Delgado Marangoni e Abigail Tripoloni Ribeiro Marangoni.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Gisele Fabrino Machado, pela orientação, paciência e alegria constante, fazendo-me mais do que uma orientada, uma amiga.

Ao Curso de Medicina Veterinária e ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos alunos do Curso de Medicina Veterinária, Guilherme Melo, Olívia Campos e Milena Sato, que me auxiliaram nos experimentos e me proporcionaram momentos agradáveis durante todo o nosso convívio.

À professora Sílvia Helena Venturoli Perri, pelos esclarecimentos estatísticos.

Ao professor Guilherme de Paula Nogueira, que me abriu as portas para a pesquisa durante a graduação.

Ao meu noivo Lucas Belussi, pelo incentivo para a realização do Mestrado e pela paciência nos momentos de estresse.

À minha irmã Gabriela Marangoni, pela companhia nas viagens a Araçatuba e pelas palavras de conforto nos momentos mais difíceis.

À minha amiga Laura Aguiar, que me incentivou, chorou comigo e agora comemora junto a mim mais esta etapa concluída.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Leishmaniose visceral canina	11
2.2 Sistema Nervoso Central	12
2.3 Meninges	13
2.4 Líquido Cefalorraquidiano (Liquor).....	17
2.5 Barreiras Cerebrais	20
2.5.1 Barreira Hematoencefálica (BHE).....	21
2.5.2 Barreira Hematoliquórica (BHL)	24
2.6 Metaloproteinases da Matriz (MMPs)	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Animais	33
3.2 Delineamento Experimental	33
3.3 Coleta de Material do SNC	34
3.4 Processamento das Amostras de Liquor e Plexo Coróide.....	34
3.5 Quantificação de Proteínas pelo Método Colorimétrico Ácido Bicincônico (BCA)	35
3.6 Padronização das Metaloproteinases Recombinantes	35
3.7 Verificação de Atividade Enzimática e Análise Semi-quantitativa das MMPs-2 e -9 através de zimografia	36
4 RESULTADOS.....	37
4.1 Plexo Coróide	37
4.2 Liquor	39
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	46

DETECÇÃO DAS METALOPROTEINASES-2 E -9 NO PLEXO CORÓIDE E NO LIQUOR DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania chagasi*

RESUMO – A leishmaniose visceral canina, causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) chagasi*, é uma doença de grande ocorrência principalmente na América Latina. A caracterização das lesões sistêmicas associadas à infecção pelo parasita tem sido amplamente estudada, entretanto, poucos autores elucidam a patogenia na forma nervosa. Com o objetivo de compreender melhor os mecanismos envolvidos na inflamação do sistema nervoso central de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, amostras de liquor e plexo coróide foram colhidas e submetidas à zimografia para a detecção de metaloproteinases (MMPs). Amostras do plexo coróide e liquor de cães sadios foram avaliadas como controle. Os géis de zimograma foram analisados quanto à presença e atividade proteolítica das metaloproteinases -2 e -9. Formas inativas das proteases foram detectadas no plexo coróide, sendo que o Grupo de animais positivos não diferiu do negativo. No liquor foram encontradas formas ativas e inativas das MMPs-2 e -9 e a atividade proteolítica das mesmas diferiu entre os Grupos positivo e negativo. A MMP-2 teve maior detecção nos animais negativos e a MMP-9 nos positivos. O aumento da MMP-9 no liquor dos cães doentes representa seu possível envolvimento na patogenia das lesões encefálicas ao ocasionarem o rompimento das barreiras hematoencefálica e/ou hematoliquórica, permitindo a passagem de células e proteínas envolvidas no processo inflamatório.

Palavras-chave: Barreira hematoencefálica, metaloproteinase 2 da matriz, metaloproteinase 9 da Matriz, leishmaniose visceral, cães

DETECTION OF METALLOPROTEINASES-2 AND -9 IN THE CHOROID PLEXUS AND IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF *Leishmania chagasi* NATURALLY INFECTED DOGS

SUMMARY – Canine visceral leishmaniasis, caused by the protozoan *Leishmania (Leishmania) chagasi*, is a disease with high occurrence in Latin America. The characteristics of the systemic lesions related to the infection have been widely studied, but few studies clarify the disease on a neurological aspect. With the aim of a better understanding of the inflammation mechanisms within the central nervous system of dogs naturally infected by *L. chagasi*, some samples of cerebrospinal fluid and choroid plexus were collected and submitted to zymography to detect metalloproteinases (MMPs). Samples of choroid plexus and cerebrospinal fluid from healthy dogs were evaluated as control. The zymogram gels were analysed taking into account the presence and the proteolytic activity of metalloproteinase -2 and -9. Inactive forms of the proteases were detected in the choroid plexus, and the group of positive animals did not differ from negative ones. In the cerebrospinal fluid, active and inactive forms of MMP-2 and -9 were found, and their proteolytic activity differed between negative and positive groups. MMP-2 had higher detection in the negative animals and MMP-9 in the positive ones. The increasing of MMP-9 in the cerebrospinal fluid of infected dogs represents its possible involvement in the brain injuries, by causing the disruption of blood-cerebrospinal fluid barrier and/or blood-brain-barrier, allowing the passage of cells and proteins involved in inflammation process.

Keywords: Blood-brain-barrier, matrix metalloproteinase 2, matrix metalloproteinase 9, visceral leishmaniasis, dogs

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma antroponose causada por um protozoário do gênero *Leishmania*. No Brasil é causada pela *Leishmania chagasi*, identificada no cão, gato, canídeos silvestres, marsupiais e roedores. No cão, os principais sintomas decorrentes de infecção por *L. chagasi* são onicogribose, lesões cutâneas, conjuntivites, linfadenopatia e perda de peso (VERÇOSA et al., 2008).

Embora poucos autores citem a ocorrência de lesões no sistema nervoso central (SNC), há relatos sobre a migração de parasitas, deposição de antígenos e imunoglobulinas levando a meningite e coroidite (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001). Camundongos inoculados experimentalmente com *L. amazonensis*, espécie conhecida por causar leishmaniose tegumentar, mostraram lesões inflamatórias no SNC (ABREU-SILVA et al., 2003).

Muitas vias têm sido propostas para justificar a entrada de patógenos no SNC, o que inclui a invasão direta das células epiteliais do plexo coróide (PC) (STRAZZIELLE; GHERSI-EGEA, 2000) ou do endotélio capilar, a passagem por dentro ou entre as células da barreira hematoencefálica (BHE) ou hematoliquórica (BHL) e o transporte através da barreira no interior de leucócitos infectados (HUANG; JONG, 2001; LOSSINSKY; SHIVERS, 2004).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) são enzimas zinco-dependentes que possuem muitas funções no SNC, variando desde a remodelação de tecidos durante o desenvolvimento ao importante papel modulador da neuroinflamação (ROSEMBERG et al., 2002b). Geralmente não são encontradas, ou estão presentes em poucas quantidades no SNC normal. No cão, o aumento destas proteínas tem sido relatado em casos de distúrbios neurológicos após injúria traumática (LEVINE et al., 2006) e neoplasias do SNC (TURBA et al., 2007).

Leib et al. (2000) e Khuth et al. (2001) associaram a produção de MMPs com a lesão da BHE em modelo experimental de meningite bacteriana e infecção do SNC por morbilivírus; posteriormente, em estudos experimentais com camundongos, também foi demonstrado que a MMP-9 facilita a entrada do vírus do Nilo Ocidental no cérebro ao aumentar a permeabilidade da BHE (WANG et al., 2008).

Kolb et al. (1998) relataram a presença de MMPs em altas concentrações no liquor de pacientes com meningites virais e bacterianas, o que sugere que as proteases podem ser produzidas em células presentes no liquor ou podem ser oriundas do sangue ou tecido passando respectivamente pela BHL ou BHE. Strazzielle e Ghersi-Egea (2000) também sugeriram a entrada de patógenos pelo PC, assim, pode ser que as MMPs estejam sendo produzidas no PC e facilitando não só a entrada de tais patógenos como também das células inflamatórias descritas por Melo et al. (2009a; b) no PC de cães infectados por *L. chagasi*.

Um elevado número de linfócitos T CD3 foi observado no encéfalo de cães portadores de LV (MELO et al., 2009a; b) e altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* foram detectados no soro e no liquor de animais com a doença (LIMA et al., 2003). Uma vez que as metaloproteinases estão envolvidas na migração de células inflamatórias, o presente estudo teve como objetivo verificar a presença da MMP-2 e da MMP-9 no plexo coróide e no liquor de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. Desta forma, foi testada a hipótese de que a presença das MMPs -2 e -9 no plexo coróide e/ou no liquor de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* auxilia na migração das células inflamatórias para o encéfalo ao aumentarem a permeabilidade da BHL. Para isto, realizou-se uma análise comparativa entre a detecção de formas inativas (próMMP) e ativas (MMP) das MMPs-2 e -9 por meio de zimografia do PC e do liquor de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* e animais sadios, utilizados como controle.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leishmaniose visceral canina*

A leishmaniose visceral canina é uma antropozoonose de ocorrência na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e Américas (Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006). No Brasil é causada pela *Leishmania chagasi* e tem os cães como principal reservatório do protozoário. O papel do cão como reservatório da doença foi descrito pela primeira vez por Deane e Deane (1955), sendo que atualmente já foi detectada em 45 municípios, ocorrendo em seis regiões administrativas: Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente, Grande São Paulo e São João da Boa Vista (CCD, 2006).

No cão, os principais sintomas decorrentes de infecção por *L. chagasi* são onicogrifose, lesões cutâneas, conjuntivites, linfadenopatia e perda de peso (VERÇOSA et al., 2008). De 215 cães avaliados clinicamente no Hospital Veterinário da UNESP-FOA-Araçatuba, de janeiro a novembro de 1999, 4% apresentou alterações neurológicas caracterizadas por paraparesia, evoluindo para paraplegia (FEITOSA et al., 2000). A análise histopatológica do sistema nervoso central (SNC) de cães portadores de LV evidenciou a presença de alterações como coroidite, depósitos hialinos na parede de vasos, e leptomeningite, inclusive em animais que não apresentavam déficit neurológico evidenciado pelo exame clínico (IKEDA et al., 2007).

Embora existam muitos relatos sobre lesões sistêmicas decorrentes da infecção por *L. chagasi* em cães, poucos autores citam a ocorrência de lesões no SNC. Há relatos sobre a migração de parasitas, deposição de antígenos e imunoglobulinas levando a meningite e coroidite (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NIETO et al., 1996; VINUELAS et al., 2001). Camundongos inoculados experimentalmente com *L. amazonensis*, espécie conhecida por causar leishmaniose tegumentar, também mostraram lesões inflamatórias no SNC (ABREU-SILVA et al., 2003).

Estudos da LV em camundongos demonstram que os resultados da infecção dependem da ativação de um dos dois subconjuntos de linfócitos T (CD4), sendo que quando é ativada a resposta Th1 (“T helper-1”), são produzidas as citocinas interferon gama (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2), enquanto que para a resposta Th2 são produzidas IL-4, IL-6 e IL-10 (CHAMIZO et al., 2005). A resposta Th1 mantém o animal assintomático, uma vez que as citocinas produzidas nesta resposta são capazes de ativar os macrófagos para fagocitose, evitando a propagação do parasita. Entretanto, no estudo de Chamizo et al. (2005), foi demonstrado que a leishmaniose visceral canina provocada por *Leishmania infantum*, em cães assintomáticos, resulta em uma resposta complexa com produção de citocinas tanto derivadas da resposta Th1 quanto da Th2.

2.2 Sistema Nervoso Central

O SNC é composto pelo cérebro e medula espinhal. Este complexo e delicado sistema é responsável por receber e enviar ao restante do corpo todo o tipo de informação acerca do que acontece no organismo animal. Estas informações são processadas por meio de sinais elétricos emitidos pelas membranas dos neurônios bem como por meio de sinais químicos transmitidos de um neurônio para o outro (LENT, 2004). Para evitar a entrada de substâncias estranhas e outros tipos de danos como fortes impactos, o SNC possui três principais mecanismos protetores: as meninges, o líquido cefalorraquidiano (liquor) e as barreiras hematoencefálica (BHE), hematoliquórica (BHL) e liquor-encefálica. Devido à presença de tais barreiras e ainda considerando que o tecido nervoso é um local desprovido de células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como células dendríticas, não possui expressão constitutiva de complexo maior de histocompatibilidade (MHC) I e II em células do parênquima e os vasos linfáticos estão ausentes, surgiu o conceito de que este é um local “imunologicamente privilegiado”

(ENGELHARDT; RANSOHOFF, 2005). Este conceito foi embasado no fato de que sarcomas implantados no parênquima do SNC de ratos cresciam devido à falta de reconhecimento pelo sistema imunológico, ao passo que quando implantados subcutaneamente ou intramuscularmente, o mesmo não ocorria. Hoje se sabe que no SNC a resposta imunológica ocorre muitas vezes de maneira tardia. Ela é diferente no parênquima, sendo este o único local onde a resposta imunológica sistêmica não adentra (GALEA et al., 2007). Portanto, o conceito de privilégio imune que vinha sendo atribuído como um estado absoluto tem sido revisto nos últimos anos. Engelhardt e Ransohoff (2005) e Galea et al. (2007) têm atribuído um novo significado à terminologia, onde o privilégio imune é considerado relativo, confinado no parênquima do SNC, aplicável tanto à resposta imune adaptativa quanto à inata e é majoritariamente o resultado da especialização da via aferente na imunidade adaptativa. Para estes autores, o SNC é imune-especializado e a vigilância imunológica local é um componente crucial para a defesa do hospedeiro.

