

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

INVESTIGAÇÃO DE FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS
NO PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL

José Eduardo dos Santos Silva
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2017

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

**INVESTIGAÇÃO DE FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS
NO PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL**

**José Eduardo dos Santos Silva
Orientadora: Prof.^a Adjunto Gisele Fabrino Machado**

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

**ARAÇATUBA – SP
2017**

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

Silva, José Eduardo dos Santos

S729o

Investigação de fatores pró-inflamatórios no plexo coroide de cães com leishmaniose visceral / José Eduardo dos Santos Silva.

Araçatuba: [s.n], 2017.

72f. il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária, 2017

Orientadora: Profa. Adj. Gisele Fabrino Machado

1. Barreira hematoencefálica. 2. CCL-5. 3. Inflamação. 4. Leishmania. 5 Quimiocinas I. T.

CDD 616.9364



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Investigação de fatores pró-inflamatórios no plexo coroide de cães com leishmaniose visceral

AUTOR: JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS SILVA
ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

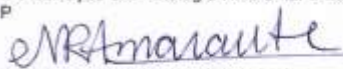
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIA ANIMAL, área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:


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


Profa. Dra. VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOFFIM
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. PAULO RICARDO DELL'ARMELENA ROCHA
Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental / Universidade Paulista - Câmpus de Indaiatuba/UNIP


Profa. Dra. MONICA REGINA VENDRAME AMARANTE
Departamento de Parasitologia / Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu/Unesp

Araçatuba, 17 de agosto de 2017.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS SILVA – Araçatuba – SP, 23 de outubro de 1985. Graduou-se como bolsista integral em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, São Paulo em dezembro de 2010. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC de 2008 a 2009. Mestre em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo em julho de 2013. Durante o mestrado realizou estágio de pesquisa no Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, cidade de Lisboa, Portugal, entre março e maio de 2013, com bolsa BEPE da FAPESP. Ingressou no programa de doutorado da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Campus de Araçatuba, São Paulo, em Março de 2014, sob orientação da Professora Adjunto Gisele Fabrino Machado. Durante o doutorado realizou estágio de pesquisa na Universidad Autònoma de Barcelona, cidade de Bellaterra, Espanha, entre novembro de 2015 e novembro de 2016 com bolsa BEPE da FAPESP.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei
para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser,
mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Marthin Luther King

Dedico

Aos meus pais Iraci e José (*in memoriam*)
e ao meu tio Dinho (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Adjunto Gisele Fabrino Machado, pela orientação, conselhos e paciência ao longo dos setes convivendo juntos.

À Professora Adjunto Valéria Marçal Felix de Lima pelo total apoio na realização dos ELISAS de citocinas e sorologia dos animais estudados, além de todo conhecimento compartilhado.

À Professora Adjunto Marion Burkhardt de Koivisto pelo apoio científico e conceder estrutura física e microscopia para captura e análise de imagem fundamentais para avaliação dos resultados do projeto.

À Professora Assistente Sueli Regina Bomfim pelas análises bioquímica realizadas em seu laboratório.

Ao Professor Adjunto Marcelo Vasconcelos Meireles pelo apoio científico e conceder estrutura física para o desenvolvimento do projeto.

Aos membros da banca do Exame Geral de Qualificação, Profa. Dra. Katia Denise Saraiva Bresciani, Profa. Sueli Regina Bomfim pelas sugestões e pelo tempo dedicado à avaliação do meu estudo.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa (#2016/14828-9) que originou a presente tese, bem como pela concessão da bolsa de doutorado (#2014/01209-9), e bolsa de estágio no exterior (#2015/13865-5), que foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa.

A Universidad Autònoma de Barcelona em especial à Professora Doutora Laia Solano-Gallego e sua equipe: Pamela Martinez-Orellana, Sara Montserrat, Aruanai Rivas, Vito Priolo, Laura Ordeix pelo apoio durante a realização do estágio de pesquisa na Universidad Autònoma de Barcelona, Espanha.

Aos meus irmãos, tios e primos pelo apoio e admiração e principalmente pelo amor incondicional.

Ao meu tio Dinho (*in memorian*) que sempre me incentivou a estudar, foi quem sempre fez questão de comprar meus materiais escolares desde a primeira série do ensino fundamental até meus materiais da faculdade. Obrigado por sempre ter vibrado comigo por minhas vitórias como se fossem as suas. Não tive a oportunidade de me despedir dele, me deixou com o abraço de boa sorte em minha jornada em Barcelona, mas tenho a grande certeza que está no céu sempre torcendo por mim. Te amo!

Ao Xavier Blanch que mesmo distante se fez presente em todos os momentos proporcionando-me apoio e incentivo para conclusão desse sonho.

Aos amigos, Fernanda, Milena, Guilherme e Camila não somente pela imensa colaboração no desenvolvimento desse projeto, como também por muitos momentos de alegria e companheirismo, apoio científico e confiança. Levarei vocês aonde quer que eu vá no meu coração.

Aos colegas pós-graduandos, Larissa, Gabriela, Lívia, Kathlenn, Bruna, Jaqueline, Hugo, Ana Lucia, Elis e Vinicius pelo apoio, conselhos e troca de experiências durante os momentos de descontrações.

A técnica de laboratório Flávia por sua doçura e paciência para auxiliar na execução dos experimentos

Aos funcionários do Centro de Zoonoses de Araçatuba pela contribuição e auxílio no manejo com os animais.

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FMVA-UNESP pelo apoio, informações e principalmente pela paciência em sanar dúvidas.

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

A Deus pela oportunidade de concretizar meus sonhos e o do meu pai que, com sua humildade e “ignorância”, sempre me dizia que lutaria para que um dia eu me torna-se um doutor.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	16
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1 Leishmaniose Visceral	16
1.2 Citocinas	17
1.2.1 Quimiocinas	18
1.3 Leishmaniose Visceral Canina e a Sistema Imunológico	19
1.4 Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio	20
1.5 Plexo Coroide	21
1.6 Sistema Nervoso Central e a Leishmaniose Visceral Canina	23
2 OBJETIVOS.....	24
REFERÊNCIAS	26
 CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO ENCÉFALO E DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL	37
RESUMO	37
ABSTRACT	38
1 INTRODUÇÃO.....	39
2 MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Aprovação do Comitê de Ética	41
2.2 Animais	41
2.3 Colheita de Amostras.....	42
2.4 Estadiamento Clínico	43
2.5 Análise histológica do encéfalo.....	43
2.6 Avaliação da expressão gênica de citocinas e quimiocinas por meio de RT-qPC	44
2.7 Quantificação de DNA de <i>Leishmania</i> em plexo coroide por meio de qPCR.....	45

2.8 Avaliação de níveis de albumina em soro e liquor.....	46
2.9 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> em liquor	46
2.10 Ensaio para detecção das citocinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no Soro e liquor	46
2.11 Análise Estatística.....	47
3 RESULTADOS.....	47
3.1 Estadiamento Clínico	47
3.2 Avaliação do infiltrado inflamatório no encéfalo dos cães com LV	48
3.3 Expressão gênica de citocinas e quimiocinas no plexo coroide	49
3.4 Ensaio para detecção das citocinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no soro e liquor	49
3.5 Quantificação de DNA de <i>Leishmania</i> em PC por meio de qPC	49
3.6 Detecção de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> em liquor	50
3.7 Avaliação de níveis albumina em soro e liquor	50
4 DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS	62
 CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÕES	 71

LISTA DE ABREVIATURAS

°C =	grau Celsius
BHE =	barreira hematoencefálica
BHL =	barreira hematoliquórica
PC =	plexo coroide
IFN- γ =	interferon gama
IL-1 =	interleucina 1
IL-6 =	interleucina 6
LV =	leishmaniose visceral
LVC =	leishmaniose visceral canina
p =	probabilidade
SNC =	sistema nervoso central
TGF- β =	fator de crescimento transformador beta
QA =	quociente de albumina
Th1 =	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 1
Th2 =	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 2
TNF- α =	fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1 – Fotomicrografias representativas da intensidade do infiltrado inflamatório no encéfalo de cães com LV. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto em subepêndima (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado em leptomeninges (seta). **(C)** Infiltrado inflamatório acentuado em PC (seta). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m.51

FIGURA 2 – Porcentagem de cães com inflamação classificada de acordo com a intensidade quando observada nas leptomeninges, subepêndima e PC.....53

FIGURA 3 – Formas amastigotas de *Leishmania infantum* em plexo coroide. **(A)** formas amastigotas de *Leishmania infantum* no interior de macrófagos (setas) em corte histológico coloração HE. **(B)** formas amastigotas de *Leishmania infantum* (setas) detectadas por Imunohistoquímica, revelado por DAB. Barra 50 μ m.....54

FIGURA 4 – Expressão gênica média relativa de citocinas e quimiocinas em PC de cães com leishmaniose visceral. Os valores, na escala logarítmica na base 10, indicam quantas vezes (*fold change*) o gene para as citocinas e quimiocinas está mais expresso (valores positivos) ou menos expresso (valores negativos) em relação aos cães do grupo controle. O fator de normalização foi o gene de referência G3PDH e o gene RPL-32 segundo o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * Indica $P < 0.05$, $\pm 0.05 < p < 0.1$ Indica tendência de aumento da expressão gênica.....55

FIGURA 5 – Determinação da concentração de Albumina, quociente de albumina em soro e liquor e anticortocorpos anti-*Leishmania* em liquor de cães com LV. **(A)** albumina em liquor (valor de referência 2600-3300 mg/dL), **(B)** albumina em soro (valor de referência < 10 mg/dL), **(C)** valor estabelecido para quociente de albumina em liquor de cães com LV foi $< 0,64$, **(D)** Concentração de anticorpos anti- *Leishmania* foi $< 0,309$. Linha horizontal indica a mediana. Linha pontilhada indica valor de referência..... 56

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Intensidade de inflamação em diferentes áreas encefálicas de cães com LV.....	52
--	----

INVESTIGAÇÃO DE FATORES PRÓ-INFLAMATÓRIOS EM PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que causa manifestações clínicas variadas em cães, incluindo alterações neurológicas, entretanto, existem poucos relatos que caracterizam as lesões observadas e que contribuem para elucidar a patogenia da forma neurológica da LV. O plexo coroide (PC) forma uma importante interface entre o liquor e o sistema periférico vascular, e é uma estrutura com potencial para permitir a passagem de células inflamatórias no sistema nervoso central além de servir como fonte de mediadores inflamatórios. O objetivo deste estudo foi avaliar as lesões encefálicas incluindo o PC em cães com LV e avaliar a possível participação do PC como estrutura produtora de mediadores pró-inflamatórios como citocinas (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α) e quimiocinas (CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-10), e disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) através da presença de albumina, anticorpo anti- *Leishmania* no liquor e também pelo quociente de albumina o que poderia facilitar a passagem de células imunes e contribuir para as alterações inflamatórias encefálicas. Foi observado infiltrado inflamatório variando de leve a acentuado principalmente em PC e meninges. Aumento na expressão gênica de CCL-5 e tendência no aumento da CXCL-10 em PC de cães infectados. Presença de formas amastigotas e DNA de *Leishmania* no PC, além de anticorpos anti-*Leishmania* e albumina no liquor de cães com LV. Esses resultados indicam que há disfunção da BHE em cães com LV e que a CCL-5 poderia ser produzida pelo PC, por outro lado, esse tecido não se mostrou contribuir ativamente na produção de outras citocinas avaliadas nesse estudo.

Palavras-chave: barreira hematoencefálica, CCL-5, inflamação, *Leishmania*, quimiocinas

INVESTIGATION OF PRO-INFLAMMATORY FACTORS IN CHOROID PLEXUS OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIOSIS

SUMMARY – Visceral leishmaniasis (VL) is a disease that causes several clinical manifestations in dogs, including neurological alterations, however, there are few reports that characterize the lesions observed and that contribute to elucidate the pathogenesis of the neurological form of VL. The choroid plexus (CP) forms an important interface between the cerebrospinal fluid and the vascular peripheral system, and is a structure with the potential to allow the passage of inflammatory cells into CNS and serve as a source of inflammatory mediators. The objective of this study was to evaluate brain lesions including CP in dogs with VL and to evaluate the possible participation of CP as a producer of pro-inflammatory mediators such as cytokines (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α) and chemokines (CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-10), and blood brain barrier (BBB) dysfunction through the presence of albumin, antibody anti-*Leishmania* in the cerebrospinal fluid and also by the albumin quotient facilitate the passage of immune cells and contribute to inflammatory brain disorders. Inflammatory infiltrates were observed ranging from mild to severe, mainly in CP and meninges. Increased gene expression of CCL-5 and tendency to increase CXCL-10 in CP from infected dogs. Presence of amastigotes and *Leishmania* DNA in CP, as well as anti-*Leishmania* antibodies and albumin in the cerebrospinal fluid of dogs with VL. These results indicate that there is dysfunction of BBB in dogs with VL and that CCL-5 could be produced by CP, on the other hand, this tissue did not prove to actively contribute to the production of other cytokines evaluated in this study.

