

# **RESSALVA**

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/02/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus Araçatuba

**MARIA CECÍLIA CLARINDO PELLISSARI**

**Reação inflamatória no sistema nervoso central de cães com leishmaniose visceral e pesquisa de amastigotas e linfócitos T na medula espinhal**

**Araçatuba**

**2023**

**MARIA CECÍLIA CLARINDO PELLISSARI**

**Reação inflamatória no sistema nervoso central de cães com leishmaniose visceral e pesquisa de amastigotas e linfócitos T na medula espinhal**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Adjunta Gisele Fabrino Machado

**Araçatuba**

**2023**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

P391r	<p>Pellissari, Maria Cecília Clarindo</p> <p>Reação inflamatória no sistema nervoso central de cães com leishmaniose visceral e pesquisa de amastigotas e linfócitos T na medula espinhal / Maria Cecília Clarindo Pellissari. -- Araçatuba, 2023</p> <p>72 f.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba</p> <p>Orientadora: Gisele Fabrino Machado</p> <p>1. Leishmania. 2. Mielite. 3. Neurite. 4. Linfócito T. I. Título.</p>
-------	---

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


Título: REAÇÃO INFLAMATÓRIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL E PESQUISA DE AMASTIGOTAS E LINFÓCITOS T NA MEDULA ESPINHAL

AUTORA: MARIA CECILIA CLARINDO PELLISSARI

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

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

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

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

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

Araçatuba, 07 de fevereiro de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

Título: REAÇÃO INFLAMATÓRIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL E PESQUISA DE AMASTIGOTAS E LINFÓCITOS T NA MEDULA ESPINHAL


AUTORA: MARIA CECILIA CLARINDO PELLISSARI

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

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

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

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

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

Araçatuba, 07 de fevereiro de 2023.

**Dedico este trabalho à minha família, a qual sempre esteve comigo em todos os momentos, bons ou ruins, me apoiando sempre!**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha querida professora orientadora, Gisele Fabrino Machado, por todos os ensinamentos, conselhos, pelo ombro amigo, pelas conversas, por ouvir meus desabaços, e muitas outras coisas das quais sempre vou me lembrar e agradecer.

À professora Maria Cecília Rui Luvizotto, por todo o apoio e aprendizado desde sempre na patologia, sempre foi um dos meus maiores exemplos como pessoa e profissional.

Aos professores da FMVA/UNESP Araçatuba, por compartilharem todo o conhecimento necessário para a minha formação acadêmica, agradeço a cada um de vocês por esta nobre contribuição. Em especial, à professora Daniela Bernadete Rozza, por ter me orientado durante meu estágio docência, no qual aprendi muito e descobri minha verdadeira paixão pela área acadêmica e docência.

Agradeço ao nosso responsável técnico de histologia Lorinaldo Lopes de Moraes, pelo auxílio no processamento dos materiais, e a todos os colegas envolvidos na pesquisa, principalmente Ednilson Doná Frigério, Giulia Gonçalves Jussiani e Karen Santos Março.

E por último, mas não menos importante, aos meus amigos, colegas de classe, veteranos, calouros, residentes, mestrandos e doutorandos, que contribuíram de alguma forma para a minha formação, seja com uma palavra, um abraço, um resumo de prova, um conselho, uma dica, gostaria de saudá-los também neste momento tão especial.

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

---

***“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” (Theodore Roosevelt)***

---

PELLISSARI, M. C. C. **Reação inflamatória no sistema nervoso central de cães com leishmaniose visceral e pesquisa de amastigotas e linfócitos T na medula espinhal.** 2023. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## RESUMO

O sistema nervoso central é composto por encéfalo e medula espinhal, ao passo que gânglios nervosos e nervos constituem o sistema nervoso periférico. Lesões inflamatórias na medula espinhal relacionadas à Leishmaniose Visceral são pouco descritas na literatura humanos ou animais. O presente estudo tem como objetivo caracterizar a distribuição e intensidade da inflamação encefálica e medular de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Além disso, verificar a presença e distribuição de linfócitos TCD3 e investigar possíveis vias de migração destas células na medula espinhal de cães acometidos por Leishmaniose Visceral. Para tanto, foi realizada uma revisão bibliográfica consultando plataformas de bases de dados como PubMed, LILACS, SciELO, Google Scholar e Portal de Periódicos CAPES, com ênfase em artigos publicados entre os anos de 2000 a 2022, que abordavam as alterações neurológicas relacionadas à Leishmaniose, além de outros protozoários, afim de explanar as funções fisiológicas e patológicas das barreiras pertencentes ao sistema nervoso central e periférico, e as possíveis vias de migração leucocitária e entrada de agentes infecciosos no sistema nervoso.

**Palavras-chave:** *Leishmania*. Mielite. Encefalite. Linfócito T.

PELLISSARI, M. C. C. **Inflammatory reaction in the central nervous system of dogs with visceral leishmaniasis and investigation of amastigotes and T lymphocytes in the spinal cord.** 2023. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

## **ABSTRACT**

The central nervous system is composed of the encephalon and spinal cord, whereas nerve ganglia and nerves constitute the peripheral nervous system. Inflammatory lesions in the spinal cord related to Visceral Leishmaniasis are poorly described in human or animal literature. The present study aims to characterize the distribution and intensity of brain and spinal cord inflammation in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. In addition, to verify the presence and distribution of TCD3 lymphocytes and investigate possible migration pathways of these cells in the spinal cord of dogs affected by Visceral Leishmaniasis. To this end, a literature review was carried out consulting database platforms such as PubMed, LILACS, SciELO, Google Scholar and CAPES Periodical Portal, with emphasis on articles published between the years 2000 and 2022, which addressed the neurological changes related to Leishmaniasis, as well as other protozoa, in order to explain the physiological and pathological functions of the barriers belonging to the central and peripheral nervous system, and the possible routes of leukocyte migration and entry of infectious agents into the nervous system.