Tendo em vista este “isolamento” do SNC, muitas vias têm sido propostas para justificar a entrada de patógenos neste sistema, o que inclui a invasão direta das células epiteliais do PC (STRAZZIELLE; GHERSI-EGEA, 2000) ou do endotélio capilar, a passagem por dentro ou entre as células da barreira hematoencefálica ou hematoliquórica, e o transporte através das barreiras no interior de leucócitos infectados (HUANG; JONG, 2001; LOSSINSKY; SHIVERS, 2004).

2.3 Meninges

Separando o encéfalo dos ossos cranianos, encontram-se três membranas conjuntivas denominadas meninges (Figura 1). A membrana mais externa e resistente fica aderida ao osso e é denominada dura-máter. Logo abaixo, situa-se a aracnóide, uma membrana intermediária que é separada da camada mais interna, a pia-máter, por um espaço denominado subaracnóide.

A aracnóide é constituída por dois folhetos, que em determinados pontos se afastam formando os seios venosos e as foices cerebrais (Figura 2), contribuindo para a separação entre os dois hemisférios cerebrais e entre estes e o cerebelo. O espaço subaracnóide é preenchido pelo liquor e aloja vasos sanguíneos superficiais que se ramificam internamente para irrigar ou drenar o tecido nervoso. A pia-máter é a mais fina das meninges e se encontra revestindo o SNC, acompanhando os giros e sulcos e penetrando ligeiramente no tecido neural para seguir os vasos até determinado ponto do parênquima (LENT, 2004).

Estas três estruturas, muitas vezes, podem ser invadidas por patógenos desencadeando processos inflamatórios tais como a meningite asséptica, de origem viral e a meningocócica, de origem bacteriana, que se não tratada a tempo leva a sérios danos neurológicos, podendo culminar com a morte do animal (LEVINE, 1987).

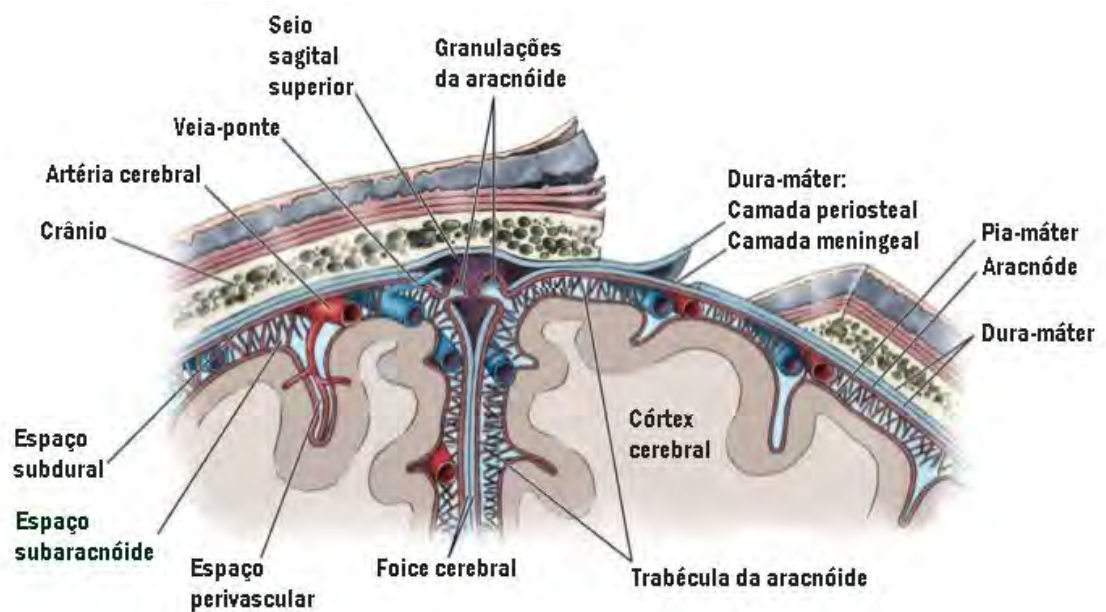


FIGURA 1 – Representação esquemática das meninges cerebrais e suas respectivas estruturas e vascularização, bem como dos espaços subdural e subaracnóide (adaptada de BLUMENFELD, 2002).

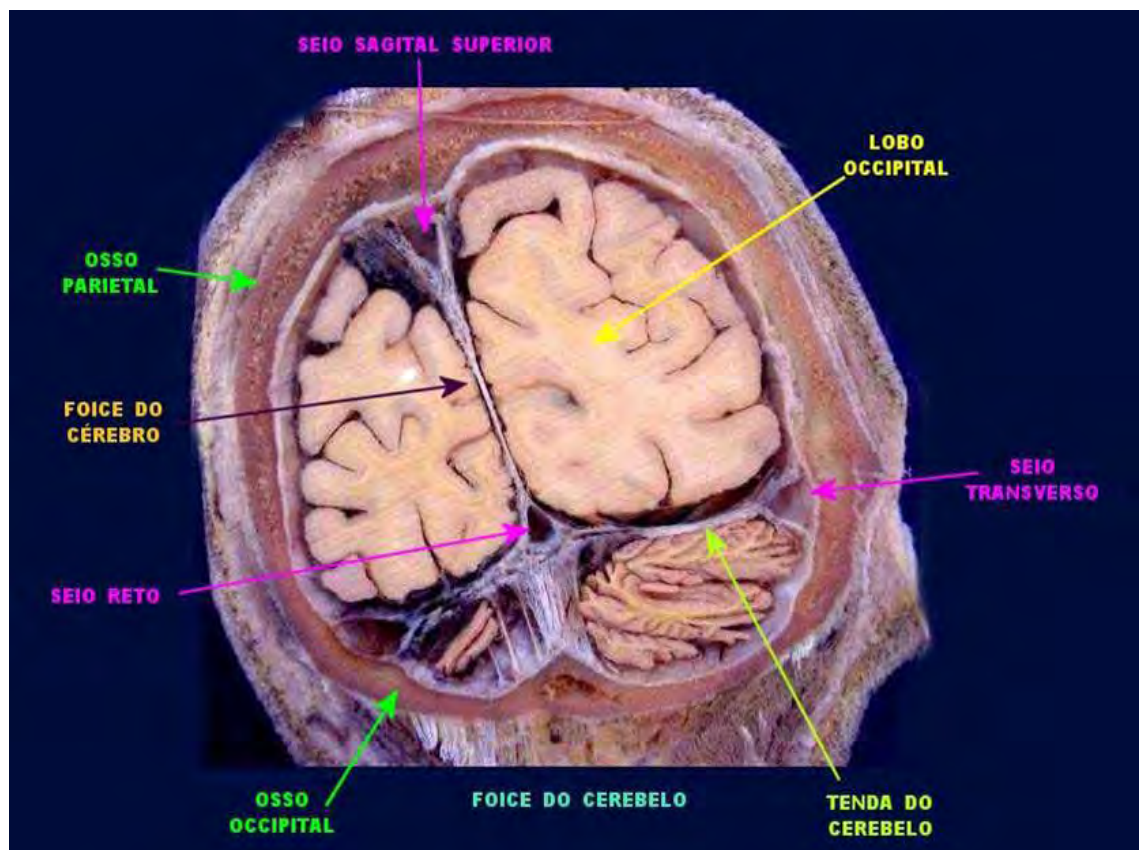


FIGURA 2 – Seios venosos e foices cerebrais formados pela separação dos dois folhetos componentes da aracnóide (MARQUES et al., 2009).

2.4 Líquido Cefalorraquidiano (Liquor)

O líquido cefalorraquidiano, também conhecido como liquor, é um líquido incolor ultra filtrado do plasma com baixa quantidade de proteínas e poucas células (DI TERLIZZI; PLATT, 2006). Sua produção se dá pelo plexo coróide (Figuras 3, 4 e 8), um enovelado de vasos sanguíneos presente nos quatro ventrículos cerebrais (Figura 3) e em menor quantidade pelas células endimárias que revestem os ventrículos (DI TERLIZZI; LENT, 2004; PLATT, 2006). O PC filtra o sangue e acrescenta algumas substâncias componentes de suas células durante a formação do liquor. Após sua síntese, o liquor flui dos ventrículos para o espaço subaracnóideal e cisternas cerebrais (Figura 4) por meio de três aberturas presentes no quarto ventrículo e subsequentemente é drenado para o sangue venoso através de invaginações da aracnóide para dentro dos seios venosos, denominadas vilosidades aracnóideas (Figuras 5 e 6) (LENT, 2004).

O liquor protege o cérebro durante flutuações na pressão sanguínea, regula o ambiente químico do SNC, excreta produtos do metabolismo neural e serve como um veículo para o transporte intracerebral (DI TERLIZZI; PLATT, 2006; LENT, 2004). Se não fosse ele, um mínimo movimento da cabeça, ou até mesmo a própria pressão dos vasos sanguíneos cerebrais que se dilatam com a pulsação sanguínea, poderiam comprimir o cérebro causando sérios danos ao SNC (LENT, 2004).

Bergman et al. (2002) salientaram a importância do liquor no diagnóstico de doenças que acometem o SNC, afirmando que na maioria dos casos este líquido permite a distinção entre doenças inflamatórias e não inflamatórias. Pacientes com doenças de ordem neurológica, tais como meningite viral, esclerose lateral amiotrófica, esclerose múltipla, tumores cerebrais e isquemia cerebral, têm revelado concentrações alteradas de MMPs no liquor e no tecido cerebral (CLARK et al., 1997; KOLB et al., 1998). A inflamação aguda das meninges desencadeia a liberação de MMPs, as quais podem ser detectadas

no liquor, aumentando a permeabilidade da BHE dos vasos superficiais do parênquima cerebral (CANDELARIO-JALIL et al., 2009).

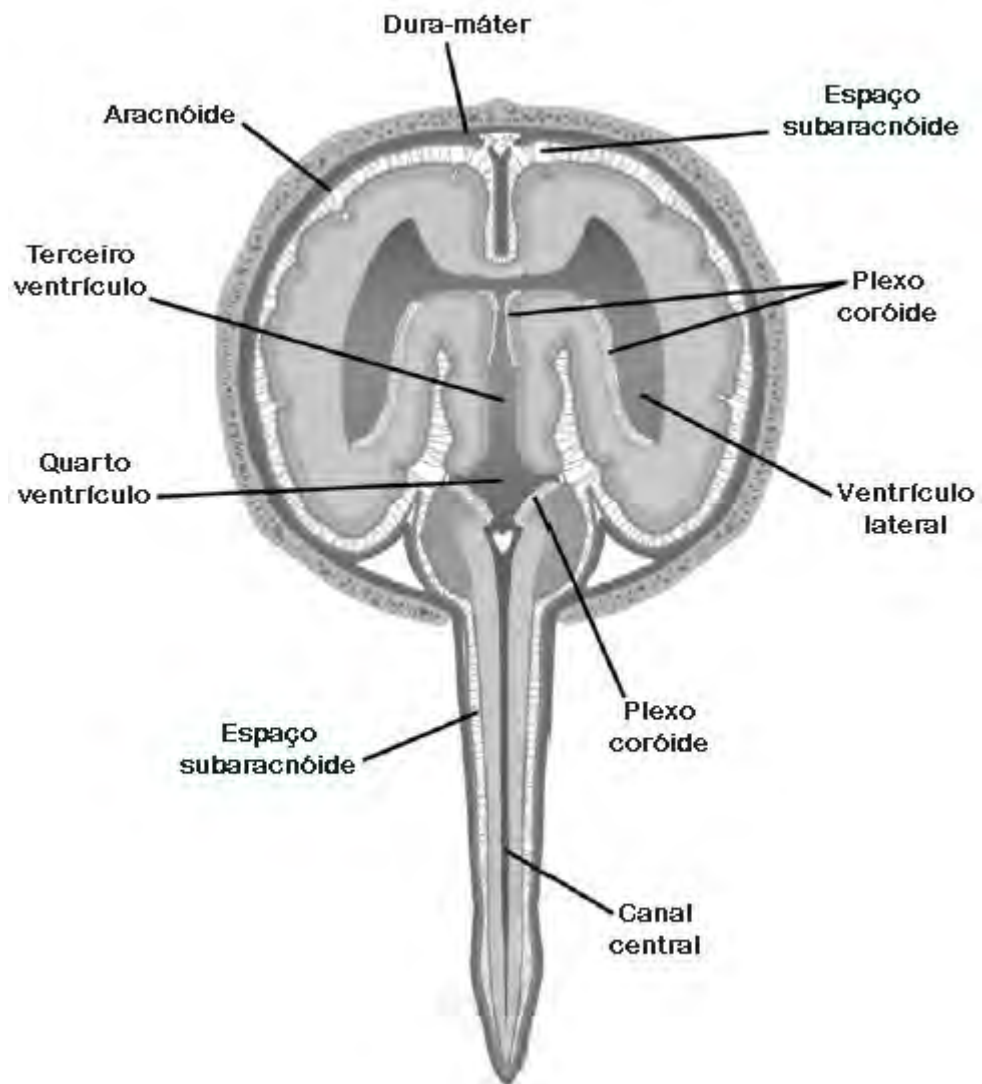


FIGURA 3 – Representação esquemática do sistema ventricular e da localização do plexo coróide (adaptada de DI TERLIZZI; PLATT, 2006).