Keywords: blood-brain barrier, CCL-5, chemokines, inflammation, *Leishmania*

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose é uma doença causada por mais de 20 espécies do protozoário do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida), que são transmitidas por cerca de 30 espécies de mosquitos flebotomíneos e é classificada em duas principais formas: leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral (LV) (BANETH et al., 2008; LUKEŠ et al., 2007).

A LV, também conhecida como Calazar é uma doença protozoária, causada pela *Leishmania donovani* (no velho mundo) e *Leishmania infantum chagasi* (no novo mundo) (MAURICIO et al., 2000). Esta doença está classificada entre as doenças tropicais como a quarta em morbidade e segunda em mortalidade com 20. 000 a 40.000 mortes por ano no mundo (ALVAR et al., 2012).

A leishmaniose visceral canina (LVC) é endêmica em aproximadamente 50 países entre a América do Sul e a região do Mediterrâneo (BANETH et al. 2008), isso devido as condições climática e ecológica que favorecem a proliferação do vetor (SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

O cão e o homem são os principais hospedeiros desse parasito, entretanto a presença da *Leishmania* já foi detectada em canídeos silvestres (LUPPI et al., 2008), gatos (VIDES et al., 2011), marsupiais (SANTIAGO et al., 2007) e roedores (OLIVEIRA et al., 2005).

Ao longo do seu ciclo de vida as espécies de *Leishmania* possuem duas formas. A forma promastigota metacíclica, que é flagela e encontrada no trato

intestinal dos vetores, é transmitida ao hospedeiro pela fêmea do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo e a forma amastigota, aflagelada, sendo parasito intracelular de células fagocitárias como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (BATES, 2007; KAYE; SCOTT, 2011).

Após interação com o sistema imune na pele e transformação das formas promastigotas metacíclicas em amastigotas, os parasitos são transportados por macrófagos infectados para os linfonodos regionais (SARIDOMICHELAKIS, 2009). O resultado da infecção pode variar dependendo de alguns fatores relacionados com o vetor, a *Leishmania* e resposta imune do hospedeiro (BAÑULS et al., 2007; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Esta enfermidade também pode ser encontrada em pessoas com o vírus da imunodeficiência como co-infecção (ABDALMAULA et al., 2013), entretanto pessoas imuno competentes também podem se infectar com essa enfermidade (HORRILLO et al. 2015). Além disso, a LV em humanos tem sido relacionado ao aumento dos casos de leishmaniose visceral canina (LVC) (NUNES et al., 2010).

A LVC é considerada uma doença crônica, cujos sinais clínicos são variados e alguns são imunomediados. Entre eles os mais frequentemente observados são perda de peso, onicogribose, linfadenomegalia, epistaxe, letargia, pneumonia, miocardite, além de alterações dermatológicas, renais, hepáticas, esplênica e oculares, distúrbios locomotores e alterações neurológicas (FEITOSA et al., 2000; BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010; HOSEIN et al., 2016).

A progressão da doença e prognóstico está relacionada ao tipo de resposta imune que o hospedeiro pode estabelecer frente a infecção (HOSEIN et al., 2016).

1.2 Citocinas

As citocinas são proteínas e glicoproteínas que atuam como mediadores na comunicação celular, enviam sinais que estimulam, modulam ou até mesmo inibem as células imunes. São produzidas devido a lesão tecidual, infecção e inflamação. Sendo secretadas como precursores inativos que precisam ser clivados por enzimas específicas para exercer sua função biológica, sendo então sua produção controlada. Suas atividades podem ser redundantes, ou seja, diferentes citocinas podem resultar nas mesmas funções. Além disso, uma citocina podem estimular uma célula para produzir outras citocinas, agindo como uma cascata. Entretanto, também podem inibir a produção de outras atuando de forma antagônicas (ZANG; AN., 2007)

A transmissão do sinal é feita por meio de receptores específicos localizados nas membranas celulares. Dentro da classe de citocinas estão as interleucinas, interferons, fatores de crescimento, fatores de necrose tumoral e quimiocinas (ALLAN; ROTHWELL, 2001; KADHIM et al., 2008).

1.2.1 Quimiocinas

As Quimiocinas compõem uma superfamília de proteínas de baixo peso molecular (8-14 kDa) que atuam na resposta imune, principalmente na ativação e o tráfego de leucócitos (BENDALL et al., 2005, VIGDAL; KALLIKOUDIS, 2017). As quimiocinas estão subdivididas em quatro subfamílias, de acordo com a posição de seus resíduos de cisteína: CXC (ou α -quimiocinas), CC (ou β -quimiocinas), C e CX₃C (VIGDAL; KALLIKOUDIS, 2017).

Dentre elas encontram-se as quimio atraentes de monócitos, as β -quimiocinas representada pela MCPs -1 e -2 (CCL-2 e CCL-8, respectivamente), as proteínas inflamatórias de macrófagos representada pela MIPs -1 α e -1 β (CCL-3 e CCL-4, respectivamente) e as proteínas secretadas e expressadas por linfócitos T, as RANTES (CCL-5), que são altamente atraentes para macrófagos

e monócitos, diversas subpopulações de linfócitos, células dendríticas e células *natural killer* (NK) (BENDALL, 2005; RABIN, 2003).

Entre as α -quimiocinas encontra-se a CXCL-10 (proteína 10 induzida por IFN- γ ou IP-10), cuja principal função é regular a migração de células Th1 efectoras ao local da inflamação, durante a resposta imune adaptativa (BENDALL, 2005; MURPHY, 2003).

1.3 Leishmaniose Visceral Canina e o Sistema Imunológico

A LVC é considerada uma doença imunomediada devido a capacidade do parasito em modificar o sistema imunológico do hospedeiro (BARBIÉRI, 2006). Algumas lesões na LVC são decorrentes da deposição de imunocomplexos que levam a vasculite em pele, olhos e rins (HOSEIN et al., 2016).

A resposta imunológica pode ser desencadeada por compostos de antígenos de superfície do parasito ou substâncias produzidas pelo protozoário (SANTARÉM et al., 2010).

Durante LVC, as células mononucleares fagocitárias infectadas por *Leishmania* atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando linfócitos T auxiliares CD4⁺ tipo 1 e 2 (Th1 e Th2) (HOSEIN et al., 2016).

A resposta do tipo Th1 produz uma resposta celular associado com a produção de citocinas como interferon-gama (IFN- γ), interleucina dois (IL-2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que ativam os macrófagos. Após a ativação, os macrófagos, por sua vez, estimulam a resposta celular pela ativação de outras células ou por sua proliferação. Por outro lado, a resposta Th2 resulta em resposta humoral associada com a produção de citocinas como a interleucina quatro (IL-4), interleucina dez (IL-10), fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), o que favorece a sobrevivência do parasito, ocasionando lesões

pelas ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (HOSEIN et al., 2016), e também ativação de linfócitos B estimulando a produção de anticorpos, não obtendo uma resposta eficiente contra a infecção (BARBIÉRI, 2006; HOSEIN et al., 2016; REIS et al., 2009). Entretanto, alguns estudos indicam que pode haver uma associação entre Th1e Th2 (HOSEIN et al., 2016).

Alguns trabalhos comprovam que cães com LV sintomáticos possuem uma falha de resposta celular específica, caracterizada por redução na resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* e uma redução no número de linfócitos T CD4⁺ (PINELLI et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Além da imunossupressão, fatores como raça, doenças concomitantes (MIRÓ et al., 2008) e até mesmo a virulência do parasito podem influenciar na resposta imune do hospedeiro (MARTIM-MARTIM et al., 2008).

1.4 Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio

Em condições normais o Sistema Nervoso Central (SNC) é considerado um local imunologicamente privilegiado (SHIMADA; HASEGAWA-ISHII, 2017), esse imunoprivilégio está relacionado à baixa expressão de antígenos de histocompatibilidade, ao reduzido número de células apresentadoras de antígeno e à eficiência das barreiras hematoencefálica (BHE) e hematoliquórica (BHL) (BALLABH et al., 2004; GALEA et al., 2007).

A BHE é composta por uma camada de células endoteliais, com junções intercelulares do tipo oclusivas (*"tight junctions"*). Além disso, é envolvida por pericitos, membrana basal, macrófagos perivasculares e pés terminais de astrócitos. Esta barreira encontra-se entre a luz de vasos sanguíneos e o parênquima nervoso (DANIELSKI et al., 2017).

A principal função BHE é limitar a saída de substâncias do sangue e o tráfego de leucócitos dentro do SNC, entretanto, estudos indicam que leucócitos ativados são capazes de cruzar a mesma e realizar a vigilância imunológica do SNC (ABBOTT et al., 2010). A BHE é encontrada em todo o SNC, com exceção do PC e áreas adjacentes aos ventrículos cerebrais (órgãos circunventriculares) (KUAR et al., 2016).

As células residentes como os astrócitos e micróglia conferem uma resposta imunológica específica ao SNC e regulam o processo inflamatório nesse tecido (BAILEY et al., 2006). Além disso, elas podem responder a estímulos periféricos como citocinas IL-1, IL-6 e TNF- α , produzidas por células imunes periféricas resultando em síntese de citocinas e quimiocinas no SNC que podem causar ou potencializar lesões no encéfalo (PAVLOV; TRACEY, 2006; TIAN et al., 2012). Mostrando assim uma comunicação ativa entre a vigilância imunológica do SNC e o sistema imune periférico (SHIMADA; HASEGAWA-ISHII, 2017).

1.5 Plexo Coroide

O PC é uma estrutura especializada localizada nos ventrículos laterais, e terceiro e quarto ventrículos (KAUR et al., 2016). É altamente vascularizado e composto por uma camada simples de células epiteliais cuboides que são continuação das células endoteliais (SHIMADA; HASEGAWA-ISHII, 2017). Tradicionalmente, esta estrutura é considerada responsável pela produção e secreção do líquido cefalorraquidiano, também conhecido como liquor (VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003; KAUR et al., 2016). O liquor é produzido constantemente, sendo transparente, estéril e sem a presença de sangue. Confere ao cérebro e a medula espinhal proteção mecânica contra impactos. Considerado como meio de comunicação entre o SNC. De fato, estudos recentes

tem mostrado que o líquor pode ter acesso a todo o SNC por meio do espaço perivascular (espaço de Virchow-Robin), onde é feita a drenagem e depuração de moléculas, além dos ventrículos e espaço subdural (BRINKER et al., 2014).

As células deste tecido possuem junções justas oclusivas (*"tight junctions"*) localizadas na parte apical das células (VORBRÖDT; DOBROGOWSKA, 2003), que evitam a difusão passiva do sangue formando assim uma barreira física chamada barreira hematoliquórica (BHL). Assim como BHE a integridade da BHL impede a entrada de patógenos, moléculas inflamatória e toxinas que chegam pelo sangue periférico, protegendo assim o SNC (KAUR et al., 2016).

Considerado como um mediador entre o sistema imune periférico e o SNC, o PC está constantemente exposto a sinais vindo do parênquima cerebral e sistema imune periférico, devido à sua estrutura e posicionamento. Alguns estudos têm relacionado o PC à mediação da resposta inflamatória dentro do SNC (KAUR et al., 2016).

Trabalhos de Englehardt et al. (2001) e Vercellino et al. (2008), demonstram o papel do PC na inflamação associada com a encefalite alérgica experimental e a esclerose múltipla. Além disso, o PC é uma estrutura com potencial para permitir a passagem de células inflamatórias no SNC, além de servir como fonte de mediadores inflamatórios durante várias doenças. Ainda, as células epiteliais do PC, mostraram capacidade de produzir citocinas como IL-6, IL-8, TNF- α , e IL-1 β , que são liberadas no líquor quando ocorre inflamação periférica sistêmica, o que resultaria em alterações no tecido nervoso (FUNG et al., 2012; MARQUES et al., 2009; MITCHELL et al., 2009; MURTA et al., 2015). No entanto, não existem muitos estudos sobre a síntese e a secreção de quimiocinas pelo PC (STRAZIELLE et al., 2016).