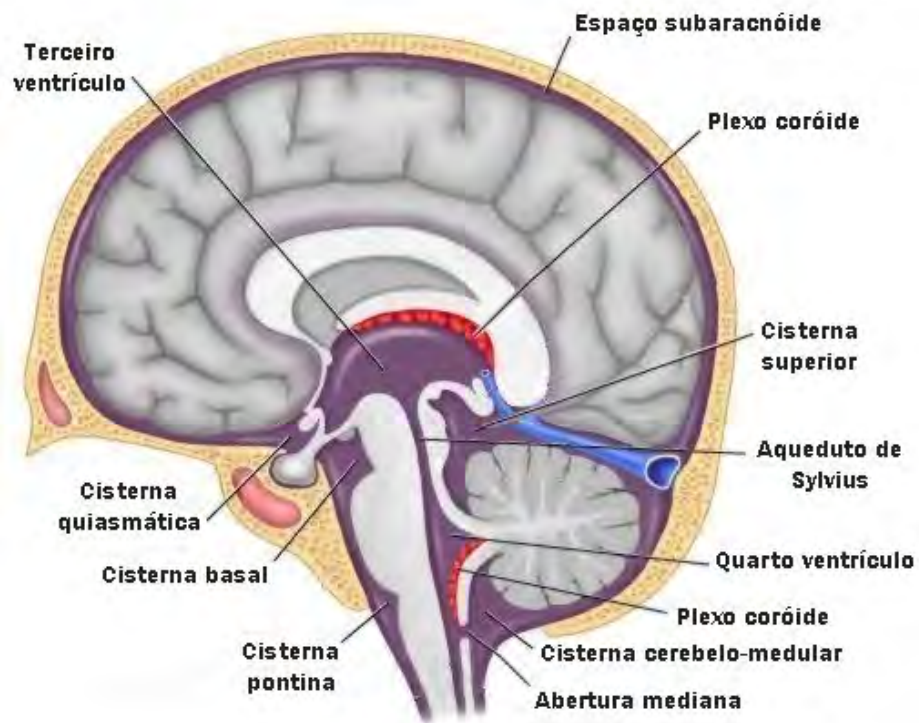


FIGURA 4 – Representação esquemática dos locais preenchidos por líquido cefalorraquidiano (ventrículos cerebrais, cisternas cerebrais e espaço subaracnóide) e da localização dos plexos coróides do III e IV ventrículos. (adaptada de UpToDate®).

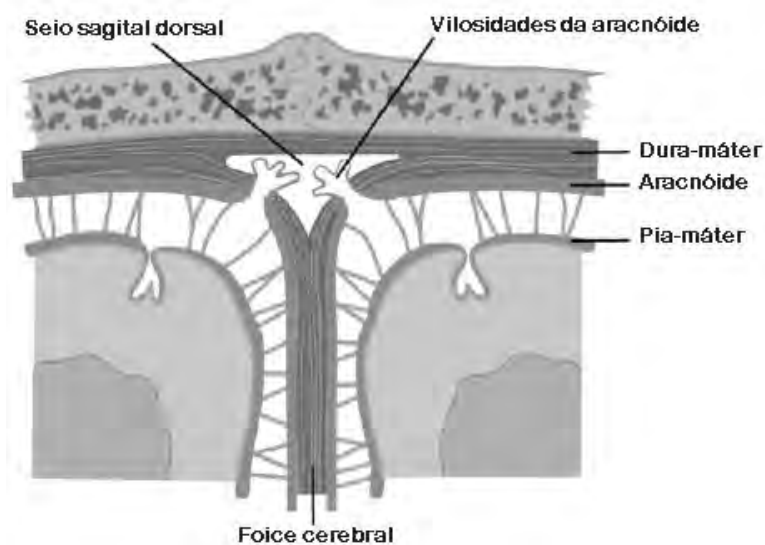


FIGURA 5 – Representação esquemática das meninges e vilosidades aracnóides (adaptada de DI TERLIZZI; PLATT, 2006).

2.5 Barreiras cerebrais

Para separar os diversos líquidos (sangue, liquor e fluido intersticial) presentes no SNC (Figura 6), bem como para selecionar as substâncias que adentram neste sistema e controlar a produção e absorção do liquor, três barreiras compõem este ambiente. São elas a hematoencefálica, a hematoliquórica e a liquor-encefálica, mais permeável e cuja função é separar o liquor do fluido intersticial.

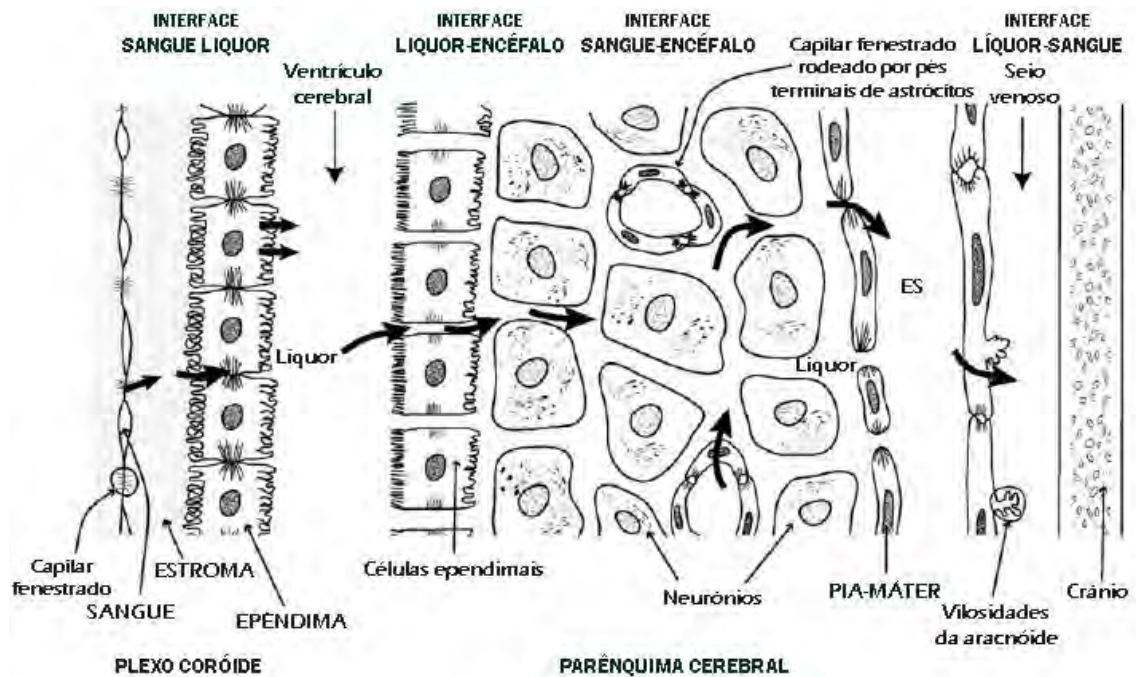


FIGURA 6 – Representação esquemática das interfaces entre sangue, liquor e encéfalo. Plexo coróide, ventrículo cerebral, parênquima cerebral, meninges, espaço subaracnóide (ES) e ossos do crânio. As setas indicam a formação do liquor no plexo coróide e fluido intersticial no capilar cerebral. ES, espaço subaracnóide (adaptada de DI TERLIZZI; PLATT, 2006).

2.5.1 Barreira hematoencefálica (BHE)

A BHE (Figura 7) é situada nos capilares sanguíneos do SNC, fazendo a separação entre o sangue e o fluido intersticial. Ela está presente em praticamente todas as áreas do parênquima encefálico, exceto em regiões circunventriculares, como a área postrema (MILLER; LESLIE, 1994). Diferente dos capilares sistêmicos que possuem fenestrações entre as células endoteliais permitindo o livre tráfego de moléculas por entre as células, os capilares cerebrais são formados por células endoteliais justapostas que formam junções oclusivas, impedindo que substâncias passem por entre elas. Desta forma, toda substância que necessite cruzar a barreira o faz por dentro das células através das proteínas transmembrana (claudinas, ocludina e moléculas de adesão juncional), sendo assim selecionadas (LENT, 2004; FURUSE et al., 1993; PAPADOPOULOS et al., 2001). Além das células endoteliais, a BHE também é constituída por pericitos, que são um tipo de célula com potencial de diferenciação e cujas funções são a produção da membrana basal que reveste o capilar, o reparo após lesões e a regulação do tônus capilar. Além da membrana basal, pés terminais de astrócitos circundam os capilares cerebrais.

A BHE limita o tráfego de leucócitos dentro do SNC (BARKER; BILLINGHAN, 1997). Estudos preliminares indicam que apenas células T ativadas são capazes de cruzar a barreira e realizar a vigilância imunológica do SNC (HICKEY, 1991; WELLER et al., 1996; WILLIAMS; HICKEY, 1995). Entretanto, quando ocorre um processo inflamatório, os componentes da barreira produzem ou expressam uma variedade de citocinas, moléculas de adesão, metaloproteinases (MMPs), serina, proteases, produtos derivados do ácido aracdônico e óxido nítrico (WEBB; MUIR, 2000) que “afrouxam” a estrutura da barreira, a qual se torna menos seletiva.

Diversos estudos têm demonstrado a ruptura da BHE tanto por células imunes do sangue em condições patológicas como pelas MMPs. Leppert et al. (2001), demonstraram que o aumento da produção de MMPs na esclerose

múltipla e na meningite bacteriana é capaz de promover a ruptura da BHE. Mais tarde, Suidan et al. (2008), em modelo experimental de vírus da encefalomielite murina de Theiler, demonstraram que a perforina de células CD8 também levam a tal alteração.

Com a ruptura da BHE, a passagem de quaisquer elementos sanguíneos fica livre, podendo ocorrer o extravasamento tanto de células imunes do sangue, como outras substâncias nocivas para o SNC ou até mesmo patógenos, desencadeando processos inflamatórios. Estudos demonstram que patógenos como *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei gambiense*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* (Grupo B), *Cryptococcus neoformans* e *Borrelia burgdorferi* (CHARLIER et al., 2005; DORAN et al., 2005; GRAB et al., 2005; KIM, 2002; NIKOLSKAIA et al., 2006; TRIPATHI et al., 2007) são capazes de cruzar a BHE e causar lesões no SNC.

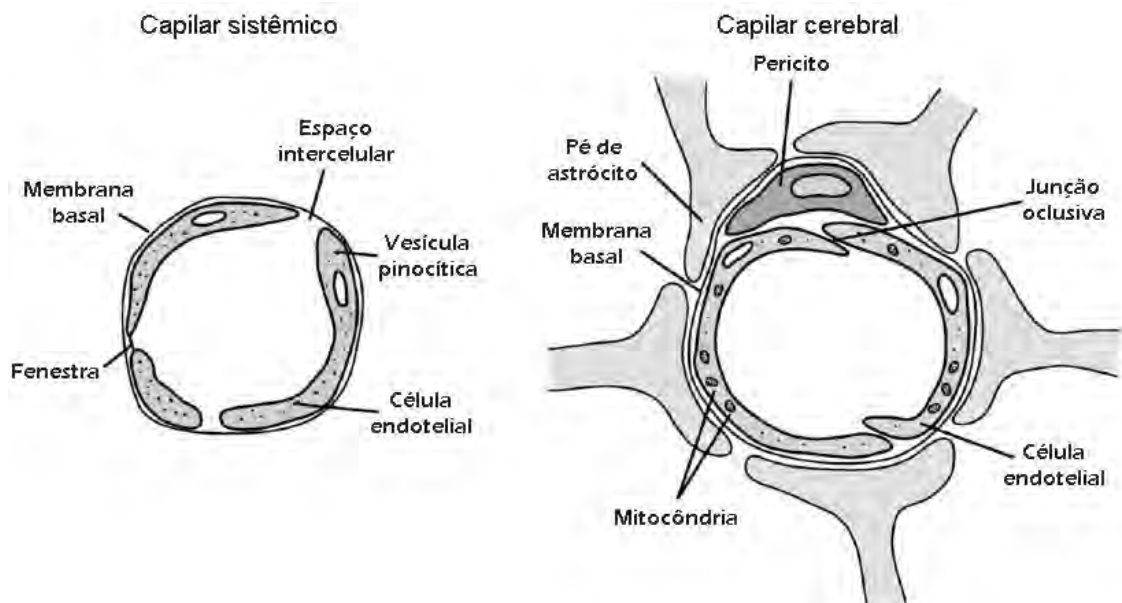


FIGURA 7 – Representação esquemática de um capilar sistêmico e da barreira hematoencefálica no capilar cerebral. (adaptada de DI TERLIZZI; PLATT, 2006).

2.5.2 Barreira hematoliquórica (BHL)

A barreira hematoliquórica existe entre o plasma e o liquor no PC, e consiste em duas camadas de células separadas por uma fina membrana basal (DI TERLIZZI; PLATT, 2006). Semelhantemente à BHE, a barreira hematoliquórica é constituída por junções oclusivas das células endoteliais, o que veda a passagem de substâncias do sangue para o liquor por meio do espaço intersticial, de modo que a única forma dessa passagem ocorrer é por meio da utilização das proteínas transmembrana (LENT, 2004; JOHANSSON et al., 2008).

O plexo coróide (Figura 8) é uma estrutura formada por dobras da pia-máter, vasos e células endoteliais modificadas, com junções oclusivas (LENT, 2004). Esta estrutura encontra-se localizada nos quatro ventrículos cerebrais e é responsável pela produção do liquor. Além deste importante papel, diversas evidências sugerem sua importância na sobrevivência e manutenção do estado bioquímico e celular do SNC em condições normais ou patológicas. (EMERICH et al., 2005; LENT, 2004). Algumas destas funções elucidadas por Emerich et al. (2005) são a ajuda ou impedimento da biodistribuição de drogas e componentes tóxicos por enzimas, e a mediação de interações e/ou sinalização entre o sistema imune periférico e o cérebro por células linfóides.

Apesar da seletividade da barreira hematoliquórica, algumas bactérias como o *Streptococcus suis* e a *Neisseria meningitidis*, protozoários como o *Trypanosoma brucei* e vírus como o SIDA, vírus da caxumba e da leucemia (HTLV-1), possuem tropismo pelo PC e mecanismos que permitem a sua invasão, induzindo a uma inflamação local (LEVINE, 1987; STRAZIELLE; GHERSI-EGEA, 2000; TENENBAUM et al., 2009)

Wu et al. (2000) pesquisando a invasão do SNC por *Mycobacterium avium*, sugeriram que tal microorganismo penetre no SNC dentro de células como monócitos e neutrófilos, através do PC, com subsequente disseminação para o sistema ventricular e dali para o liquor, meninges e espaço

subaracnóide. Mais tarde também, Darsaud et al. (2003) demonstraram a presença de *Trypanosoma brucei brucei* e algumas células inflamatórias no PC em modelo experimental com ratos. Segundo os autores, a partir daí, a evolução da doença no SNC continua pela invasão do parênquima cerebral e em estágios tardios ocorre também dano extensivo da BHE.

Pron et al. (1997) demonstraram a entrada da bactéria *Neisseria meningitidis* pelas células endoteliais do PC, a partir do qual ocorre disseminação para o liquor. Concordando com seus achados, Petit e Adkins (2005) demonstraram que o PC, por apresentar moléculas de adesão para linfócitos T CD3+, é também a via de entrada para estas células no SNC quando o sistema imune periférico é ativado. Do PC, estes linfócitos iriam para o tecido nervoso adjacente ou seriam disseminados pelo liquor para o encéfalo. Assim, o PC também representaria um reservatório de células T para o SNC. Entretanto, este fato não exclui a migração de células T ativadas pela BHE.

Outro estudo, realizado por Ryan et al. (2005), mostrou que o vírus da imunodeficiência felina (FIV) leva a uma infiltração leucocitária perivascular no PC, sendo esta a região com lesão mais proeminente no cérebro de gatos inoculados intraperitonealmente. Os autores ainda destacaram o tráfego de linfócitos T e B pela BHE e BHL no início da infecção, e que o transporte de vírus por meio das células epiteliais do PC fornece um acesso direto do vírus ao liquor, permitindo que ele se espalhe para as células endimárias e tecido cerebral adjacente. Desta forma, deve haver o comprometimento das barreiras hematoencefálica e hematoliquórica, facilitando a migração de células mononucleares para o cérebro.

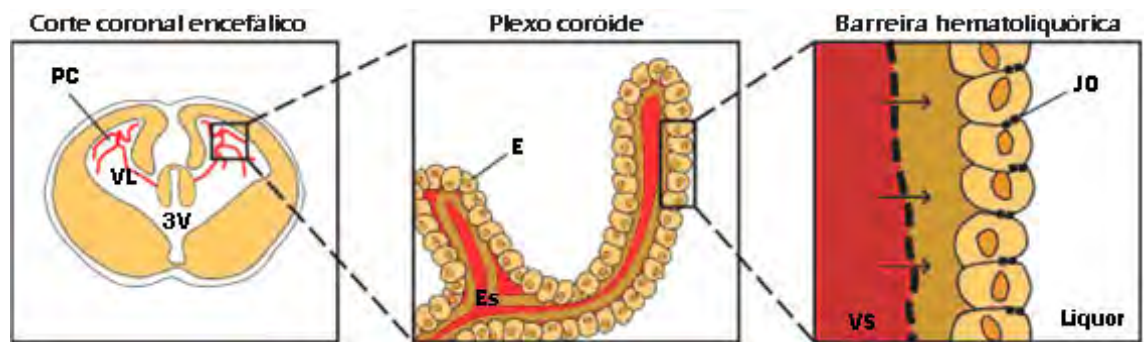


FIGURA 8 – Representação esquemática do plexo coróide e barreira hematoquórica. PC, plexo coróide; VL, ventrículo lateral; 3V, terceiro ventrículo; E, células epiteliais; Es, estroma; VS, vasos sanguíneos; JO, junções oclusivas (adaptada de JOHANSSON et al., 2008).

2.6 Metaloproteinases da Matriz (MMPs)

As MMPs são uma família de endopeptidases zinco-dependentes capazes de clivar um ou diversos constituintes da matriz extracelular (MEC) bem como componentes não pertencentes a ela (MASSOVA et al., 1998). Elas encontram-se divididas em quatro principais classes de acordo com o substrato que degradam (Tabela 1). As gelatinases A e B, MMP-2 e MMP-9 respectivamente, são assim denominadas devido à sua capacidade de degradar gelatina (ROSEMBERG, 2002b).

Tabela 1 – Principais classes de metaloproteinases e respectivos substratos (adaptada de ROSEMBERG, 2002b)

Classes	MMP	Substrato
I. Colagenases	Colagenase-1 (MMP-1)	Colágenos I, II, III, VII, VIII, X, agregan, serpinas
II. Estromelisinases	Estromelisinase-1 (MMP-3)	Colágenos IV, V, IX, X, fibronectina, elastina, laminina, agregan, nidogênio, fibrilina, osteonectina
	Matrilisinase (MMP-7)	Elastina, fibronectina, laminina, nidogênio, colágeno IV, tenascina, versicano
III. Gelatinases	Gelatinase A (72 kDa) (MMP-2)	Colágenos I, II, V, VII, X, fibronectina, tenascina, fibrilina, osteonectina
	Gelatinase B (92 kDa) (MMP-9)	Colágenos IV, V, VII, X, XIV, elastina, fibrilina, osteonectina
IV. Tipo-membrana	MT1-MMP (MMP-14)	Colágenos I, II, III, IV, laminina, agregan, tenascina, nidogênio, fibrilina, fibrina

A organização básica das MMPs é feita em três estruturas: um pró-peptídeo amino-terminal, um domínio catalítico e um domínio “hemopexin-like” na extremidade carboxi-terminal (Figura 9) (MASSOVA et al., 1998; ROSEMBERG, 2002b). O N-terminal contém um resíduo de cisteína quelando os íons zinco presentes no centro catalítico (Figura 10), mantendo-as inativas sob a forma de zimogênios (próMMP-2 – 72 kDa e próMMP-9 – 92 kDa) e a extremidade C-terminal é o sítio de ligação específica com o substrato (LEPERT et al., 2001; YOUNG et al., 2001). Uma vez que a ligação com a cisteína é quebrada, há uma ativação intermediária de tais proteases, a qual é completada com a clivagem autocatalítica do pró-peptídeo do núcleo da proteína, tornando a enzima completamente ativada, com conseqüente perda de peso molecular (MMP-2 – 66 kDa e MMP-9 – 86 kDa) (LEPERT et al., 2001; YOUNG et al., 2001) (Figura 10).

A principal função biológica das MMPs consiste na modulação da interação das células da matriz extracelular. Elas são responsáveis pela hidrólise de seus componentes, bem como pelo controle dos sinais suscitados por suas moléculas, que regulam a proliferação, diferenciação e morte celular, desta forma regulando a integridade e estrutura da MEC (MANDAL et al., 2003). Assim, a ação destas proteinases deve ser estritamente regulada, pois uma proteólise descontrolada contribui para o desenvolvimento anormal e para a degeneração em muitas condições patológicas, caracterizadas tanto pela excessiva degradação como pela falta de degradação dos componentes da MEC (MASSOVA et al., 1998; ROSEMBERG, 2002b).



FIGURA 9 – Estrutura das gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9) (adaptado de MASSOVA et al., 1998).

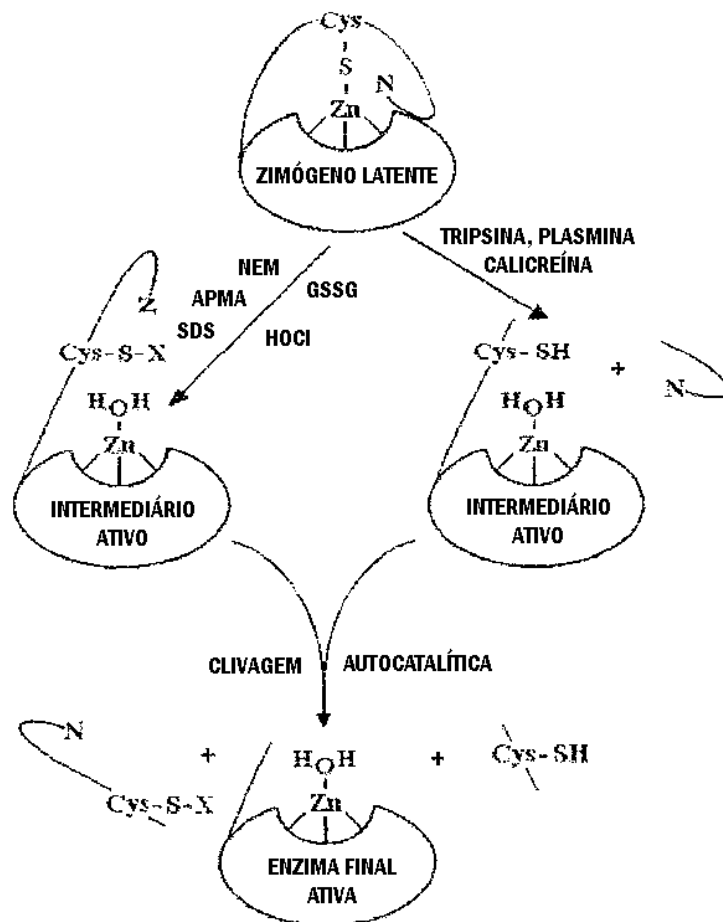


FIGURA 10 – Ativação das metaloproteinases-2 e -9 pela quebra do resíduo cisteína e clivagem autocatalítica do pró-peptídeo (adaptado de CHAKRABORTI et al., 2003).