O PC e o líquor podem atuar como portas de entrada para patógenos ou antígenos circulantes e essa estrutura pode ser a primeira a responder a um estímulo inflamatório periférico (MELO; MACHADO, 2009, 2011). Estudos

mostram evidências de inflamação no encéfalo de cães com LV (IKEDA et al., 2007; MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2009; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2017). Além disso, a presença de anticorpos anti-*Leishmania*, albumina e imunoglobulina como a IgG até mesmo o DNA do protozoário já foram relatados em liquor de cães com LV (GARCIA-ALONSO et al., 1996; LIMA et al., 2003; MELO et al., 2015, OLIVEIRA et al., 2017).

A função altamente secretora das células do PC e sua interface entre o sangue e o liquor, podem desempenhar um papel importante na comunicação entre o sangue e o cérebro como tem sido comprovado por inúmeros trabalhos (BALUSU et al., 2016). Alguns trabalhos apontam que a BHL encontrada no PC desempenha importante papel fisiopatológico da inflamação no encéfalo causada por protozoários como o *Trypanossoma* (MOGK et al., 2014), mas pouco se sabe ainda sobre a participação desta estrutura na patogenia das lesões encefálicas dos cães com LV.

1.6 Sistema Nervoso Central e Leishmaniose visceral

O envolvimento do SNC durante a LV é pouco relatado tanto em humanos como em cães (MAIA et al., 2015).

Estudos realizados com 215 cães com infecção crônica de LV mostraram que somente 4% desses animais apresentaram sinais neurológicos. (FEITOSA et al., 2000). Giannuzzi et al. (2017), apesar do estudo feito com 54 cães com LV, observou que 5,4% dos animais possuíam sinais neurológico. Em humanos os sinais mais comumente relatados são relacionados a alterações no sistema nervoso periférico entretanto, meningite, disfunção de nervos cranianos e parasitas no liquor já foram relatados (MAIA et al., 2015). Contudo, os cães podem apresentar sinais de comprometimento generalizado do SNC como convulsões, disfunção de nervos cranianos, sinais cerebello-vestibulares,

incoordenação motora, paresia e mioclonia (GIANNUZZI, et al., 2017; IKEDA et al., 2007; MAIA et al., 2015).

Cães naturalmente infectados apresentam evidências de inflamação no encéfalo e desregulação da BHE, além de meningite e coroidite, deposição perivascular de imunoglobulinas, infiltração de leucócitos, ativação glial, enzimas que degradam componentes da matriz extracelular (MMP-2 e MMP-9) e um perfil de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (GARCIA-ALONSO et al., 1996; GIANNUZZI et al., 2017; IKEDA et al., 2007; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2013, MELO et al., 2015, OLIVEIRA et al., 2017).

Apesar do DNA do parasito ser detectado no SNC em cães naturalmente infectados (CARDINOT et al., 2016; GRANO et al., 2014), no encéfalo, existem raros relatos de identificação de *Leishmania* nesse tecido (MÁRQUEZ et al., 2013; NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001).

2 OBJETIVOS

- 1) Avaliar histopatologicamente e caracterizar as lesões inflamatórias encefálicas, incluindo o PC, em cães com LV.
- 2) Avaliar a participação do plexo coroide na produção de mediadores pró-inflamatórios por meio da quantificação da expressão gênica das citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas (CCL-3 CCL-4 CCL-5 e CXCL-10) em cães com LV.
- 3) Detectar e quantificar as citocinas: IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no soro e liquor de cães com LV.

- 4) Avaliar a desregulação da barreira hematoencefálica por meio determinação da presença de albumina e de anticorpos anti-*Leishmania* no liquor de cães com LV.
- 5) Avaliar a carga parasitária de *Leishmania infantum* no PC de cães com LV.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, N.; PATABENDIGE, A.A.; DOLMAN, D.E.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiol. Dis.**, v. 37, p.13–25, 2010.

ABDALMAULA, G. H.; BARBADORO, P.; MARIGLIANO, A.; ILLUMINATI, D.; DI STANISLAO, F.; D'ERRICO, M. M.; PROSPERO, E. Human visceral leishmaniasis: a picture from Italy. **J. Infect. P. H.**, v.6, p. 465–472. 2013.

ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**, v.2, p.734-744, 2001.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOE, M. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos one**. v. 7, e35671, 2012.

BAILEY, S. L.; CARPENTIER, P. A.; MCMAHON, E. J.; BEGOLKA, W. S.; MILLER, S. D. Innate and adaptive immune responses of the central nervous system. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 26, p. 149–188, 2006.

BALUSU, S.; VAN WONTERGHEM, E.V.; DE RYCKE, R.; RAEMDONCK, K.; STREMERSCHE, S.; GEVAERT, K.; BRKIC, M.; DEMEESTERE, D.; VANHOOREN, V.; HENDRIX, A.; LIBERT, C.; VANDENBROUCKE, R.E. Identification of a novel mechanism of blood–brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. **EMBO Mol. Med.**, v. 8, p. 1162–1183, 2016.

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

BANETH, G.; KOUTINAS, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.;

FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol.**, v. 24, p. 324-330, 2008.

BAÑUS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol.**, v. 64, p. 1-109, 2007.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine Leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.28, p.329-37, 2006.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.**, v.37, p.1097-1106, 2007.

BENDALL, L. Chemokines and their receptors in disease. **Histol and Histopathol**, v. 20, p. 907-926, 2005.

BRINKER, T.; STOPA, E; MORRISON, J.; KLINGE, P. A new look at cerebrospinal fluid circulation. **Fluids Barriers CNS**, v.11, p.10, 2014.

CARDINOT, C.B.; SILVA, J.E.S.; YAMATOIGI, R.S.; NUNES, C.M.; BIONDO, A.W.; VIEIRA, R.F.C; ARAUJO JUNIOR, J.P.; MARCONDES, M. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* DNA in the Brain of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **J. Parasitol.**, v. 102, p. 275–279, 2016.

DANIELSKI, L.G.; GIUSTINA, D.A.; BADAWEY, M.; BARICHELLO, T.; QUEVEDO, J.; DAL-PIZZOL, F.; PETRONILHO, F. Brain barrier breakdown as a cause and consequence of neuroinflammation in sepsis. *Mol. Neurobiol.*, p.1-9, **Mol Neurobiol.**, 2017. Disponível em:<doi:10.1007/s12035-016-0356-7>. Acessado em 20 jun.2017.

ENGLEHARDT, B.; WOLBURG-BUCHHOLZ, K.; WOLBURG, H. Involvement of the choroid plexus in central nervous system inflammation. **Microsc. Res. Technol.**, v.52, p. 112–129, 2001.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos

clínicos de cães com Leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínic. Vet.**, v. 28, p. 36-44, 2000.

FUNG, A.; VIZCAYCHIPI, M.; LLOYD, D.; WAN, Y.; MA, D. central nervous system inflammation in disease related conditions: mechanistic prospects. **Brain Res.**, v. 1446, p.144-155, 2012.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V. H. 2007. What is immune privilege (not)? **Trends immunol.**, v. 28, 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, p. 539–546. 1996.

GIANNUZZI, A.P.; RICCIARDI, M.; DE SIMONE, A.; GERNONE, F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. **J.S.P.**, v. 58, p. 125–138, 2017.

GRANO, F.G.; MELO, G.D.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; GOMEZ-NIETO, L.C.; MACHADO, G.F. First detection of Leishmania infantum DNA within the brain of naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 204, p.376-380, 2014.

HORRILLO, L.; SAN MARTIN, J. V.; MOLINA, L.; MADRONAL, E.; MATIA, B.; CASTRO, A.; GARCIA-MARTINEZ, J.; BARRIOS, A.; CABELLO, N.; ARATA, I.G.; CASAS, J. M.; RUIZ GIARDIN, J. M. Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). **Clin Microbiol Infec.**, v. 21, p.269–273, 2015.

HOSEIN, S.; DAMER, P.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitol.**, v. 1, p.1-21, 2016.

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

nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*.

Braz. J. Vet. Res. Anin.Sci., v. 44, p. 5-11, 2007.

KAUR, C.; RATHNASAMY, G.; LING, E.A. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. **J Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 75, p.198–213, 2016.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nature Reviews. **Microbiol.**, v. 9, p. 604-615. 2011.

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. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p.485-489, 2003.

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

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

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

MACHADO, G.F.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; MARCONDES, M.; PERRI, S.H.V.; VASCONCELOS, R.O. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.136, p.340–345, 2010.

MAIA, C. S. F.; MONTEIRO, M. C.; GAVIOLI, E. C.; OLIVEIRA, F. R.; OLIVEIRA, G. B.; ROMÃO, P. R. T. Neurological disease in human and canine leishmaniasis

– clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunol.**, v. 37, p. 385-393, 2015.

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

MARQUES, F.; SOUSA, J.C.; COPPOLA, G.; FALCAO, A.M.; RODRIGUES, A.J.; GESCHWIND, D.H.; SOUSA, N.; CRREIA-NEVES, M.; PALHA, J.A. Kinetic profile of the transcriptome changes induced in the choroid plexus by peripheral inflammation. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 29, p. 921–932, 2009.

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J.R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 25, p. 142-146, 2013.

MARTIN-MARTIN, I.; JIMENEZ, M.; GONZALEZ, E.; EGUILUZ, C.; MOLINA, R. Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. **Vet. Res.**, v.46, p.138, 2015.

MAURICIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The Strange Case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol. Today**, v.16, 188-189, 2000.

MELO, G.D.; MACHADO, G.F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral leishmaniasis: a histopathological investigation **Braz. J. Vet. Pathol.**, v.2, p. 69 – 74, 2009.

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

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, p. 248-256, 2009.

MELO, G.D.; SILVA, J.E.; GRANO, F.G.; SOUZA, M.S.; MACHADO, G.F. Leishmania infection and neuroinflammation: specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally- infected dogs. **J. Neuroimmunol.**, v. 289, p. 21-29, 2015.

MELO, G.D.; SERAGUCI, T.F.; SCHWEIGERT, A.; SILVA, J.E.S.; GRANO, F.G.; PEIRÓ, J.R.; LIMA, V.M.F.; MACHADO, G.F. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: a natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Vet. Parasitol.**, v. 192, p. 57– 66, 2013.

MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis–new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol.**, v. 24, p.371–377. 2008.

MITCHELL, K.; YANG, H.Y.T.; BERK, J.D.; TRAN, J.H.; LADAROLA, M.J. Monocyte chemoattractant protein-1 in the choroid plexus: a potential link between vascular pro-inflammatory mediators and the CNS during peripheral tissue inflammation. **J. Neurosci.**, v.158, p. 885–895, 2009.

MOGK, S.; MEIWES, A.; SHTOPEL, S.; SCHRAERMAYER, U.; LAZARUS, M.; KUBATA, B.; WOLBURG, H.; DUSZENKO, M. Cyclical appearance of African trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS. **Plos One**, v.3, p.91372, 2014.

MURPHY, P. M. CXC chemokines. In: HENRY, H. L.; NORMAN, A. W. (Ed.). **Encyclopedia of hormones**. New York: Academic Press, 2003. p. 351-362.

MURTA, V.; FARÍAS, M.I.; PITOSI, F.J.; FERRARI, C.C. Chronic systemic IL-1 β exacerbates central neuroinflammation independently of the blood–brain barrier integrity. **J. Neuroimmunol.**, v. 278, p. 30–43, 2015.

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, p. 346-347, 1996.

NUNES, C. M.; PIRES, M. M.; DA SILVA, K. M.; ASSIS, F.D.; GONÇALVES FILHO, J.; VENTUROLI PERRI, S.H. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Vet. Parasitol.**, v. 170, p. 131–133, 2010.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R.S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol.**, v.129, p.219-227, 2005.

OLIVEIRA, V.C.; BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C.; FIGUEIREDO, B.F.; CAMPOS, M.P.; RODRIGUES, F.C.C.; OLIVEIRA, R.V.C.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MENEZES, R.C. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PLoS One**, v. 2, p. e0175588, 2017.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGU, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A. Guideline for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 236, p. 1184-1191, 2010.

PAVLOV, V.A.; TRACEY, K. J. Controlling inflammation: the cholinergic pathway. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 34, p.1037–1040, 2006.

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania*

infantum-infected canine macrophages results in restoration of parasite- specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 237-243, 1999.

RABIN, R. L. CC, C, and CX3C chemokines. In: HENRY, H. L. e NORMAN, A. W. (Ed.). **Encyclopedia hormones**. New York: Academic Press, 2003. p. 255-263.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, p. 87–95, 2009.