A regulação da atividade destas proteases é feita em três níveis. Primeiramente elas são reguladas a nível transcricional, sendo muitas delas não constitutivas, transcritas somente após ativação celular (YOUNG et al., 2001). Esta ativação pode ser por meio de citocinas, fatores de crescimento, neuro-hormônios, estresse oxidativo, interações célula-matriz e célula-célula (COX et al., 2002; NAGASE; WOESSNER, 1999). Secundariamente, são reguladas por meio da ativação dos zimogênios por meio da quebra do resíduo de cisteína que fica situada no domínio pró-peptídeo ligando o íon zinco presente no sítio catalítico (YOUNG et al., 2001). Os fatores de ativação incluem proteinases do tecido ou do plasma, ou proteinases bacterianas oportunistas, plasmina e radicais livres, que rompem a ligação entre a cisteína e o zinco e depois removem o domínio pró-peptídeo para a ativação completa (NAGASE; WOESSNER, 1999; ROSEMBERG, 2002a). Por fim, o controle da atividade se dá pela interação de MMPs ativas com inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs), que as inativam se ligando ao seu sítio catalítico (YOUNG et al., 2001). O TIMP-1 é uma molécula de 28 kDa que se liga à MMP-9 e o TIMP-2, de 21 kDa, se adere à MMP-2, sendo que em baixas concentrações facilita sua ativação e em altas concentrações é inibitório (ROSEMBERG, 2002b), visto que para a ativação da proMMP-2 é necessária à formação do complexo trimolecular metaloproteinase tipo membrana-1 (MT1-MMP), TIMP-2 e proMMP-2. Ainda considerando a ação dos TIMPs, o TIMP-3 reduz a ativação da MT1-MMP, desta forma afetando a ativação da MMP-2 (CANDELARIO-JALIL, et al., 2009).

Existem amplas evidências do papel das MMPs em condições tanto normais quanto patológicas, incluindo embriogênese, reparo de feridas, inflamação, artrite e neoplasias (MASSOVA et al., 1998). Leib et al. (2000) e Khuth et al. (2001) associaram a produção de MMPs com lesões da BHE em modelos experimentais de meningite bacteriana, e em infecções do SNC por morbilivírus. Posteriormente, em estudos experimentais com camundongos, também foi demonstrado que a MMP-9 facilita a entrada do vírus do Nilo

Ocidental no encéfalo, aumentando a permeabilidade da BHE (WANG et al., 2008).

O epitélio do PC do IV ventrículo, quando em cultura, secreta MMPs. Esta secreção “in vivo” pode facilitar a migração de células inflamatórias pelo estroma e através do epitélio. Elevados níveis de MMPs nesta região também podem modificar a permeabilidade capilar e facilitar a migração de células T (PETITO; ADKINS, 2005).

Fujimura et al. (2006), ao realizarem a técnica de imunistoquímica para pesquisa de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 em malformações cavernosas do PC, descreveram que tais MMPs e o inibidor tecidual eram fortemente expressos em células endoteliais, mas não eram evidentes em estruturas intersticiais. Informações como estas e as de Petito e Adkins (2005) suportam a teoria de que o PC é uma estrutura em que ocorre a ação de tais proteases.

Leppert et al. (2000) relataram que em especial as MMPs-9 e -8 se encontram aumentadas no líquor de crianças com meningite bacteriana e que não há alteração das MMPs-2 e -3. Um ano mais tarde, Leppert et al. (2001) relataram que nestes pacientes há um aumento na produção de MMPs liberadas por células imunes derivadas do sangue, bem como por células do parênquima cerebral. Estas enzimas seriam, portanto, consideradas efetoras da abertura da barreira hematoencefálica e conseqüentemente da invasão do parênquima cerebral por células imunes, culminando no processo inflamatório.

Yong et al. (2001) verificaram que pacientes com esclerose múltipla possuem aumento de mRNA da MMP-9 em leucócitos, e elevados níveis de MMP-9 no soro. De acordo com os autores, leucócitos liberam as MMPs, facilitado sua transferência ao SNC pela BHE, e também ajustam a liberação de MMPs por astrócitos e pericitos (LEPPERT et al., 1995; ROSEMBERG, 2002b). As células endoteliais possuem principalmente MMP-9, também produzidas por pericitos, enquanto os pés terminais dos astrócitos que recobrem as células endoteliais possuem MMP-2 e MT1-MMP (CANDELARIO-JALIL, et al., 2009) constitutivas. Este padrão de MMPs, segundo os autores, facilita a abertura da BHE durante processos inflamatórios.

Durante estado ativado, as células T circulantes no sangue secretam MMP-9 e podem cruzar a BHE (ROSEMBERG, 2002b). Para romper a BHE, as MMPs degradam os componentes da lâmina basal (ex. heparan-sulfato, laminina, fibronectina e colágeno tipo IV) das células endoteliais com junções oclusivas (ROSEMBERG, 2002b). As gelatinases, em especial, possuem regiões de ligação com fibronectina, que as permitem interagir com macromoléculas na lâmina basal (ROSEMBERG, 2002b). Desta forma, há um afrouxamento das junções endoteliais, permitindo a passagem tanto de patógenos como células de defesa e outros componentes tóxicos para o SNC. No SNC, a elevação no conteúdo de MMPs e a indiscriminada localização das mesmas perpetuam a resposta inflamatória (YONG et al., 2001).

Durante uma resposta inflamatória em órgãos periféricos, as citocinas induzem a produção de MMPs, que são os principais componentes da cascata enzimática responsáveis pela degradação de componentes da MEC como o colágeno, proteoglicanos e laminina. A maioria das MMPs é expressa apenas quando estimuladas por citocinas, eicosanóides, fatores de crescimento e componentes de patógenos infecciosos, entre outros (LEPPERT et al., 1995; LEPPERT et al., 2001). Quanto ao SNC, Gottschall e Deb (1996) verificaram que os astrócitos estimulados por $IL1\beta$, $TNF-\alpha$ e lipopolissacarídeos (LPS) “in vitro” produzem MMP-2, MMP-9 e MMP-3, enquanto a microglia produzia MMP-9. Em doenças neurodegenerativas ou após lesão encefálica, astrócitos e microglia são ativados para produzir mediadores inflamatórios, principalmente citocinas. De acordo com Leppert et al. (2001), existem indícios de que tanto células imunes derivadas do sangue quanto células do parênquima cerebral liberam MMPs. Nos processos patológicos do encéfalo as fontes celulares de MMPs incluem leucócitos infiltrativos (linfócitos e macrófagos) e células intrínsecas do SNC (microglia perivascular e parenquimal, astrócitos e eventualmente neurônios (YONG et al., 2001). Assim, os astrócitos, os neurônios, a oligodendroglia, as células endoteliais, os pericitos e a microglia produzem MMPs, mas o tipo de MMP e o estímulo que as induz são diferentes para os vários tipos celulares (ROSEMBERG, 2002b).

Portanto, apesar de suas funções biológicas tais como desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção tecidual e remodelamento, indispensáveis para o bom funcionamento do organismo, as MMPs geralmente não são encontradas, ou estão presentes em quantidades muito pequenas no SNC normal (NAGASE; WOESSNER JUNIOR, 1999). Apesar da MMP-2 ser detectável no liquor de cães clinicamente saudáveis, a MMP-9 não é detectável (BERGMAN et al., 2002) e o aumento destas proteínas tem sido relatado em cães em vários casos de desordens neurológicas após injúria traumática (LEVINE et al., 2006) e devido a neoplasias do SNC (TURBA et al., 2007).

O presente estudo teve por objetivo verificar a presença das MMPs-2 e -9 no plexo coróide e no liquor de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, utilizando o método zimografia. Desta forma, foi testada a hipótese de que a presença das MMPs-2 e -9 no plexo coróide e/ou no líquido de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* desencadeia a migração de células inflamatórias para o encéfalo ao aumentarem a permeabilidade da BHL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 41 cães com sorologia positiva para LV, encaminhados ao Hospital Veterinário do Curso de Medicina Veterinária FO-UNESP-Câmpus de Araçatuba e ao Centro de Controle de Zoonozes (CCZ) do município de Araçatuba. O exame sorológico foi realizado pela técnica de ELISA indireto, realizada no Laboratório de Imunologia do Curso de Medicina Veterinária da FO-UNESP-Araçatuba. Para compor o Grupo controle foram utilizados 10 cães com lesões traumáticas ou doença crônica sem comprometimento do SNC previamente avaliados pelo atendimento clínico-cirúrgico do Hospital Veterinário, com sorologia negativa para LV, encaminhados ao serviço de Patologia após indicação de sacrifício. Todos os cães foram avaliados sorologicamente para toxoplasmose e neosporose por meio de reação de imunofluorescência (RIF) em exames realizados pelo departamento de Patologia Veterinária da FCAV-UNESP-Jaboticabal e as amostras com titulação acima de 1:50 para toxoplasmose e 1:54 para neosporose não foram incluídos neste estudo.

3.2 Delineamento Experimental

Foram constituídos dois Grupos conforme o diagnóstico sorológico: o Grupo 1 (G1) formado por cães com sorologia positiva para LV, com ou sem evidência clínica da doença e sem sintomas de comprometimento neurológico, e o Grupo 2 (G2) constituído por animais soronegativos cuja morte não estivesse relacionada ao comprometimento do SNC. Todos os animais foram

necropsiados no Serviço de Patologia do Curso de Medicina Veterinária da FO-UNESP- Araçatuba.

Sempre que possível, foram realizadas no mesmo animal, colheitas de liquor e plexo coróide (PC), distribuídas da seguinte forma: 31 amostras de liquor e 19 de PC para os animais do G1; e 10 amostras de liquor e 11 de PC para os animais do G2, totalizando 71 amostras.

3.3 Coleta de material do SNC

Os cães foram sacrificados segundo a Resolução nº 714 de 20 de junho de 2002, do Conselho de Ética e Experimentação Animal, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (*Hypnol 3%) e receberam posteriormente uma ampola de *Cloreto de Potássio (19,1%) por via intravenosa. Antes da administração de cloreto de potássio, foi colhida a amostra de liquor por punção da cisterna magna.

Os PCs foram retirados durante a realização do exame necroscópico, após a administração de pentobarbital sódico e verificação da morte do animal. Os mesmos foram congelados a -80°C para posterior processamento das amostras e detecção das MMPs por zimografia.

* Hypnol, Fontoveter[®], Itapira-SP, Brasil

* Cloreto de Potássio, Darrow[®], Rio de Janeiro-RJ, Brasil

3.4 Processamento das amostras de liquor e plexo coróide

As amostras de liquor foram centrifugadas a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente o sobrenadante foi dividido em alíquotas de 50µL, que foram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

Para a obtenção do sobrenadante do homogenado dos PCs as amostras foram maceradas em um gral de porcelana com 500µL de tampão de lise (50mM Tris-HCl pH 7,6; 150mM NaCl; 5mM CaCl₂, 0,05% (p/v) *Brij-35, água destilada - qsp 1000ml) acrescidos de 0,5µL de inibidor de protease PMSF 10% (fluoreto de fenil metil sulfonil). Após este procedimento o homogenado foi centrifugado a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi distribuído em alíquotas de 50µL, as quais foram armazenadas a -20°C para análises posteriores. Todos os procedimentos foram realizados mantendo os recipientes imersos em gelo.

3.5 Quantificação de proteínas pelo método colorimétrico Ácido Bicinconínico (BCA)

A proteína total das amostras de liquor e do sobrenadante do PC foi quantificada pelo método *BCA, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, com a finalidade de padronizar as quantidades de proteínas utilizadas na detecção enzimática nos géis de zimograma. A leitura foi feita em espectrofotômetro com filtro 560nm, utilizando-se albumina sérica bovina como padrão de referência, nas concentrações de 200, 400, 600, 800 e 1000µg/µL. Tanto os padrões como as amostras foram dosados em duplicatas.

* Brij-35, Sigma®, St. Louis- MO, EUA

* BCA Protein Assay Kit, Pierce®, Rockford-IL, EUA

A qualidade do ensaio foi medida pelo coeficiente de correlação da curva, sendo considerada excelente quando os valores alcançaram entre 0,9 e 1. Os resultados, obtidos em densidade óptica, foram posteriormente convertidos em microgramas/microlitro.

3.6 Padronização das metaloproteinases recombinantes

MMPs-2 e -9 (Chemicon[®]) recombinantes humanas foram ativadas segundo o protocolo do fabricante e incluídas no gel de zimograma para controle positivo da reação. Para obter a concentração ideal das MMPs recombinantes, com boa visualização das bandas gelanólíticas, foram realizados previamente testes com diluições seriadas. Para cada recombinante foram testadas diluições decrescentes a cada 0,5 ng a partir de 30 ng. A melhor diluição encontrada para a MMP-2 foi 4,5ng/20 μ L e para a MMP-9, 0,5ng/20 μ L.

3.7 Verificação de atividade enzimática e análise semi-quantitativa das MMPs-2 e -9 através de zimografia

As zimografias foram realizadas segundo o método descrito por Kleiner e Stetler-Stevenson (1994), utilizando-se o liquor e homogenado dos PCs dos cães. As amostras foram homogeneizadas com tampão de dissociação (125mM Tris-HCl, pH 6,8, 20% (v/v) Glicerol, 4% (p/v) SDS, 0,5% (p/v) Azul de Bromofenol) por cinco minutos a temperatura ambiente, e submetidas a eletroforese utilizando gel de poliacrilamida 10% contendo 0,01% de *gelatina, a 125V e 40mA, em tampão de corrida Tris-Glicina, pH 8,3, a 4^o C.

O gel foi lavado em solução Triton X-100 2,5% (v/v), durante 30 minutos a temperatura ambiente, para remoção do SDS (Sódio Dodecil Sulfato).

* G8150-100G, Sigma[®], St Louis-MO, EUA

Posteriormente a lavagem, o gel foi incubado em tampão de ativação enzimática (50mM Tris, 200mM NaCl, 5mM CaCl₂ e 0,2% (p/v) Brij-35, pH 7,5) durante 20 horas a 37°C. Após a incubação, o gel foi corado com *Coomassie Blue (R250) 0,5% (p/v) e descorado em solução descorante (45% metanol, 10% ácido acético glacial e 45% água) durante 45 minutos. Como controle da presença das gelatinases, foram utilizadas MMPs recombinantes.

O gel foi digitalizado em *digitalizador com imagem de 200dpi e 24 bits e as bandas foram analisadas por densitometria para a comparação entre as bandas gelatinolíticas dos Grupos 1 e 2 utilizando o *software* *ImageJ 1,37v, de domínio público. Foram conferidos valores numéricos em unidade arbitrária às densidades e os resultados foram posteriormente analisados estatisticamente utilizando o *software* GraphPad Prism 5v.

* Coomassie Brilliant Blue R250 Dye, Pierce[®], Rockford-IL, EUA

* Multifuncional All-in-One F4180, HP[®], Brasil

* ImageJ 1,37v, Wayne Rasband - National Institutes of Health, USA, rsb.info.nih.gov/ij

4 RESULTADOS

4.1 Plexo coróide

No PC foram detectadas apenas a próMMP-2 e a próMMP-9, conforme ilustrado na Figura 11. Os respectivos percentuais de amostras de PC contendo a próMMP-2 e a próMMP-9 encontram-se representados na Tabela 2.

A análise estatística da atividade proteolítica não mostrou diferença ($p > 0,05$) entre G1 e G2 tanto para a próMMP-2 pelo teste *t de Student* ($p = 0,1042$) quanto para a próMMP-9 pelo teste *Mann Whitney* ($p = 0,4910$). Os valores médios e respectivos desvios padrões da atividade proteolítica das pró formas das MMPs-2 e -9 encontram-se apresentados na Figura 12.

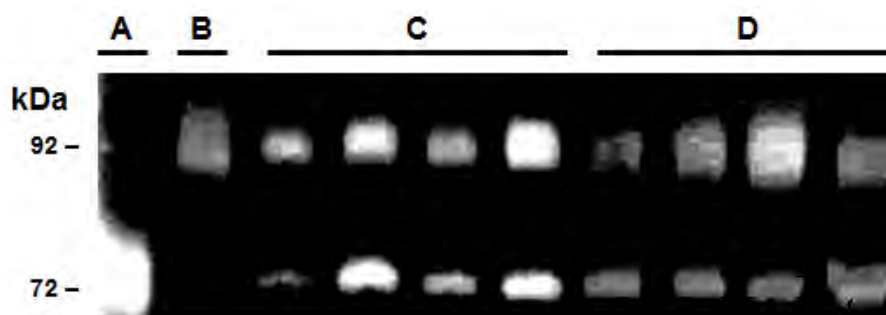


FIGURA 11 – Amostras representativas de zimogramas dos plexos coróides de cães. Bandas gelatinolíticas equivalentes à próMMP-2 (72 kDa) e próMMP-9 (92 kDa). A: recombinante MMP-2. B: recombinante MMP-9. C: Grupo 1, cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral. D: Grupo 2, cães sorologicamente negativos para leishmaniose visceral.

Tabela 2 – Percentual de amostras de plexo coróide contendo próMMP-2 e próMMP-9

	G1 %	G2 %
PróMMP-2	94,7	100
PróMMP-9	89,5	100

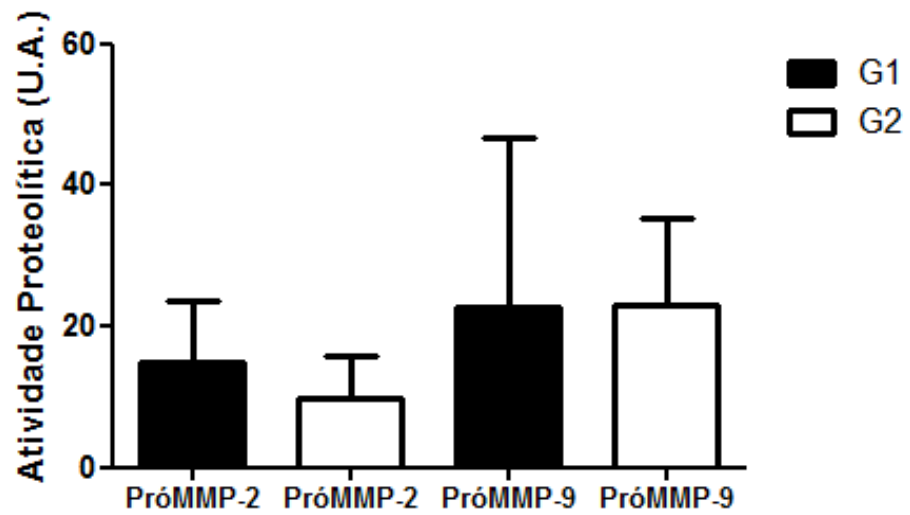


FIGURA 12 – Atividade proteolítica das pró-formas das MMPs-2 e -9 no plexo coróide de cães. Em unidade arbitrária (U.A.). As colunas representam valores médios (\pm desvio padrão) das unidades de densidade óptica inversas das bandas gelanólíticas. G1: Grupo 1, cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral. G2: Grupo 2, cães sorologicamente negativos para leishmaniose visceral.

4.2 Líquor

Os géis de zimograma do líquido evidenciaram a presença das formas pró e ativa das MMPs-2 e -9, conforme demonstrado na Figura 13. Os respectivos percentuais de amostras de líquido contendo formas ativas e inativas das MMPs-2 e -9 encontram-se representados na Tabela 3.

Quando analisada a atividade proteolítica da próMMP-2 e da MMP-2, os Grupos positivos diferiram significativamente ($p < 0,05$) dos negativos, com maior atividade nas amostras do G2 pelo teste *t de Student* ($p = 0,0002$) e *Mann Whitney* ($p = 0,0065$), respectivamente, conforme se observa na Figura 14. Quanto à densidade das bandas da próMMP-9 e da MMP-9, um aumento significativo ($p < 0,05$) foi observado no Grupo positivo em relação ao Grupo negativo pelo teste *Wilcoxon* ($p = 0,0078$) e ($p = 0,0039$), respectivamente, conforme ilustrado na Figura 15.

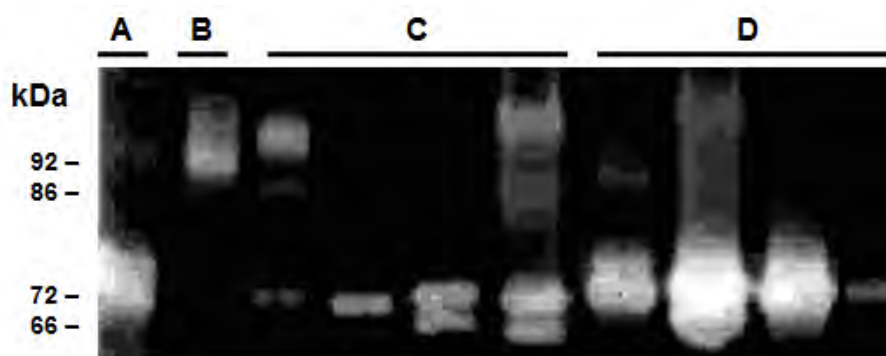


FIGURA 13 – Amostras representativas de zimogramas dos liquors de cães. Bandas gelanólíticas equivalentes à próMMP-2 (72 kDa) e MMP-2 (66 kDa) e à próMMP-9 (92 kDa) e MMP-9 (86 kDa). A: recombinante MMP-2. B: recombinante MMP-9. C: Grupo 1, cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral. D: Grupo 2, cães sorologicamente negativos para leishmaniose visceral.

Tabela 3 – Percentual de amostras de liquor contendo formas ativas e inativas da MMP-2 e da MMP-9

	G1%	G2%
PróMMP-2	100	100
MMP-2	12,9	60
PróMMP-9	25,8	0
MMP-9	29	0

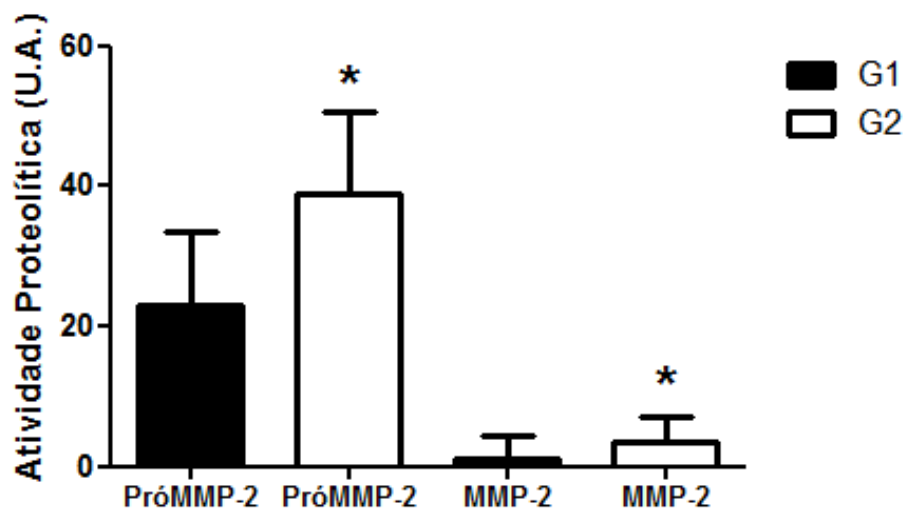


FIGURA 14 – Atividade proteolítica das formas pró e ativa da MMP-2 no liquor de cães. Em unidade arbitrária (U.A.). As colunas representam valores médios (\pm desvio padrão) das unidades de densidade óptica inversas das bandas gelanólíticas. G1: Grupo 1, cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral. G2: Grupo 2, cães sorologicamente negativos para leishmaniose visceral.

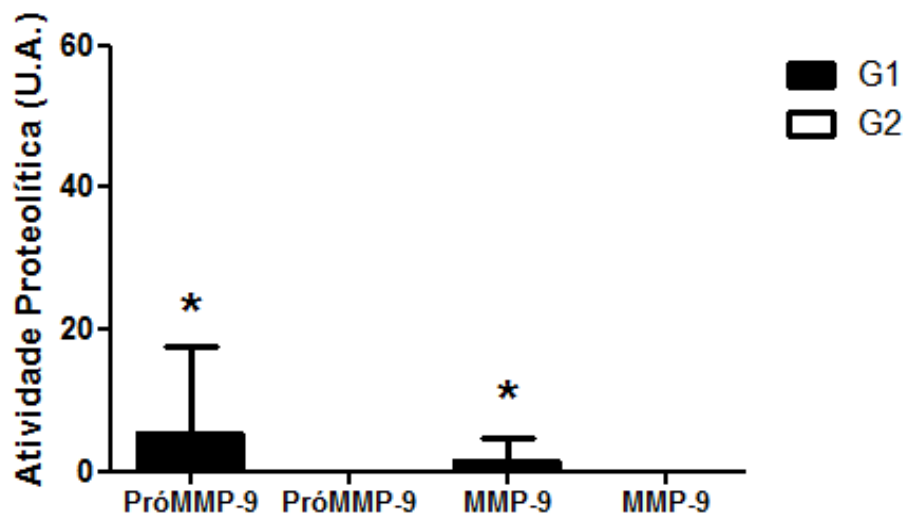


FIGURA 15 – Atividade proteolítica das formas pró e ativa da MMP-9 no liquor de cães. Em unidade arbitrária (U.A.). As colunas representam valores médios (\pm desvio padrão) das unidades de densidade óptica inversas das bandas gelanólíticas. G1: Grupo 1, cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral. G2: Grupo 2, cães sorologicamente negativos para leishmaniose visceral.

5 DISCUSSÃO

A zimografia, utilizada como método de detecção das MMPs-2 e -9 no presente estudo foi satisfatória para a visualização das bandas. Os géis tiveram boa marcação, permitindo uma visualização bem definida até mesmo das formas pró e ativas das MMPs.