SANTARÉM, N.; SILVESTRE, R.; TAVARES, J.; SILVA, M.; CABRAL, S.; MACIEL, J.; SILVA, A. C. Immune response regulation by *Leishmania* Secreted and non secreted Antigens. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2007, p. 1-10, 2007.

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

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. **Vet. Dermatol.**, v. 20, p. 471-489, 2009.

SHIMADA, A.; HASEGAWA-ISHII, S. Histological architecture underlying brain-immune cell-cell interactions and the cerebral response to systemic inflammation. **Frontiers Immunol.**, v.8, p.1-9, 2017.

LUKES, J.; MAURICIO, I.L.; SCHONIAN, G.; DUJARDIN, J.C.; SOTERIADOU, K.; DEDET, J.P.; KUHLS, K.; TINTAYA, K.W.Q.; JIRKU, M.; CHOCHOLOVA, E.; HARALAMBOUS, C.; PRATLONG, F.; OBORNIK, M.; HORAK, A.; AYALA, F.J.; MILES, M.A. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani*

complex with a revision of current taxonomy. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.104, p.9375–9380, 2007.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; KUOTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Vet. Parasitol.**, v. 165, p. 1-18, 2009.

STRAZIELLE, N.; CREIDY, R.; MALCUS, C.; BOUCRAUT, J.; GHERSI-EGEA, J.F. T-Lymphocytes traffic into the brain across the blood-csf barrier: evidence using a reconstituted choroid plexus epithelium. **PLOS ONE**, v. 21. Disponível em < DOI:10.1371/journal.pone.0150945, 2016> Acesso em 20 jun.2017. p. 0150945, 2016.

TIAN, L.; M.A; L.; KAARELA, T.; LI, Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. **J. Neuroinflammation**, v. 9, p. 2-10, 2012.

VERCELLINO, M.; VOTTA, B.; CONDELLO, C.; PIACENTINO, C.; ROMAGNOLO, A.; MEROLA, A.; CAPELLO, E.; MANCARDI, G.L.; MUTANI, R.; GIORDANA, M.T.; CAVALLA, P. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathologic study. **J. Neuroimmunol.**, v. 199, p. 133–141, 2008.

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

VIGNAL, D.; KALLIKOUDIS, M. Improving homing in T cell therapy. **Cytokine**

Growth Factor Rev. 2017. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.06.009>. Acessado 20 jun 2017.

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, p. 23-27, 2001.

VORBRODT, A.W.; DOBROGOWSKA, D.H. Molecular anatomy intercellular junction in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist' view. **Brain Res. Rev.**, v. 42, p.221-241, 2003.

ZHANG, J.M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int. Anesthesiol. Clin.**, v. 45, p. 27–37, 2007.

**CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO ENCÉFALO E DA
EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO PLEXO
COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA INFLAMAÇÃO NO ENCÉFALO E DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO PLEXO COROIDE DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - A leishmaniose visceral (LV) é uma doença que causa manifestações clínicas variadas, podendo levar em alguns casos ao comprometimento do sistema nervoso central (SNC) e periférico. O plexo coroide (PC) forma uma importante interface entre o líquido cefalorraquidiano (LCR) e o sangue, além de ser uma estrutura com potencial para permitir a passagem de células inflamatórias para o SNC, além de servir como fonte de mediadores inflamatórios. O objetivo deste estudo foi avaliar as lesões encefálicas incluindo o PC em cães com LV, a possível participação do PC como estrutura produtora de mediadores pró-inflamatórios como citocinas (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α) e quimiocinas (CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-10) e também disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) facilitando a passagem de células imunes e contribuindo para as alterações inflamatórias encefálicas observadas em cães com LV. Foi observado infiltrado inflamatório variando de leve a acentuado, principalmente em PC e meninges. Aumento na expressão gênica de CCL-5 e tendência no aumento da CXCL-10 em PC de cães infectados. Presença de DNA de *Leishmania* no PC, além de anticorpos anti-*Leishmania* e albumina no liquor de cães com LV. Esses resultados indicam que há disfunção da BHE e que o PC não contribui ativamente na produção de citocinas e que somente a CCL-5 poderia ser produzida pelo PC em cães com LV.

Palavras-chave: Quimiocinas, citocinas, CCL-5, CXCL-10, *Leishmania infantum*, sistema nervoso central

ABSTRACT - Visceral leishmaniasis (VL) is a disease that causes a several clinical manifestations, leading in some cases to involvement of the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system. The choroid plexus (CP) forms an important interface between cerebrospinal fluid (CSF) and the blood, and it is a structure with the potential to allow the passage of inflammatory cells into the CNS, and also it is a source of inflammatory mediators. The objective of this study was to evaluate brain lesions including CP in dogs with VL and to evaluate the possible participation of CP as a producer of pro-inflammatory mediators such as cytokines (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α), chemokines (CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-10), and brain-blood barrier (BBB) dysfunction facilitating the passage of immune cells and contributing to the inflammatory brain changes observed in dogs with VL. Inflammatory infiltrates were observed ranging from mild to severe, mainly in CP and meninges. Increased gene expression of CCL-5 and tendency to increase CXCL-10 in PC from infected dogs. Presence of *Leishmania* DNA in the CP, besides anti-*Leishmania* antibodies and albumin in the cerebrospinal fluid of dogs with VL. These results indicate that there is dysfunction of BBB and that CP does not actively contribute to the production of cytokines and that only CCL-5 could be produced by PC in dogs with VL.

Keywords: Chemokines, cytokines, CCL-4, CCL-5, CXCL-10

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose grave causada pelo protozoário *Leishmania chagasi* (= *infantum*) (MAURICIO et al., 2000) sendo os cães domésticos considerados como os principais reservatórios dessa doença. A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica cujos sinais clínicos são variados. Entre eles, os mais frequentemente observados são epistaxe, perda de peso, letargia, pneumonia, miocardite, linfadenomegalia, assim como alterações dermatológicas, renais, hepáticas, esplênica e oculares, distúrbios locomotores e alterações neurológicas (BANETH et al., 2008; FEITOSA et al., 2000; HOSEIN et al., 2016; PALTRINIERI et al., 2010).

Vários estudos são focados principalmente na resposta imune nos órgãos linfoides e na pele de cães com LV, principais estruturas afetadas (HOSEIN et al., 2016). Entretanto, o sistema nervoso também pode ser acometido durante a infecção por *Leishmania* levando a sinais clínicos como convulsões, andar em círculo, *head tilt*, mioclonia, incoordenação motora e paresia (GIANNUZZI et al., 2017; IKEDA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2017).

Em condições normais o Sistema Nervoso Central (SNC) é considerado um local imunologicamente privilegiado devido à reduzida expressão de antígenos de histocompatibilidade, ao baixo número de células apresentadoras de antígeno e à eficiência da barreira hematoencefálica (BHE) (BALLABH et al., 2004; GALEA et al., 2007). Esta barreira é composta por uma camada de células endoteliais, com junções intercelulares do tipo oclusivas ("tight junctions"). A BHE é envolvida por pericitos, membrana basal, macrófagos perivasculares e pés terminais de astrócitos, sendo localizada entre a luz de vasos sanguíneos e o parênquima nervoso (ABBOTT et al., 2010), tendo como função limitar a saída de substâncias do sangue e o tráfego de leucócitos dentro do SNC.

A BHE está presente em todo o SNC, exceto no plexo coroide (PC) e nos órgãos circunventriculares. No PC encontra-se a barreira hematoliquórica (BHL), a qual também é constituída por junções do tipo olusivas (*"tight junctions"*) localizada entre as células epiteliais. Estas células participam na formação do líquido cefalorraquidiano (LCR) (KAUR et al., 2016; VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003).

Considerado como um mediador entre o sistema imune periférico e o SNC, o PC está constantemente exposto a sinais vindo do parênquima cerebral e sistema imune periférico, devido à sua estrutura e posicionamento. Alguns estudos têm relacionado o PC à mediação da resposta inflamatória dentro do SNC (KAUR et al., 2016). Além disso, o PC é uma estrutura com potencial para permitir a passagem de células inflamatórias no SNC. Ainda, as células epiteliais do PC, mostraram capacidade de produzir citocinas como IL-6, IL-8, TNF- α , e IL-1 β , que são liberadas no liquor quando ocorre inflamação periférica sistêmica, o que resultaria em alterações no tecido nervoso (FUNG et al., 2012; MARQUES et al., 2009; MITCHELL et al., 2009; MURTA et al., 2015). No entanto, não existem muitos estudos sobre a síntese e a secreção de quimiocinas pelo PC (STRAZIELLE et al., 2016).

Vários estudos mostram evidências de inflamação no encéfalo de cães com LV como meningite, coroidite, ativação de células da glia, aumento de expressão gênica de citocinas pró-inflamatória e presença de linfócitos T CD3+ (IKEDA et al., 2007; MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2009; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2013). Além disso, presença de anticorpos anti-*Leishmania*, presença de albumina e IgG também já foram relatados em liquor de cães com LV (GARCIA-ALONSO et al., 1996; LIMA et al., 2003; MELO et al., 2015, OLIVEIRA et al., 2017).

A função altamente secretora das células do PC e sua interface entre o sangue e o liquor, podem desempenhar um papel importante na comunicação entre o sangue e o cérebro como tem sido comprovado por inúmeros trabalhos

(BALUSU et al., 2016). Alguns trabalhos apontam que a BHL encontrada no PC desempenha importante papel fisiopatológico da inflamação no encéfalo causada por protozoários como o *Trypanosoma brucei* (MOGK et al., 2014), mas pouco se sabe ainda sobre a participação desta estrutura na patogenia das lesões encefálicas dos cães com LV.

Este estudo teve como objetivo avaliar as lesões inflamatórias de regiões do cérebro, cerebelo e PC em cães com LV, disfunção da BHE, avaliar a possível participação do PC como estrutura produtora de mediadores pró-inflamatórias como citocinas (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α) e quimiocinas (CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-10), que foram detectadas em encéfalo de cães com LV que poderiam promover a passagem de células imunes e contribuir para as alterações inflamatórias encefálicas observadas em cães com LV.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aprovação do comitê de ética

O experimento ocorreu de acordo com os princípios éticos no uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA-00633-2016).

2.2 Animais

Foram colhidos amostras de 50 cães, após exclusão de outras doenças que poderiam acometer o sistema nervoso central foram incluídos neste estudo 23 cães, 13 machos e 10 fêmeas, adultos de distintas raças, provenientes do atendimento realizado no Centro de Controle de Zoonoses do município de

Araçatuba, SP, Brasil, com diagnóstico de LVC, cuja eutanásia foi autorizada pelos proprietários seguindo-se a recomendação do Ministério da Saúde. O grupo infectado foi composto por 19 cães e o grupo controle por 4 cães, cujas mortes não tinham sinal de envolvimento nervoso.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol® 3%) e posteriormente receberam cloreto de potássio (19,1%), ambos por via intravenosa. A confirmação de LV foi realizada por meio de testes parasitológico, sorológico (ELISA) (LIMA et al., 2005) e qPCR. Todos os animais do grupo infectado possuíam sinais da doença e foram classificados de acordo com Solano-Gallego et al. (2011) em 4 escore clínico. Nenhum animal possuía sinais neurológicos. Todos animais incluídos nesse estudo foram negativos para *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, por meio de RIFI e *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. por meio de ELISA.

2.3 Colheita de amostras

Após os cães serem anestesiados foi procedida a colheita de liquor por meio de punção na articulação atlanto-occipital (no mínimo 2mL) e colheita de sangue periférico (no mínimo de 10mL) por meio de punção da veia jugular. Posteriormente o animal foi eutanasiado. Em seguida foi realizado exame necroscópico para avaliar alterações macroscópicas e colheita de amostras de encéfalos e baço.

De um dos hemisférios foram colhido os PC do segundo, terceiro e quarto ventrículos, armazenados em 10 volumes de solução preservadora de RNA (RNAlater, Applied Biosystems, AM7020) por 24 horas a 4°C e então mantidos a -80°C até o processamento das amostras. Amostras de baço também foram colhidas e armazenadas a -80°C para posterior extração de DNA para avaliação da carga parasitária.