Apesar de tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 serem gelatinases, portanto degradadoras do mesmo substrato, as análises revelaram diferenças nos padrões de detecção de ambas. No PC, apenas formas inativas das MMPs (próMMP-2 e próMMP-9) foram detectadas e não houve diferença entre a atividade enzimática das pró-formas encontradas nos cães sorologicamente positivos e nos cães do Grupo controle. Melo *et al.* (2009a; b) descrevem alterações no PC dos cães com LV, entre elas, a presença de infiltrado inflamatório, o que justificaria a detecção das próMMPs, pois as células inflamatórias produzem MMPs constitutivamente (KORPOS *et al.*, 2009). Poucos estudos avaliaram a presença de próMMPs e MMPs no PC, o que torna difícil justificar a presença destas proteínas no PC dos animais sadios, a menos que as próMMPs-2 e -9 também sejam constitutiva no PC, ou que elas tenham ficado retidas durante a filtração do soro para a produção do liquor.

No presente estudo, o PC não se mostrou relevante na produção de formas ativas das MMPs-2 e -9. Em um estudo “*in vitro*” realizado com células epiteliais do PC de suínos, Zeni *et al.* (2007) descreveram que a estimulação destas células pelo TNF- α diminui a expressão da MMP-9 e aumenta a expressão do TIMP-1. Desta forma, a produção de uma citocina pró-inflamatória resulta na produção de fatores moduladores como a TIMP-1. Cães infectados por *L. infantum* produzem TNF- α (PANARO *et al.*, 2009; PINELLI *et al.*, 1994), portanto a produção de TIMP nestes animais também deve estar aumentada, ocasionando a não detecção das formas ativas das MMPs-2 e -9 no PC destes cães.

Diferente de Bergman *et al.* (2002) que relataram em cães normais apenas a próMMP-2 no liquor, em nossos resultados a forma ativa da MMP-2 foi detectada tanto no liquor de animais positivos (G1) quanto de animais negativos (G2) para LV, sendo que os cães do G2 apresentaram maior quantidade da enzima. A detecção maior nos cães negativos pode ser explicada por diferenças no protocolo de preparo do gel, uma vez que Bergman *et al.* (2002) utilizaram 1,5% de gelatina no gel e no presente estudo foi utilizado 0,01% aumentando a sensibilidade para a enzima. Os próprios autores comentaram a detecção de bandas fracas e inconstantes na região correspondente ao peso padrão de 62 kD, que não foram considerados como padrão de normalidade.

Por outro lado, estudos realizados em outros modelos de inflamação relataram a ação reguladora do TNF- α sobre a produção e ativação de MMPs. Mun-Bryce *et al.* (2002) após induzirem neuroinflamação por LPS em ratos, notaram um aumento inicial de mRNA da MMP-2 precedendo o aumento de mRNA do TNF- α , sendo que após a elevação da expressão da citocina houve uma acentuada diminuição na expressão da MMP-2. Cães assintomáticos infectados por *L. infantum* produzem, “in vitro”, INF- γ e TNF- α (PINELLI *et al.*, 1995; PINELLI *et al.*, 1994), o que pode tornar nossos resultados a cerca da inflamação por *L. chagasi* semelhantes aos de Mun-Bryce *et al.* (2002) no que diz respeito à menor expressão de MMP-2 no G1 decorrente da produção de TNF- α .

Outra possibilidade para a detecção de mais formas ativas e inativas de MMP-2 nos cães negativos do que nos positivos é a produção de TIMP-2. O TIMP-2 em altas concentrações age como inibidor da MMP-2, todavia, em baixas concentrações funciona como seu ativador (ROSEMBERG, 2002b). Esta informação sugere que cães sadios possuem baixas concentrações de TIMP-2, mantendo níveis mais elevados de MMP-2, que são constitutivas. É provável que cães soropositivos para LV tenham aumento na produção de TIMP-2, que funciona como inibidor da MMP-2, na tentativa de regular o aumento desta proteinase durante a infecção. Portanto, a presença de

citocinas inibidoras e/ou uma maior produção de TIMP-2 poderiam interferir nas quantidades de próMMP-2 e MMP-2 detectadas nos cães deste estudo e para verificarmos estas afirmações outras pesquisas serão necessárias.

No presente estudo, a próMMP-9 e a MMP-9 foram encontradas apenas no liquor dos cães com sorologia positiva para a LV, o que está de acordo com os relatos de Bergman *et al.* (2002) e Levine *et al.* (2006), de que a MMP-9 é produzida apenas em baixos níveis, que são marcadamente aumentados em processos inflamatórios e outras afecções do SNC de cães. Leppert *et al.* (2001) também relataram que em casos de inflamação, no caso bacteriana, as células do liquor expressam o mRNA da MMP-9 aumentado de 10 a 100 vezes, enquanto os da MMP-2 permanecem em níveis basais. Isto confirma o aumento na produção local de MMP-9 em condições inflamatórias do tecido nervoso e reforça a idéia de um ambiente pró-inflamatório no encéfalo dos cães com LV.

A resposta imunológica contra a leishmania pode ser efetuada por células Th1 e Th2 concomitantemente, resultando principalmente na produção de IL-10 e TNF- α , entre outras citocinas, tanto em cães sintomáticos quanto assintomáticos (CHAMIZO *et al.*, 2005; PANARO *et al.*, 2009). A IL-10, uma citocina antiinflamatória, inibe MMPs e estimula o TIMP-1 em fagócitos mononucleares de humanos (LACRAZ *et al.*, 1995) e o TNF- α é um potente indutor da MMP-9 (ANSARI *et al.*, 2008). Desta forma, a produção das duas citocinas ao mesmo tempo indica indução e supressão da MMP-9 em cães portadores de LV.

Stanley e Engwerda (2007) descreveram variações na resposta imunológica contra *L. donovani* dependendo do órgão afetado. Segundo os autores, no fígado há um dano tecidual mínimo e o TNF, junto a IL-10, medeiam o desenvolvimento da imunidade, conferindo resistência à reinfecção. Contraditoriamente, no baço o TNF é elevado e induz a IL-10, contribuindo para o desenvolvimento do estado imunopatológico. Esta variação de resposta imunológica na infecção sistêmica explica o fato de a mesma citocina inibir ou

estimular determinada MMP, reforçando a importância de mais estudos com relação à infecção do SNC por leishmanias.

Costa *et al.* (2008), investigando a participação “in vitro” de MMPs em danos a hepatócitos induzidos por macrófagos infectados por *L. chagasi*, relacionaram o aumento do TNF- α com a síntese das MMPs e a conversão da forma latente para a forma ativa. Segundo os autores, a maior produção de MMP-9 pelos macrófagos e sobrenadantes de co-cultura, indica a participação da protease nos danos aos hepatócitos.

Os sintomas neurológicos de cães infectados por *L. chagasi* decorrem da inflamação crônica das meninges com infiltrado de linfócitos e células do plasma (VIÑUELAS *et al.*, 2001). Lima *et al.* (2003), por meio de exame sorológico ELISA, detectaram altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania chagasi* no soro e no liquor de cães naturalmente infectados. Segundo os autores, algumas correlações encontradas entre os anticorpos presentes em ambos os locais, sugerem permeabilidade das barreiras cerebrais tanto para anticorpos quanto para antígenos. Zimogramas do soro de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* têm revelado elevados níveis de MMP-9 (dados ainda não publicados). Correlacionando os altos títulos de anticorpos no soro e no liquor com a detecção de MMP-9 no soro e, no presente estudo, no liquor de cães infectados por *L. chagasi*, é possível associar a ação proteolítica da MMP-9 com a quebra da BHE e/ou BHL.

Infecções sistêmicas generalizadas ocasionam grandes falhas na BHE, anulando seu caráter seletivo (LU *et al.*, 2009); desta forma, o SNC fica suscetível à entrada de células inflamatórias, patógenos e outras substâncias presentes no sangue. Sendo a LV caracterizada principalmente por lesões sistêmicas, há fortes indícios de que as MMPs detectadas neste estudo no liquor dos cães portadores de LV, estejam ocasionando alteração da permeabilidade da BHE, permitindo a entrada dos anticorpos descritos por Lima *et al.* (2003) bem como dos linfócitos T CD3 descritos por Melo *et al.* (2009a; b).

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que durante a infecção por *L. chagasi* em cães, não há variações na detecção de próMMP-2 e próMMP-9 entre o plexo coróide de animais sadios e de animais infectados, onde as formas ativas das mesmas são ausentes. Uma vez que o padrão das MMPs-2 e -9 não está alterado no PC, descartou-se a hipótese do envolvimento das pró formas locais no aumento da permeabilidade da BHL.

No liquor ocorre uma diminuição quantitativa das formas pró e ativa da MMP-2, ao passo que as formas pró e ativa da MMP-9 que são ausentes nos cães sadios, são aumentadas durante a infecção.

O aumento da forma ativa da MMP-9 no liquor de cães portadores de LV representa seu possível envolvimento na patogenia das lesões encefálicas ao aumentarem a permeabilidade da BHL, facilitando a entrada de células inflamatórias ou de fatores que podem ativar as células gliais periventriculares (astrócitos e micróglia), desencadeando uma resposta inflamatória/imune no encéfalo dos cães com LV.

REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; TEDESCO, R.C.; MORTARA R.A.; COSTA, S.C. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.68, n.6, p.661-665, 2003.
- ANSARI, N.A.; KATARA, G.K.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Evidence for involvement of TNFR1 and TIMPs in pathogenesis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.154, n.3, p.391-398, 2008.
- BARKER, C.F.; BILLINGHAM, R.E. Immunologically privileged sites. **Adv. Immunol.**, v.25, p.1-54, 1977.
- BERGMAN, R.L.; INZANA, K.D.; INZANA, T.J. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.63, n.10, p.1359-1362, 2002.
- BLUMENFELD, H. **Neuroanatomy**: through: clinical cases. Sunderland: Sinauer, 2002. p.122. Disponível em: <<http://www.ucsf.edu>>. Acesso em 13 maio 2009.
- CANDELARIO-JALIL, E.; YANG, Y.; ROSENBERG, G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. **Neuroscience**, v.158, n.3, p.983-994, 2009.
- CHAKRABORTI, S.; MANDAL, M.; DAS, S.; MANDAL, A.; CHAKRABORTI, T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Mol. Cell. Biochem.**, v.253, n.1-2, p.269-85, 2003.
- CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.103, n.1-2, p.67-75, 2005.

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

CLARK, A.W.; KREKOSKI, C.A.; BOU, S.S.; CHAPMAN, K.R.; EDWARDS, D.R. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. **Neurosci. Lett.**, v.238 n.1-2, p.53-56, 1997.

COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS - **CCD**. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. Secretaria do Estado da Saúde, 2006. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/lva06_manual.pdf>. Acesso em 15 junho 2009.

COSTA, J.D.; NOGUEIRA DE MELO, A.C.; VERMELHO, A.B.; MEIRELLES, M.D.E.N.; PORROZZI, R. In vitro evidence for metallopeptidase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages. **Acta Trop.**, v.106, n.3, p.175-183, 2008.

COX, M.J.; SOOD, H.S.; HUNT, M.J.; CHANDLER, D.; HENEGAR, J.R.; ARU, G.M.; TYAGI, S.C. Apoptosis in the left ventricle of chronic volume overload causes endocardial endothelial dysfunction in rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.282, n.4, p.H1197-1205, 2002.

DARSAUD, A.; BOURDON, L.; CHEVRIER, C.; KEITA, M.; BOUTEILLE, B.; QUEYROY, A.; CANINI, F.; CESPUGLIO, R.; DUMAS, M.; BUGUET, A. Clinical follow-up in the rat experimental model of African trypanosomiasis. **Exp. Biol. Med.** (Maywood), v.228, n.11, p.1355-1362, 2003.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares da importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar, no Ceará. **Hospital**, Rio de Janeiro, v.48, p.61-67, 1955.

DI TERLIZZI, R.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: part I - function and composition. **Vet. J.**, v.172, n.3, p.422-431, 2006.

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

EMERICH, D.F.; SKINNER, S.J.; BORLONGAN, C.V.; VASCONCELLOS, A.V.; THANOS, C.G. The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain. **Bioessays**, v.27, n.3, p.262-274, 2005.

ENGELHARDT, B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. **J. Neural Transm.**, v.113, n.4, p.477-485, 2006.

ENGELHARDT, B.; RANSOHOFF, R.M. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the SNC: anatomical sites and molecular mechanisms. **Trends Immunol.**, v.26, n.9, p.485-495, 2005.

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

FUJIMURA, M.; WATANABE, M.; SHIMIZU, H.; TOMINAGA, T. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) in cerebral cavernous malformations: immunohistochemical analysis of MMP-2, -9 and TIMP-2. **Acta Neurochir.** (Wien), v.149, n.2, p.179-183, 2006.