O outro hemisfério cerebral contralateral foi fixado em formalina 10% para inclusão em parafina. Após o tempo de manutenção no fixador (máximo 12 horas), amostras de cortes coronais de regiões corticais (temporal e piriforme), hipocampo e tálamo contendo a região periventricular foram obtidos, tomando-se o cuidado de incluir o PC de um dos ventrículos laterais e um fragmento do PC do quarto ventrículo. Posteriormente, cortes de 5µm foram corados por hematoxilina-eosina (H-E) para avaliação e caracterização das lesões inflamatórias em áreas pré-determinadas em estudos anteriores.

2.4 Estadiamento Clínico

O estadiamento clínico foi realizado para verificar possível correlação com a intensidade de inflamação no encéfalo dos cães deste estudo. Para o isto, foi determinado a concentração sérica de proteínas totais, albumina, ureia e creatinina, e concentração de anticorpos anti-*Leishmania* por meio de ELISA indireto (LIMA et al., 2005). O estadiamento clínico dos animais foi feito de acordo com Solano-Gallego et al. (2011).

2.5 Análise histológica do encéfalo

A intensidade da inflamação foi determinada semi quantitativamente usando-se escala de 0-3; onde 0 representou a ausência de células inflamatórias; 1 presença discreta (acúmulo focal de raras células); 2 presença moderada (acúmulo difuso ou multifocal de poucas células) e 3 acentuada presença de células inflamatórias (acúmulo acentuada e difusa de grandes quantidades de células (MELO et al., 2009).

2.6 Avaliação da expressão gênica de citocinas e quimiocinas no plexo coroide por meio de RT-qPCR

As amostras de PC armazenadas em RNA/ater a -80°C foram equilibradas a 4°C e logo após a temperatura ambiente e a extração de RNA foi realizada utilizando-se o *kit* RNeasy® Lipid Tissue Mini (74804, Qiagen) seguindo recomendações do fabricante. Após a obtenção do RNA, foi realizada a lise de DNA genômico usando-se (Rnase-Free Dnase Set: 79254; Qiagen). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000) e somente amostras com valor da relação de absorbância 260/280 entre 1,9 e 2,1 foram incluídas nas análises subsequentes. O RNA foi armazenado a -80°C até o momento da transcrição reversa.

As amostras de RNA foram submetidas à transcrição reversa para produção cDNA utilizando-se o kit RT² First Strand Kit (330404; Qiagen) seguindo recomendações do fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até o momento da realização das reações de amplificação (qPCR). As qPCRs foram realizadas em termociclador e sistema de detecção CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad®) utilizando o mastermix comercial Taqman® Universal (4326708, Applied Biosystems. A concentração de oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizadas segundo descrito por Fujiwara et al. (2003) (IL-1β), Peters et al. (2005) (IL-6, TNF-α, INF-γ e G3PDH), CC-3, CCL-5, CXCL10 e RPL-32 foram adquiridas comercialmente (Life Technologies Foster City, CA, USA). Para as citocinas foram utilizados concentração de 400 nM de cada primer e 250 nM de probe e para o G3PDH foi utilizado 400 nM de primer e 200 nM de probe. Para cada reação foi utilizado 5 µL de cDNA numa concentração final de 100ng. As condições de amplificação foram as seguintes: 55°C for 2 min, 95°C for 10 min, 45 ciclos de 95°C for 15 s e 60°C for 1 min. A quantificação da expressão gênica das citocinas e quimiocinas foi avaliada pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, segundo Livak e Schmittgen (2001), usando-se o sinal do gene de referência G3PDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e RPL-32 (ribosomal protein L32) para

normalização dos dados. Os resultados foram descritos com a expressão gênica relativa, ou seja, esse método expressa o número de vezes (*fold change*) que determinado gene está mais ou menos expresso no grupo infectado em relação ao grupo controle.

2.7 Quantificação de DNA de *Leishmania* em plexo coroide por meio de qPCR

Devido pouco material de PC, para quantificação de DNA de *Leishmania* nesse tecido foram utilizados PC de 16 cães, sendo 13 cães do grupo infectado e 3 do grupo controle, para isto 10 mg do PC foi utilizado para extração de DNA utilizando-se um kit comercial DNeasy blood & tissue kit (69506, Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA total foi quantificado em espectrofotômetro e somente amostras com valor da relação de absorbância 260/280 entre 1,8 e 2,0 foram incluídas nas análises subsequentes. Para o qPCRs usamos Eppendorf Mastercycler® RealPlex², SYBR Green PCR Master Mix (4309155, Applied Biosystems) e 900 nM de cada primer (sense: 5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3'; anti-sense: 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3') que amplificam um seguimento de 116 bp do mini círculo do cinetoplasto (KDNA) da *Leishmania spp.* (RANASINGHE et al., 2008), no volume total de 25 µL. As amostras, em duplicata, foram incubadas a 94°C por 2 minutos e então por 40 ciclos de amplificação (94°C por 15 segundos, seguido de 60°C por 1 minuto), neste momento onde os dados de fluorescência foram coletados. Na sequência, as amostras foram submetidas a uma curva de dissociação (melt curve), de 60°C até 95°C, com incremento de 0,5°C a cada 5 segundos. Água livre de nucleases foi utilizada como controle negativo da reação. Diluições seriadas (desde $1,6 \times 10^{-1}$ a $1,6 \times 10^{-8}$) de DNA de *L. infantum* foram utilizadas para realização de uma curva padrão.

2.8 Avaliação de níveis de albumina em soro e liquor

Para analisar a possível quebra de barreiras foram realizados exames bioquímicos para avaliar os níveis de proteína total e albumina no soro e LCR de 18 cães do grupo infectado. O quociente de albumina (AQ; *albumin quota*) foi calculado pela fórmula $\left(\frac{\text{albumina LCR}}{\text{albumina soro}} \times 100\right)$ (SORJONEN, 1987), foram considerados positivos valores maiores que 0.64 (GAMA et al., 2007).

2.9 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em liquor

Devido a restrita quantidade de liquor, foram utilizados 16 cães infectados e 3 cães controle para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. Foi utilizado ELISA indireto para determinar a concentração de anticorpos anti-*Leishmania* de acordo com Lima et al. (2003).

2.10 Ensaio para detecção das citocinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ em soro e liquor

O liquor e soro foram centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi imediatamente armazenado a -80°C. As concentrações de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-6 foram determinadas nos sobrenadantes do liquor e soro dos cães deste estudo por meio de ELISA de captura usando o *kit* comercial Duo SET® Canine TNF- α , Duo SET® Canine IFN- γ e Duo SET® Canine IL-1 β (R & D System, Minneapolis, EUA). Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para a IL-6, utilizamos o anticorpo monoclonal anti cão (mAb) produzido em camundongos (Número de Cat.: MAB16091, R & D System, EUA) e anticorpo policlonal anti cão biotinilado produzido em cabra (Número de Cat. BAF1609, Sistema R & D, EUA). As placas com 96 poços

(Nalgene Nunc International, EUA) foram sensibilizadas com 2µg/ml de mAb e com 1µg/ml de anticorpo de detecção, respectivamente. Para a curva padrão foi utilizada a IL-6 recombinante canina (Número do Cat.: 1609-CL, R & D System, EUA). O ensaio foi desenvolvido com 3,3', 5,5'-tetrametilbenzedina - TMB (Promega corporation). As placas foram lidas usando um espectrofotômetro (Spectra Count, Packard Bio Science Company, EUA) a 450nm. Todas as amostras foram medidas em duplicata.

2.11 Análise Estatística

Para avaliação da intensidade da inflamação foi utilizado teste de Friedman seguido pelo teste de Dunn. Para as correlações foi utilizado teste de Spearman. Para diferença entre os grupos foi utilizado teste de Mann-Whitney. Para análise das citocinas foi realizada uma curva de quatro parâmetros logístico (4-PL) curve-fit. Para as análises de expressão gênica todos os valores foram transformados na escala logarítmica de base 10. Para análise estatística envolvendo citocinas e quimiocinas, foram utilizados os valores obtidos da equação $2^{-\Delta Ct}$ no grupo infectado. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$, e foram considerados como evidência de tendência estatística quando $0,05 < p < 0,1$. Todas as análises foram realizadas usando-se o *software* Prism 6 (GraphPad, San Diego, Estados Unidos da América).

3 RESULTADOS

3.1 Estadiamento Clínico

No exame macroscópico observamos que 78,94% (15/19) dos cães infectados apresentavam perda de peso, seguido por 68,42% (13/19) com alterações em pele como alopecia, hiperqueratose nasal, ulcerações e seborreia, 63,15% (12/19) com esplenomegalia, 36,84% (7/19) com conjuntivite e 35,29% (7/19) com onicogrifose e 35,29% (7/19) com linfadenopatia.

Nos achados laboratoriais observamos que 84,21% (16/19) dos cães infectados apresentaram anemia, 52,63% (10/19) apresentaram linfopenia e 31,57% (6/19) apresentaram trombocitopenia. Todos os cães infectados apresentaram hipoalbuminemia. A azotemia foi evidente em 31,57% (6/19) dos cães infectados.

Todos os cães infectados possuíam anticorpos anti-*Leishmania*, exceto dois cães que foram negativos na sorologia; 15,78% (3/19) com intensidade baixa (D.O de 0,27 até 0,4), 42,10% (8/19) com intensidade média (0,4 até 0,81), e 31,57 % (6/19) com intensidade alta (acima de 0,81). Todos os cães infectados foram confirmados positivos nos exame parasitológico direto e qPCR. Com todos esses achados, classificamos 26,31% (5/19) dos cães no estágio I, 52,63% (10/19) no estágio II, 15,78% (3/19) no estágio III e 5,26% (1/19) dos cães no estágio IV da doença.

3.2 Avaliação do infiltrado inflamatório no encéfalo dos cães com LV

A intensidade de inflamação variou de leve a acentuada (Figura 1), A porcentagem de acordo com a intensidade em cada área avaliada podem ser visualizadas na Tabela 2. Foi observada maior porcentagem de inflamação em leptomeninges e PC (Figura 2). Além disso, foi observada congestão em vasos 89,5% (17/19), manguito perivascular 26,31% (5/19) e hemorragia no parênquima cerebral 5,3% (1/19). Foram observadas formas amastigotas da

Leishmania infantum chagasi no corte de PC corado por HE de um animal (Figura 3).

3.3 Expressão gênica de citocinas e quimiocinas no plexo coroide

A expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-6, INF- γ e TNF- α , no plexo coroide de cães com LV não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo controle (Figura 4A).

A expressão gênica da quimiocina CCL-5 no plexo coroide de cães com LV apresentou aumento quando comparado ao grupo controle ($p < 0.05$), enquanto a expressão gênica da quimiocina CXCL-10 apresentou tendência no aumento ($p = 0.05$) (Figura 4B). Entretanto não houve diferença estatística na expressão gênica da CCL-3 e CCL-4 quando comparado ao grupo controle.

3.4 Ensaio para detecção das citocinas IL1- β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no soro e liquor

As citocinas IL-6 e IFN- γ não foram detectadas no soro e no liquor de cães com LV, com exceção da IL1- β que foi detectada em soro, e o TNF- α em liquor, entretanto não houve diferença estatística com o grupo controle. O limite de detecção para IL-1 β no liquor foi 3,90 pg/mL e 7,81pg/mL no soro, para a IL-6 no liquor foi 78,12 pg/mL e 9,7 pg/mL no soro, TNF- α no liquor foi 31,21 pg/mL e 15,62 pg/mL no soro, para IFN- γ 15,62 pg/mL no liquor e 62,5 pg/mL no soro.

3.5 Quantificação de DNA de *Leishmania* em PC por meio de qPCR

A partir da curva padrão de diluições seriadas com DNA de *L. infantum* foi possível quantificar a carga parasitária em PC. A presença de KDNA d *L. infantum chagasi* no PC foi detectado em 38,46 % (5/13) dos cães com LV. A reação de amplificação para *Leishmania* obteve eficiência de 106%, coeficiente de determinação (r^2) de 0,968 e coeficiente angular de -3,179. A faixa de detecção foi de 1 a 27.778 parasitos/10mg de PC.

3.6 Detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em liquor

Foram detectados anticorpos anti-*Leishmania* em amostras de liquor de 68,75% (11/16) dos cães infectados com LV. A densidade Optica variou de 0,1 a 1,348 (Figura 5 D).

3.7 Avaliação de níveis de albumina em soro e liquor

Na análise de albumina observamos aumento em 77,77 % (14/18) em amostra do liquor de cães com LV (Figura 5 A). O QA mostrou-se aumentado em 72,22% (13/18) dos cães estudados em relação aos relatados em cães saudáveis (Figura 5 C).