FURUSE, M.; HIRASE, T.; ITOH, M.; NAGAFUCHI, A.; YONEMURA, S.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **J. Cell. Biol.**, v.123, p.1777-1788, 1993.

GALEA I, BECHMANN I, PERRY VH. What is immune privilege (not)? **Trends Immunol.**, v.28, n.1, p.12-18, 2007.

GARCIA-ALONSO, M.; NIETO, A.G.; BLANCO, A.; REQUENA, J.M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Presence of antibodies in the aqueous humour and cerebrospinal fluid during Leishmania infections in dogs. Pathological features at the central nervous system. **Parasite Immunol.**, v.18, n.11, p.539-546, 1996.

- GOTTSCHALL, P.E.; DEB, S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. **Neuroimmunomodulation**, v.3, n.2-3, p.69-75, 1996.
- GRAB, D.J.; PERIDES, G.; DUMLER, J.S.; KIM, K.J.; PARK, J.; KIM, Y.V.; NIKOLSKAIA, O.; CHOI, K.S.; STINS, M.F.; KIM, K.S. Borrelia burgdorferi, host-derived proteases, and the blood-brain barrier. **Infect. Immun.**, v.73, n.2, p.1014-1022, 2005.
- HICKEY, W.F.; HSU, B.L.; KIMURA, H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. **J. Neurosci. Res.**, v.28, p.254-260, 1991.
- HUANG, S.H.; JONG, A.Y. Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier. **Cell. Microbiol.**, v.3, n.5, p.277-287, 2001.
- IKEDA-GARCIA, F.A.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; FEITOSA, M.M.; MACHADO, G.F.; PERRY, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.44, n.7, p.5-11, 2007.
- JOHANSSON, P.A.; DZIEGIELEWSKA, K.M.; LIDDELOW, S.A.; SAUNDERS, N.R. The blood-CSF barrier explained: when development is not immaturity. **Bioessays**, v.30, n.3, p.237-248, 2008.
- KHUTH, S.T.; AKAOKA, H.; PAGENSTECHER, A.; VERLAETEN, O.; BELIN, M.F.; GIRAUDON, P.; BERNARD, A. Morbillivirus infection of mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression. **J. Virol.**, v.75, n.17, p.8268-8282, 2001.
- KIM KS. Strategy of Escherichia coli for crossing the blood-brain barrier. **J. Infect. Dis.**, v.186 Suppl. 2, p.S220-S224, 2002.
- KOLB, S.A.; LAHRTZ, F.; PAUL, R.; LEPPERT, D.; NADAL, D.; PFISTER, H.; FONTANA, A. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in viral meningitis: upregulation of MMP-9 and TIMP-1 in cerebrospinal fluid. **J. Neuroimmunol.**, v.84, n.2, p.143-150, 1998.

- KORPOS, E.; WU, C.; SONG, J.; HALLMANN, R.; SOROKIN, L. Role of the extracellular matrix in lymphocyte migration. **Cell. Tissue Res.**, 2009. Disponível em: <<http://springerlink.com/content/h5k11k183w95302p/fulltext.pdf>>. Acesso em 15 outubro 2009.
- LACRAZ, S.; NICOD, L.P.; CHICHEPORTICHE, R.; WELGUS, H.G.; DAYER, J.M. IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. **J. Clin. Invest.**, v.96, n.5, p.2304-2310, 1995.
- LEIB, S.L.; LEPPERT, D.; CLEMENTS, J.; TÄUBER, M.G. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. **Infect. Immun.**, v.68, n.2, p.615-620, 2000.
- LENT, R. **Cem bilhões de neurônios**: conceitos fundamentais de neurociência. São Paulo: Atheneu, 2004. p.421-449.
- LEPPERT, D.; LINDBERG, R.L.; KAPPOS, L.; LEIB, S.L. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. **Brain Res. Brain Res. Rev.**, v.36, n.2-3, p.249-257, 2001.
- LEPPERT, D.; HAUSER, S.L.; KISHIYAMA, J.L.; AN, S.; ZENG, L.; GOETZL, E.J. Stimulation of matrix metalloproteinase-dependent migration of T cells by eicosanoids. **FASEB J.**, v.9, n.14, p.1473-1481, 1995.
- LEPPERT, D.; LEIB, S.L.; GRYGAR, C.; MILLER, K.M.; SCHAAD, U.B.; HOLLÄNDER, G.A. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. **Clin. Infect. Dis.**, v.31, n.1, p.80-84, 2000.
- LEVINE, J.M.; RUAUX, C.G.; BERGMAN, R.L.; COATES, J.R.; STEINER, J.M.; WILLIAMS, D.A. Matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid and serum of dogs with acute spinal cord trauma from intervertebral disk disease. **Am. J. Vet. Res.**, v.67, n.2, p.283-287, 2006.
- LEVINE, S. Choroid plexus: Target for systemic diseases and pathway to the brain. **Lab. Invest.**, v.56, n.3, p.231-233, 1987.

- LIMA, V.M.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.
- LOSSINSKY, A.S.; SHIVERS, R.R. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. **Histol. Histopathol.**, v.19, n.2, p.535-564, 2004.
- LU, P.; GONZALES, C.; CHEN, Y.; ADEDOYIN, A.; HUMMEL, M.; KENNEDY, J.D.; WHITESIDE, G.T. CNS penetration of small molecules following local inflammation, widespread systemic inflammation or direct injury to the nervous system. **Life Sci.**, v.8, n.11-12, p.450-456, 2009.
- MANDAL, M.; MANDAL, A.; DAS, S.; CHAKRABORTI, T.; SAJAL, C. Clinical implications of matrix metalloproteinases. **Mol. Cell. Biochem.**, v.252, n.1-2, p.305-329, 2003.
- MARQUES, M.J.; SANTO NETO, H.; CAMILLI, J. A. **Cortes coronais de crânio inteiro com cérebro in situ**. Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp. Disponível em: <<http://www.unicamp.br>>. Acesso em 13 maio 2009.
- MASSOVA, I.; KOTRA, L.P.; FRIDMAN, R.; MOBASHERY, S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. **FASEB J.** v.12, n.12, p.1075-1095, 1998.
- MELO, G.D.; MACHADO, G.F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral leishmaniasis: a histopathological investigation. **Bras. J. Vet. Pathol.**, v.2, n.2, p.69-74, 2009a.
- MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v.162, n.3-4, p.248-256, 2009b.
- MILLER, A.D.; LESLIE, R.A. The area postrema and vomiting. **Front. Neuroendocrinol.**, v.15, n.4, p.301-320, 1994.
- MUN-BRYCE, S.; LUKES, A.; WALLACE, J.; LUKES-MARX, M.; ROSENBERG, G.A. Stromelysin-1 and gelatinase A are upregulated before

- TNF-alpha in LPS-stimulated neuroinflammation. **Brain Res.**; v.933, n.1, p.42-49, 2002.
- NAGASE, H.; WOESSNER JUNIOR, J.F. Matrix metalloproteinases. **J. Biol. Chem.**, v.274, n.31, p.21491-21494, 1999.
- NIETO, C.G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCIA-ALONSO, M.; VERDUGO, S.G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Vet. Rec.**, v.139, n.14, p.346-347, 1996.
- NIKOLSKAIA, O.V.; KIM, Y.V.; KOVBASNJUK, O.; KIM, K.J.; GRAB, D.J. Entry of *Trypanosoma brucei gambiense* into microvascular endothelial cells of the human blood-brain barrier. **Int. J. Parasitol.**, v.36, n.5, p.513-519, 2006.
- PANARO, M.A.; BRANDONISIO, O.; CIANCIULLI, A.; CAVALLO, P.; LACASELLA, V.; PARADIES, P.; TESTINI, G.; DE CAPRARIIS, D.; MITOLO, V.; OTRANTO, D. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**, v.136, n.8, p.823-831, 2009.
- PAPADOPOULOS, M.C.; SAADOUN, S.; WOODROW, C.J.; DAVIES, D.C.; COSTA-MARTINS, P.; MOSS, R.F.; KRISHNA, S.; BELL, B.A. Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v.27, n5, p.384-395, 2001.
- PETITO, C.K.; ADKINS, B. Choroid plexus selectively accumulates T-lymphocytes in normal controls and after peripheral immune activation. **J. Neuroimmunol.**, v.162, n.1-2, p.19-27, 2005.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v.62, n.1, p.229-235, 1994.
- PINELLI, E.; GONZALO, R.M.; BOOG, C.J.; RUTTEN, V.P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E.J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, v.25, n.6, p.1594-1600, 1995.

PRON, B.; TAHA, M.K.; RAMBAUD, C.; FOURNET, J.C.; PATTEY, N.; MONNET, J.P.; MUSILEK, M.; BERETTI, J.L.; NASSIF, X. Interaction of *Neisseria meningitidis* with the components of the blood-brain barrier correlates with an increased expression of PilC. **J. Infect. Dis.**, v.176, n.5, p.1285-1292, 1997.

ROSEMBERG, G.A. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. **Glia**, v.39, n.3, p.279-291, 2002b.

ROSEMBERG, G.A. Matrix metalloproteinases and neuroinflammation in Multiple Sclerosis. **Neuroscientist**, v.8, n.6, p.586-595, 2002a.

RYAN, G.; GRIMES, T.; BRANKIN, B.; MABRUK, M.J.; HOSIE, M.J.; JARRETT, O.; CALLANAN, J.J. Neuropathology associated with feline immunodeficiency virus infection highlights prominent lymphocyte trafficking through both the blood-brain and blood-choroid plexus barriers. **J. Neurovirol.**, v.11, n.4, p.337-345, 2005.

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

STRAZIELLE, N.; GHERSI-EGEA, J.F. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.59, n.7, p.561-574, 2000.

SUIDAN, A.L.; MCDOLE, J.R.; CHEN, Y.; PIRKO, I.; JOHNSON, A.J. Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by DC8 T cells. **PLoS ONE**, v.3, n.8, p.e3037, 2008.

TENENBAUM, T.; PAPANDREOU, T.; GELLRICH, D.; FRIEDRICHS, U.; SEIBT, A.; ADAM, R.; WEWER, C.; GALLA, H.J.; SCHWERK, C.; SCHROTEN, H. Polar bacterial invasion and translocation of *Streptococcus suis* across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. **Cell. Microbiol.**, v.11, n.2, p.323-336, 2009.

TRIPATHI, A.K.; SULLIVAN, D.J.; STINS, M.F. Plasmodium falciparum-infected erythrocytes decrease the integrity of human blood-brain barrier endothelial cell monolayers. **J. Infect. Dis.**, v.195, n.7, p.942-950, 2007.

TURBA, M.E.; FORNI, M.; GANDINI, G.; GENTILINI, F. Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm. **J. Neurooncol.**, v.81, n.2, p.123-129, 2007.

UpToDate®. **Subarachnoid spaces and cisterns as seen in a median section of the brain.** Disponível em: <<http://www.uptodate.com>>. Acesso em 15 maio 2009.

VERÇOSA, B.L.A.; LEMOS, C.M.; MENDONÇA, I.L.; SILVA, S.M.M.S.; CARVALHO, S.M.; GOT, H.; COSTA, F.A.L. Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC**, v4, p.45, 2008.

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

WANG, P.; DAI, J.; BAI, F.; KONG, K.; WONG, S.J.; MONTGOMERY, R.R.; MADRI, J.A.; FIKRIG, E. Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile Virus entry into the brain. **J. Virol.**, v.82, n.18, p.8978-8985, 2008.

WEBB, A.A.; MUIR, G.D. The blood-brain barrier and its role in inflammation. **J Vet. Intern. Med.**, v.14, n.4, p.399-411, 2000.

WELLER, R.O.; ENGELHARDT, B.; PHILLIPS, M.J. Lymphocyte targeting of the central nervous system: a review of afferent and efferent CNS-immune pathways. **Brain Pathol.**, v.6, n.3, p.275-288, 1996.

WILLIAMS, K.C.; HICKEY, W.F. Traffic of hematogenous cells through the central nervous system. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.202, p.221-245, 1995.

WU, H.S.; KOLONOSKI, P.; CHANG, Y.Y.; BERMUDEZ, L.E. Invasion of the brain and chronic central nervous system infection after systemic *Mycobacterium avium* complex infection in mice. **Infect. Immun.**, v.68, n.5, p.2979-2984, 2000.

YONG, V.W.; POWER, C.; FORSYTH, P.; EDWARDS, D.R. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.2, n.7, p.502-511, 2001.

ZENI, P.; DOEPKER, E.; SCHULZE-TOPPHOFF, U.; HUEWEL, S.; TENENBAUM, T.; GALLA, H.J. MMPs contribute to TNF-alpha-induced alteration of the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v.293, n.3, p.C855-864, 2007.