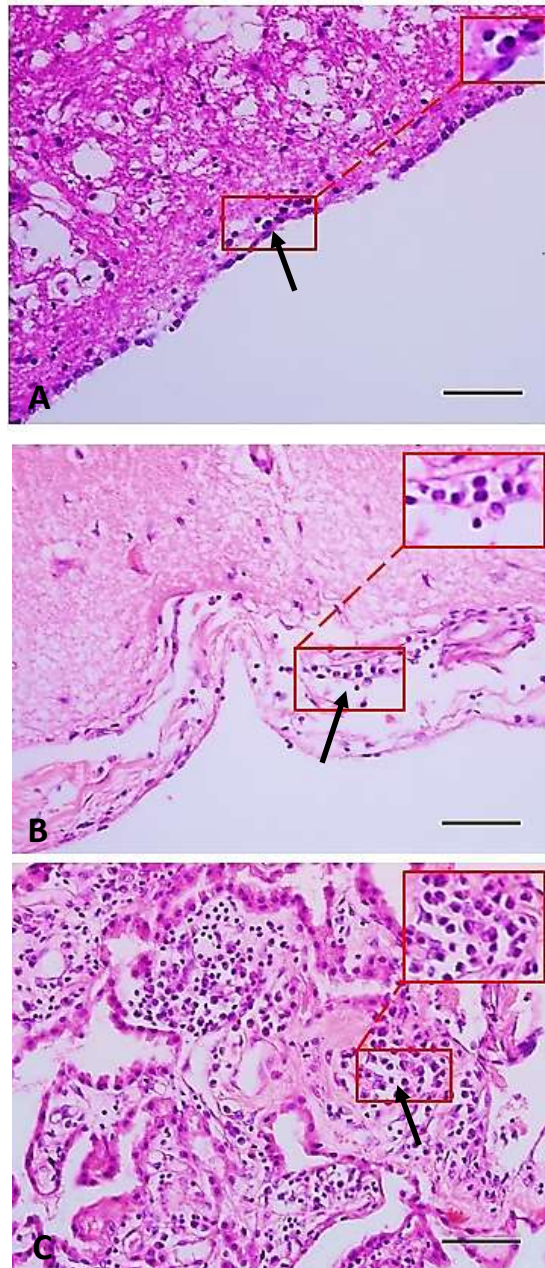


FIGURA 1 - Fotomicrografias representativas da intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear no encéfalo de cães com LV. (A) Infiltrado inflamatório discreto em subepêndima (seta). (B) Infiltrado inflamatório moderado em leptomeninges (seta). (C) Infiltrado inflamatório acentuado em PC (seta). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m.

Tabela 1 – Intensidade de inflamação em diferentes áreas encefálicas de cães com LV

Intensidade de inflamação	Encéfalo		
	Leptomeninges (%)	Subepêndima (%)	Plexo coroide (%)
-	0,0	42,1	5,3
+	21,1	36,8	15,8
++	36,8	21,1	47,4
+++	42,1	0,0	31,6
Total	100,0	100,0	100,0

-: ausência de infiltrado inflamatório; +: infiltrado inflamatório discreto; ++: infiltrado inflamatório moderado; +++ infiltrado inflamatório intenso.

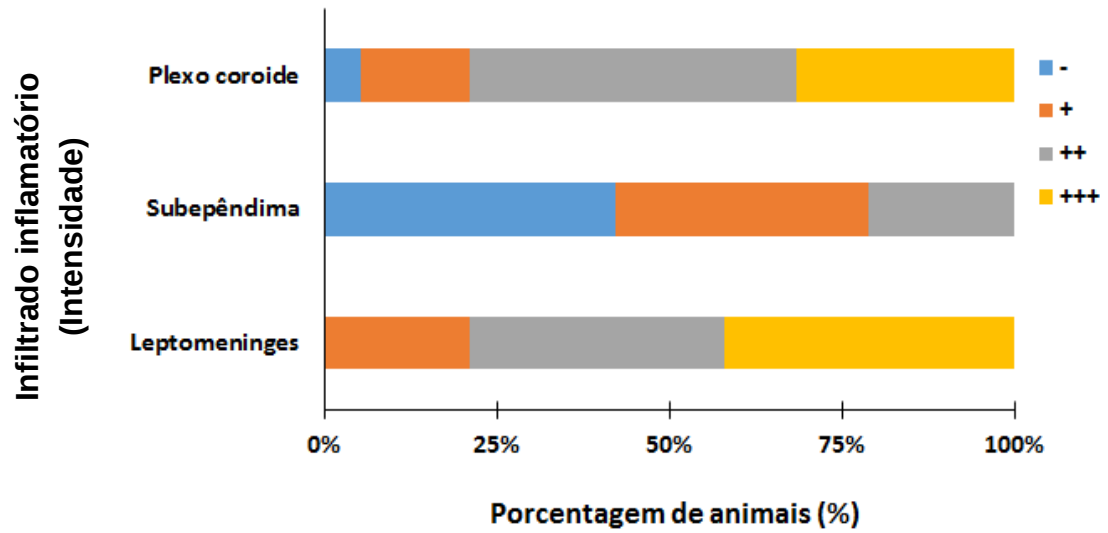


FIGURA 2 - Porcentagem de cães com inflamação classificada de acordo com a intensidade quando observada nas leptomeninges, subepêndima e PC.

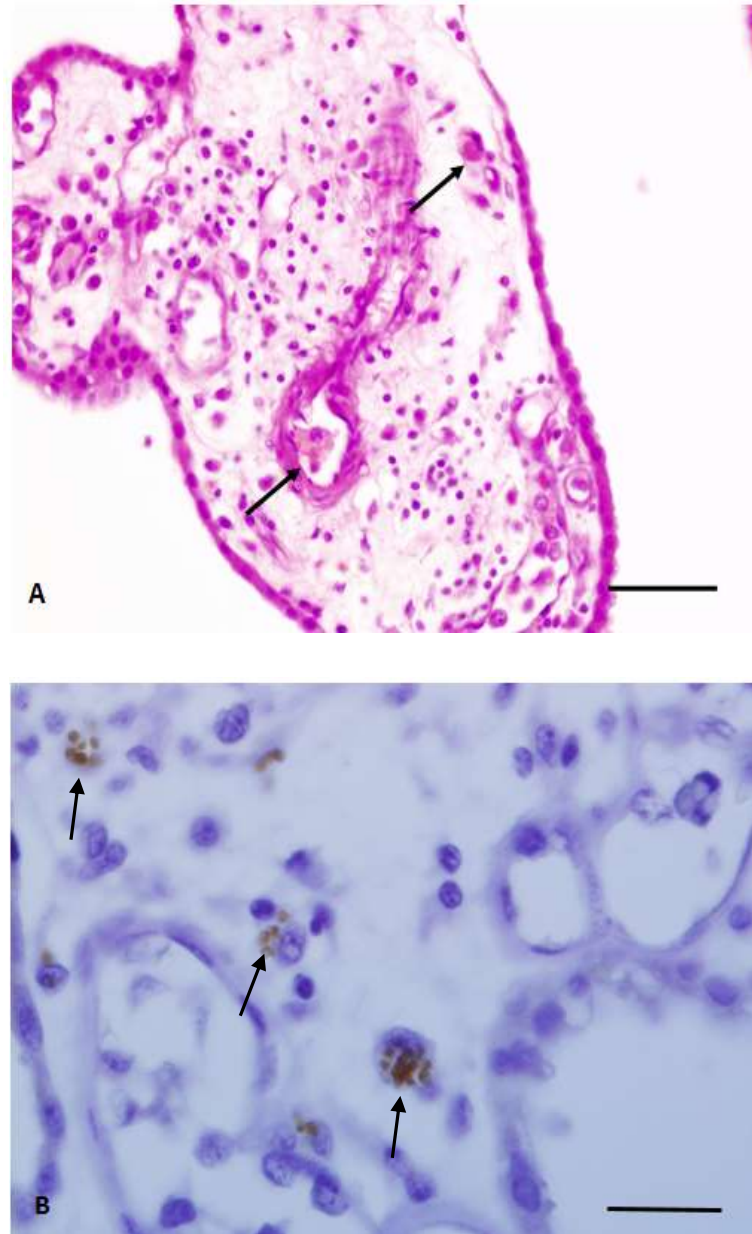


FIGURA 3 - Formas amastigotas de *Leishmania sp* em plexo coroide. A) formas amastigotas de *Leishmania infantum* no interior de macrófagos (setas) em corte histológico coloração HE. B) formas amastigotas de *Leishmania infantum* (setas) detectadas por Imunohistoquímica, revelado por DAB. Barra 50 μ m.

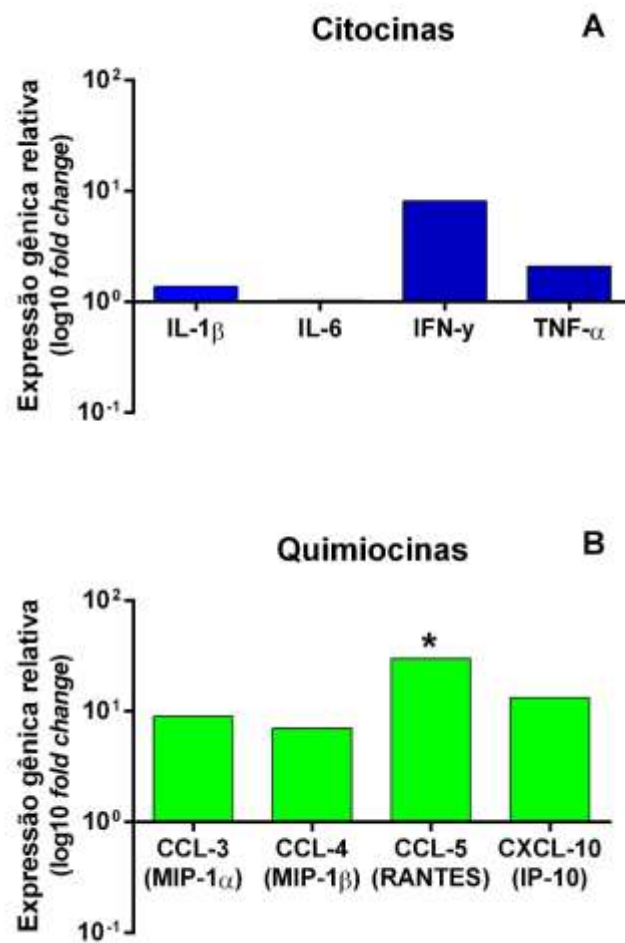


FIGURA 4 - Expressão gênica média relativa de citocinas e quimiocinas em PC de cães com leishmaniose visceral. Os valores, na escala logarítmica na base 10, indicam quantas vezes (*fold change*) o gene para as citocinas e quimiocinas está mais expresso (valores positivos) ou menos expresso (valores negativos) em relação aos cães do grupo controle. O fator de normalização foi o gene de referência G3PDH e o gene RPL-32 segundo o método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * Indica $P < 0.05$, $\pm 0.05 < p < 0.1$ Indica tendência de aumento da expressão gênica.

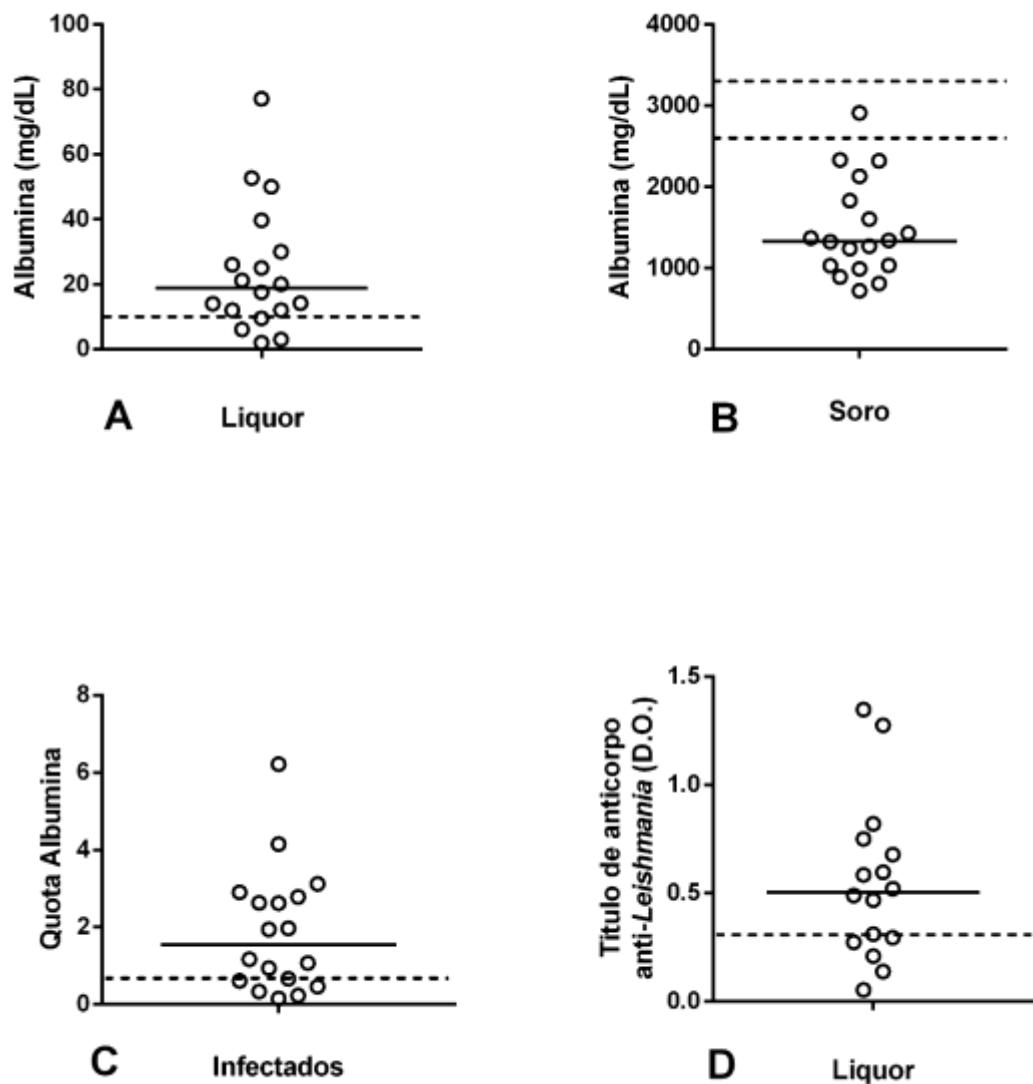


FIGURA 5 - Determinação da concentração de Albumina, quociente de albumina em soro e liquor e anticorpos anti-*Leishmania* em liquor de cães com LV. A) albumina em liquor (valor de referência 2600-3300 mg/dL), B) albumina em soro (valor de referência <10 mg/dL), C) valor estabelecido para quociente de albumina em liquor de cães com LV foi <0,64, D) Concentração de anticorpos anti-*Leishmania* foi <0,309. Linha horizontal indica a mediana. Linha pontilhada indica valor de referência.

4 DISCUSSÃO

Na análise histopatológica das amostras do encéfalo dos cães com LV foi observado a presença de células inflamatórias mononucleares, localizadas principalmente nas leptomeninges das regiões corticais, cerebrais, cerebelares e na região subependimária e PC, concordando com os achados de Melo et al. (2009) e Oliveira et al. (2017). O SNC em condições normais possui baixo número de células inflamatórias (BALLABH et al., 2004). Entretanto, alterações inflamatórias no encéfalo de cães com LV tem sido relatadas (IKEDA et al., 2007; MELO et al., 2009; MELO; MACHADO, 2011; OLIVEIRA et al., 2017). Não observamos correlação entre a intensidade da inflamação no encéfalo com o estadiamento clínico dos cães segundo Solano-Gallego et al. (2011), nem mesmo quando avaliamos somente os animais classificados como grau I e II, por serem grupos com o maior número de animais, diferente dos grupos no grau III e IV, sugerindo que cães com LV podem apresentar inflamação no encéfalo independente do estadiamento clínico.

Foram observadas formas amastigotas do parasito no PC de um animal. Até onde é de nosso conhecimento, esse é o segundo relato de formas amastigotas encontrada no PC de cão com LV (NIETO et al., 1996). De fato, são poucos os relatos da presença do parasito no SNC de cães, exceto por formas amastigotas em meninges (VIÑUELAS et al., 2001), em medula espinhal (MARQUÉZ et al., 2013) e mais recentemente no SNC confirmado por meio de imunohistoquímica (OLIVEIRA et al., 2017). Apesar de poucos relatos, a *Leishmania* mostrou-se capaz de atravessar as barreiras encefálicas, sendo o PC um possível caminho de entrada do parasito no SNC.

Além disso, detectamos a presença de DNA do parasito no PC de aproximadamente 38% (5/13) dos cães estudados, sendo que a maior carga parasitária foi encontrada na amostra do mesmo cão onde observamos a forma amastigota do parasito. O DNA de *Leishmania* já foi encontrado no encéfalo

(CARDINOT et al., 2016; GRANO et al., 2014; MELO et al., 2015), e também em liquor de cães com LV (GUIANUZZI et al., 2017).

O DNA do parasito pode chegar ao estroma do PC por meio de fenestrações vasculares e lesões inflamatórias endoteliais (Wolburg e Paulus, 2010). A presença do DNA da *Leishmania* no PC pode ativar os receptores Toll-Like, como o TLRs 2 e 9 encontrado no PC de cães com LV (MELO et al., 2014), desencadeando a produção de citocinas e quimiocinas encontrada no encéfalo de cães com LV (MELO et al., 2013; MELO et al., 2015). Além disso, observamos também a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no liquor de cães com LV, concordando com outros autores (GARCIA-ALONSO et al., 2006; GRANO et al., 2014; LIMA et al., 2003; MELO et al., 2015). Apesar de não avaliarmos a possível produção do anticorpo anti-*Leishmania* intratecal, estudo recente mostrou que anticorpos anti-*Leishmania* presente no liquor de cães com LV seriam originados do sangue periférico (MELO et al., 2015).

Nesse estudo, observamos aumento na concentração de albumina sérica no liquor e consequentemente houve aumento também do quociente de albumina em cães com LV acordando com resultados encontrados por Melo et al. (2015). A albumina é uma proteína plasmática produzida no fígado, que pode ser encontrada em baixas concentrações no liquor. O aumento da concentração da albumina no liquor também já foi relatado na disfunção da BHE em cães com hipotireoidismo (PANCOTTO et al., 2010) e encefalites causada pelo vírus da cinomose (GAMA et al., 2007).

Tanto a presença de anticorpos anti-*Leishmania* quanto a albumina foram encontrados no liquor, o que comprova a disfunção da BHE em cães com LV (MAIA et al., 2015; MELO et al., 2015). Além disso, a presença de células inflamatórias no encéfalo também pode estar correlacionada com essa disfunção, que pode ser ocasionada por atividade das metaloproteinases (MMP) descritas em encéfalo de cães com LV (MACHADO et al., 2010; MELO et al., 2011; MELO et al., 2012). A ativação de astrócitos e micróglia também têm sido

correlacionada com a presença de linfócitos T CD3⁺ (MELO et al., 2011). A produção de quimiocinas após a ativação da micróglia e astrócitos (MELO et al., 2013) poderia promover a migração celular e as lesões inflamatórias SNC (STRACK et al., 2002).

Nos PC de cães com LV não apresentou diferença estatística na expressão gênica de das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ quando comparado ao grupo controle. Além disso, não detectamos a produção destas mesmas citocinas em liquor e soro, com exceção da IL1- β , no soro e TNF- α no liquor. Diferentemente, Lima et al. (2007) encontraram aumento da IL-6 em soro de cães com LV, mas assim como em nosso estudo, não encontraram TNF- α no soro cães. O IFN- γ e a IL-6 também já foram descritos em soro de pacientes com LV. A IL-6 em humanos está relacionada com a gravidade da leishmaniose visceral. (SANTOS et al., 2016). Nascimento et al. (2013), encontraram aumento de IFN- γ em cães que tinham menor carga parasitária. Por outro lado, não encontrou diferença estatística na produção de TNF- α entre o grupo infectado e o grupo controle.

Estudos realizados com encéfalo de cães com LV mostraram aumento da IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ em cães com LV (MELO et al., 2013). Entretanto, no PC de cães com LV não observamos este mesmo padrão de expressão gênica. Isso demonstra que não há participação do PC na produção dessas citocinas e que as mesmas poderiam ser produzidas por outras células ativadas do SNC como micróglia e astrócitos, ausentes no PC.

Existem também a hipótese de que os estímulos inflamatórios resultantes da infecção periférica por *Leishmania* podem promover alterações no SNC (MAIA et al., 2015) e também a da compartimentalização da resposta imune durante a LV, onde diferentes órgãos e tecidos produzem uma resposta imune específica e distinta, após um mesmo estímulo periférico (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010; MARQUES et al., 2009; REIS et al., 2009). A resposta do tecido nervoso à estímulos inflamatórios periféricos vêm sendo comprovada em

estudos como os realizados por Quan et al. (1998) que com introdução peritoneal de lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos mostraram aumento da expressão de citocinas como a IL-1 β no encéfalo, sendo que as primeiras regiões a apresentarem a expressão dessa citocina foram o PC, os órgãos circunventriculares e as leptomeninges. Além disso, LPS intraperitonal em camundongos após uma hora mostrou aumento na expressão gênica das citocinas IL-1 β e TNF- α em PC (MARQUES et al., 2007). Estudos experimentais realizados com injeção periférica de IL-1 em camundongos mostraram alterações no tecido nervoso, indicando mais uma vez uma comunicação entre o SNC e o sistema imune periférico (MURTA et al., 2015).

Nós observamos aumento da expressão gênica da quimiocina CCL-5 e tendência no aumento da CXCL-10. O aumento da expressão gênica da CCL-5 já foi encontrado em pele com correlação positiva com a carga parasitária (MENEZES-SOUZA et al., 2011), baço e encéfalo de cães com LV (MELO et al., 2015; STRAUSS-AYALI et al., 2007). Por outro lado, a expressão gênica da CXCL-10 foi encontrada somente no baço de cães com LV (MELO et al., 2015; STRAUSS-AYALI et al., 2007).

A principal função das quimiocinas é coordenar a migração de leucócitos. Além de recrutar monócitos e macrófagos para locais de inflamação, a CCL-5 e CXCL10, podem recrutar populações de linfócitos, assim como a CCL-3, CXCL13 e CXCL16 (RANSOHOFF et al., 2003). A CCL-5 é expressa em distúrbios inflamatórios e degenerativos do SNC em casos de doenças auto imunes como encefalites decorrente da esclerose múltipla e encefalite causada por vírus da estomatite vesicular (MESQUITA et al., 2016; SANTOS et al., 2005). Uma vez que a presença de linfócitos já foi encontrada no encéfalo de cães com LV (MELO et al., 2009), o aumento da expressão gênica da CCL-5 e a CXCL-10 observado em nosso estudo poderia estar relacionado no recrutamento de linfócitos para o PC.

Além da possível disfunção da BHE, a presença de linfócitos T no PC poderia alterar a função de BHL ou favorecer a produção de outros mediadores pró-inflamatórios que não foram mensurados neste estudo e que, uma vez circulantes no liquor, estimulariam também o fenótipo inflamatório das células gliais.

Quanto a expressão gênica da CCL-3 e CCL-4, não houve diferença estatística quando comparado ao grupo controle. Entretanto, essas quimiocinas já foram encontradas tanto no baço quanto no encéfalo de cães com LV (MELO et al., 2015; STRAUSS-AYALI et al., 2007). Além disso, Menezes-Souza et al. (2011), encontraram aumento da expressão gênica da CCL-4 em pele de cães com LV com correlação positiva com a carga parasitária.

No presente estudo, podemos concluir que cães com LV apresentam leptomeningite e plexo coroidite independente do estadiamento clínico do animal. Comprovamos a disfunção da BHE pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* e albumina no liquor. Também observamos a presença de DNA do parasito, além da observação da forma amastigota em corte histológico do PC de um animal mostrando assim que o PC é uma possível porta de entrada do parasito no SNC. Além disso, observamos aumento da expressão gênica quimiocina CCL-5 e tendência no aumento da CXCL-10 que podem estar favorecendo a entrada de células inflamatórias no PC de cães com LV. Estudos futuros serão necessários para avaliar a produção das quimiocinas que apresentaram aumento na expressão gênica no PC de cães com LV.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, J.N.; PATABENDIGE, A.A.; DOLMAN, D.E.; YUSOF, S.R.; BEGLEY, D.J. Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiol. Dis.**, v. 37, p.13–25, 2010.

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

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

BALUSU, S.; VAN WONTERGHEM, E.V.; DE RYCKE, R.; RAEMDONCK, K.; STREMERSCHE, S.; GEVAERT, K.; BRKIC, M.; DEMEESTERE, D.; VANHOOREN, V.; HENDRIX, A.; LIBERT, C.; VANDENBROUCKE, R.E. Identification of a novel mechanism of blood–brain communication during peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles. **EMBO Mol. Med.**, v. 8, p. 1162–1183, 2016.

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

CARDINOT, C.B.; SILVA, J.E.S.; YAMATOIGI, R.S.; NUNES, C.M.; BIONDO, A.W.; VIEIRA, R.F.C; ARAUJO JUNIOR, J.P.; MARCONDES, M. Detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia vogeli*, and *Toxoplasma gondii* DNA in the Brain of Dogs Naturally Infected with *Leishmania infantum*. **J. Parasitol.**, v. 102, p. 275–279, 2016.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com Leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São

Paulo (Brasil). **Clínic. Vet.**, v. 28, p.36-44, 2000.

FUJIWARA, S.; YASUNAGA, S.; IWABUCHI, S.; MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from dogs experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.93, p.9–20., 2003.

FUNG, A.; VIZCAYCHIPI, M.; LLOYD, D.; WAN, Y.; MA, D. Central nervous system inflammation in disease related conditions: Mechanistic prospects. **Brain Res.**, p.144-155, 2012.

GAMA, F.G.V.; NISHIMORI, C.T.; SOBREIRA, M.R.; SANTANA, A.E. Evaluation of electrophoretic profile and albumin quota in the cerebrospinal fluid of dogs with distemper showing or not nervous signs. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, p.77–80, 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, p.539–546, 1996.

GIANNUZZI, A.P.; RICCIARDI, M.; DE SIMONE, A.; GERNONE, F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. **J.Small. Pract.**, v. 58, p.125–138, 2017.

GRANO, F.G.; MELO, G.D.; BELINCHÓN-LORENZO, S.; GOMEZ-NIETO, L.C.; MACHADO, G.F. First detection of *Leishmania infantum* DNA within the brain of naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 204, p.376-380, 2014.

HOSEIN, S.; DAMER, P.; BLAKE, D.P.; SOLANO-GALLEGU, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology.** v.144, p.95-115, 2016.

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

nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.44, p.5-11, 2007.

KAUR, C.; RATHNASAMY, G.; LING, E.A. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** v. 75, p.198–213, 2016.

LIMA, V.M.F.; PEIRÓ, J.R.; VASCONCELOS, R.O. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 115, p. 189–193, 2007.

LIMA, V.M.F.; BIAZZONO, L.; SILVA, A.C.; CORREA, A.P.F.L.; LUVIZOTTO, M.C.R. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.25, p.215–218, 2005.

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. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, p.485-489, 2003.

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

MAIA, C. S. F.; MONTEIRO, M. C.; GAVIOLI, E. C.; OLIVEIRA, F. R.; OLIVEIRA, G. B.; ROMÃO, P. R. T. Neurological disease in human and canine leishmaniasis – clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunol.**, v. 37, p. 385-393, 2015.

MACHADO, G.F.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; MARCONDES, M.; PERRI, S.H.V.; VASCONCELOS, R.O. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.136, p. 340–345, 2010.

MARANGONI, N.R.; MELO, G.D.; MORAES, O.C.; SOUZA, M.S.; PERRI, S.H.V.; MACHADO, G.F. Levels of matrix metalloproteinase-2 and

metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis.

Parasite Immunol., v.33, p.330-334, 2011.

MARQUES, F.; SOUSA, J.C.; CORREIA-NEVES, M.; OLIVEIRA, P.; SOUSA, N.; PALHA, J. A. The choroid plexus response to peripheral inflammatory stimulus.

Neuroscience, v.144, p.424-430, 2007.

MARQUES, F.; SOUSA, J.C.; COPPOLA, G.; GESCHWIND, D.H; SOUSA, N.; PALHA, J.A.; CORREIA-NEVES, M.The choroid plexus response to a repeated peripheral inflammatory Stimulus. **BMC Neurosci.**, v.10, p.135, 2009.

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J.R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 25, p.142–146, 2013.

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

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

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; MACHADO, G.F. Canine cerebral leishmaniasis: potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 148, p. 260–266, 2012.

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, p. 248-256, 2009.

MELO, G.D.; SILVA, J.E.S.; GRANO, F.G.; HOMEM, C.G.; MACHADO, G.F. Compartmentalized gene expression of toll-like receptors 2, 4 and 9 in the brain and peripheral lymphoid organs during canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 36, p. 726-731, 2014.

MELO, G.D.; SILVA, J.E.; GRANO, F.G.; SOUZA, M.S.; MACHADO, G.F. Leishmania infection and neuroinflammation: Specific chemokine profile and absence of parasites in the brain of naturally- infected dogs. **J. Neuroimmunol.**, v. 289, p.21-29, 2015.

MELO, G.D.; GRANO, F.G.; SILVA, J.E.; KREMMER, B.E; LIMA, V.M.F.; MACHADO, G.F. Blood–brain barrier disruption during spontaneous canine visceral Leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v.37, p. 635–645, 2015.

MELO, G.D.; SERAGUCI, T.F.; SCHWEIGERT, A.; SILVA, J.E.S.; GRANO, F.G.; PEIRÓ, J.R.; LIMA, V.M.F.; MACHADO, G.F. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Vet. Parasitol.**, v. 192, p. 57– 66, 2013.

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

MESQUITA, L.P.; BRUHN, F.R.P.; MAIORKA, P.C.; HOWERTH, E.W. Expression Kinetics of RANTES and MCP-1 in the Brain of Deer Mice (Peromyscus maniculatus) Infected with Vesicular Stomatitis New Jersey Virus **J. Comp. Path.**, v.155, p.326-338, 2016.

MITCHELL, K.; YANG, H.Y.T.; BERK, J.D.; TRAN, J.H.; LADAROLA, M.J. Monocyte chemotractant protein-1 in the choroid plexus: a potential link between vascular pro-inflammatory mediators and the CNS during peripheral tissue inflammation. **J. Neurosci.**, v. 158, p. 885–895, 2009.

MOGK, S.; MEIWES, A.; SHTOPEL, S.; SCHRAERMAYER, U.; LAZARUS, M.; KUBATA, B.; WOLBURG, H.; DUSZENKO, M. Cyclical appearance of African

trypanosomes in the cerebrospinal fluid: new insights in how trypanosomes enter the CNS. **Plos One**, v.3, p. 91372, 2014.

MURTA, V.; FARÍAS, M.I.; PITOSI, F.J.; FERRARI, C.C. Chronic systemic IL-1 β exacerbates central neuroinflammation independently of the blood–brain barrier integrity. **J. Neuroimmunol.**, v. 278, p. 30–43, 2015.

NASCIMENTO, P.R.; MARTINS, D.R.; MONTEIRO, G.R.; QUEIROZ, P.V.; FREIRE-NETO, F.P.; QUEIROZ, J.W.; MORAIS LIMA, A.L.; JERONIMO, S.M. Association of pro-inflammatory cytokines and iron regulatory protein 2 (IRP2) with *Leishmania* burden in canine visceral leishmaniasis. **Plos One**, v. 8, p. 1-10, 2013.

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, p. 346-347, 1996.

OLIVEIRA, V.C.; BOECHAT, V.C.; MENDES JUNIOR, A.A.V.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C.; FIGUEIREDO, B.F.; CAMPOS, M.P.; RODRIGUES, F.C.C.; OLIVEIRA, R.V.C.; AMENDOEIRA, M.R.R.; MENEZES, R.C. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PLoS One**, v.12, p. e0175588, 2017.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A. Guideline for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 236, p. 1184-1191, 2010.

PANCOTTO, T.; ROSSMEISL, J.H.; PANCIERA, D.L, ZIMMERMAN, K.L Blood-brain-barrier disruption in chronic canine hypothyroidism. **Vet Clin Pathol.**, v. 39, p. 485-493, 2010.

PETERS, I.R.; HELPS, C.R.; CALVERT, E.L.; HALL, E.J.; DAY, M.J. Cytokine mRNA quantification in histologically normal canine duodenal mucosa by real-time RT-PCR. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.103, p.101–111, 2005.

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

RANASINGHE, S.; ROGERS, M.E.; HAMILTON, J.G.C.; BATES, P.A.; MAINGON, R.D.C. A real-time PCR assay to estimate *Leishmania chagasi* load in its natural sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Trans. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.102, p.875-882, 2008.

RANSOHOFF, R.M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 569–581, 2003.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORREA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 28, p. 87–95, 2009.

SANTOS, A.C.; BARSANTE, M.M.; ARANTES, R.M.; BERNARD, C.C.; TEIXEIRA, M.M. CCL2 and CCL5 mediate leukocyte adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis e an intravital microscopy study. **J. Neuroimmunol.**, v.162, p.122-129, 2005.

SANTOS, P.L.; OLIVEIRA, F.A.; SANTOS, M.L.B.; CUNHA, L.C.S.; LINO, M.T.B.; OLIVEIRA, M.F.S.; BOMFIM, M.O.M.; SILVA, A.M.; MOURA, T.R.M.; JESUS, A.R.; DUTHIE, M.S.; REED, S.G.; ALMEIDA, R.P. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 10, p. e0004375, 2016.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRO, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites Vect.**, v. 4, p. 86, 2011.

SORJONEN, D. C. Total protein, albumin quota, and electrophoretic patterns in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disorders. **Am. J. Vet. Res.**, v. 48, p. 301-305, 1987.

STRACK, A.; ASENSIO, V.C.; CAMPBELL, I.L.; SCHLÜTER, D.; DECKERT, M. Chemokines are differentially expressed by astrocytes, microglia and inflammatory leukocytes in Toxoplasmaencephalitis and critically regulated by interferon-gamma. **Acta Neuropathol.**, v. 103, p. 458-468, 2002.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Vet. Res.**, v. 38, p. 547-564, 2007.

STRAZIELLE, N.; CREIDY, R.; MALCUS, C.; BOUCRAUT, J.; GHERSI-EGEA, J.F. T-Lymphocytes Traffic into the Brain across the Blood-CSF Barrier: Evidence Using a Reconstituted Choroid Plexus Epithelium **PLOS ONE**. Disponível em < DOI:10.1371/journal.pone.0150945.2016>. p. 0150945, 2016.

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

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, p. 23-27, 2001.

VORBRODT, A. W.; DOBROGOWSKA, D. H. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. **Brain. Res. Rev.**, v. 42, p. 221–242, 2003.

CAPÍTULO 3 – IMPLICAÇÕES

Desde 2011 tenho participado de inúmeros trabalhos com objetivo de compreender a fisiopatogenia da infecção periférica por *Leishmania* spp. e as lesões observadas no encéfalo. Dessa maneira, o presente estudo foi continuação de estudos anteriores onde observou-se aumento na expressão gênica de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias no encéfalo de cães com LV e disfunção da BHE.

Avaliando todos os resultados apresentados nesta tese podemos concluir que:

- Cães com LV apresentam infiltrado inflamatório constituído por células mononucleares principalmente em leptomeninges e PC, sem correlação com estadiamento clínico do animal.
- O PC pode ser uma importante porta de entrada da *Leishmania* para o SNC uma vez que encontramos formas amastigotas nesse tecido. Além disso o DNA de *Leishmania* encontrado também no PC poderia estar desencadeando resposta imunológica específica no SNC.
- Com a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no liquor, além da presença elevada de albumina e do aumento do quociente de albumina, podemos concluir que há aumento da permeabilidade da BHE cães com LV.
- O aumento de expressão gênica da quimiocina CCL-5 e tendência no aumento da expressão gênica da CXCL-10 no PC de cães com LV, mostram que essas quimiocinas podem estar envolvidas na quimiotaxia de células inflamatórias encontradas no PC de cães com LV. Ao contrário da CCL-3 e CCL-4 que a expressão gênica no PC não apresentou diferença com o grupo controle.

- PC mostrou-se não participar ativamente no aumento de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ em cães com LV. Isto indica que essas citocinas, já observadas no encéfalo previamente, poderiam estar sendo produzidas em outras áreas encefálicas, e não no PC. Essas citocinas poderia estar sendo produzidas por outras células do encéfalo como astrócitos e micróglia, que podem ser estimuladas por mediadores inflamatórios da resposta periférica.
- Não foi detectada a produção de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α e IFN- γ no soro e no liquor tanto de cães saudáveis como de cães infectados. A ausência de detecção dessas citocinas nesse tipo de amostra pode ser devido a elas estarem em baixa concentrações ou até mesmo na baixa sensibilidade do método utilizado nesse estudo.