**Keywords:** *Leishmania*. Myelitis. Encephalitis. T lymphocytes.

## LISTA DE FIGURAS

### 1 INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1 - Representação esquemática das alterações que ocorrem na BHE em situações de ruptura ou não-ruptura ..... 19
- Figura 2 - Representação esquemática dos principais componentes da barreira hemato-medular (BHE) .....21
- Figura 3 - Representação esquemática das barreiras do SNP.....22

### 2 CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Exame macroscópico dos cães.....39
- Figura 2 - Representação anatômica das áreas do encéfalo avaliadas no presente estudo ..... 40
- Figura 3 - Fotomicrografias de cortes histológicos das regiões encefálicas dos cães com LV, demonstrando a distribuição e intensidade da inflamação..... 40
- Figura 4 - Fotomicrografias de cortes histológicos da medula espinhal de cães com LV, demonstrando diferentes intensidades de inflamação observadas em cortes corados por Hematoxilina-Eosina (HE), e a imunomarcagem para linfócitos TCD3+ revelada por DAB..... 42
- Figura 5 - Gráfico de colunas demonstrando o valor médio e desvio padrão (representado por barras) de linfócitos T CD3+ nos diferentes segmentos medulares (cervical, torácico e lombar) de cada grupo ..... 43
- Figura 6 - Fotomicrografia do canal medular de cão com LV ..... 47

### ANEXO A

- Figura S1 - Demonstração da graduação da reação inflamatória no encéfalo e medula espinhal ..... 70
- Figura S2 - Demonstração da contagem de linfócitos TCD3+ pelo software ImageJ (ferramenta “multipoint”) ..... 71
- Figura S3 - Representação esquemática das possíveis vias de migração leucocitária para a medula espinhal ..... 72

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Intensidade da inflamação na medula espinhal e encéfalo dos cães de cada grupo. Avaliações foram realizadas em cortes corados com HE...44

Tabela 2 - Distribuição e intensidade da reação inflamatória medular do grupo 1 ..44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome de imunodeficiência adquirida
APCs	Células apresentadoras de antígeno
BAMs	Macrófagos associados às fronteiras
BHE	Barreira-hemato-encefálica
BHL	Barreira hemato-liquórica
BHM	Barreira hemato-medular
BHN	Barreira hemato-neural
BHN	Barreira hemato-neural
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DCs	Células dendríticas
FMVA	Faculdade de medicina veterinária de Araçatuba
FOA	Faculdade de odontologia de Araçatuba
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humano
IFN- $\gamma$	Interferon - gama
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-	Interleucinas
ILCs	Células linfoides inatas
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
NO	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino
PC	Plexo coroide
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico

TB	<i>Trypanosoma brucei</i>
T-bet	Fator de transcrição associado a células T
TGF- $\beta$	Fator de crescimento transformador - beta
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral - alfa
ZO-1	<i>Zonula occludens</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	16
1.1 Inflamação no Sistema Nervoso Central .....	16
1.2 Barreiras do Sistema Nervoso Central .....	18
1.2.1 Barreira Hemato-encefálica (BHE) .....	18
1.2.2 Barreira Hemato-liquórica(BHL) .....	19
1.2.3 Barreira Hemato-medular(BHM).....	20
1.2.4 Barreira Hemato-neural (BHN) .....	21
1.3 Células da glia: astrócitos e micróglia .....	23
1.4 Linfócitos T no tecido nervoso.....	23
1.5 Resposta imune na Leishmaniose Visceral.....	24
1.6 Encefalite e mielite por protozoários .....	26
1.7 Comprometimento do tecido nervoso central e periférico na leishmaniose visceral .....	28
1.8 Justificativa.....	29
1.9 Objetivos .....	30
2 CAPÍTULO 1 - REAÇÃO INFLAMATÓRIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL E PESQUISA DE AMASTIGOTAS E LINFÓCITOS T NA MEDULA ESPINHAL .....	31
2.1 Resumo.....	32
2.2 Abstract .....	32
2.3 Introdução .....	33
2.4 Materiais e métodos .....	34
2.4.1 Animais.....	35
2.4.2 Análise histopatológica.....	36
2.4.3 Análise imuno-histoquímica.....	36
2.4.4 Análise Estatística .....	37
2.5 Resultados .....	37
2.6 Discussão.....	45
2.7 Conclusão .....	49

2.8 Financiamento.....	49
2.9 Referências .....	49
APÊNDICE A - REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	52
ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA .....	58
ANEXO B - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA .....	69
ANEXO C - FIGURAS SUPLEMENTARES.....	70

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Inflamação do Sistema Nervoso Central

O sistema nervoso é constituído por encéfalo, medula espinal e ramificações nervosas (nervos e gânglios). Encéfalo e medula espinal compõem o sistema nervoso central (SNC), enquanto os gânglios nervosos e nervos constituem o sistema nervoso periférico (SNP)

O sistema nervoso central (SNC) é considerado um órgão imuno-privilegiado devido à Barreira Hemato-Encefálica (BHE) e ao número relativamente reduzido de linfócitos (imunovigilância periférica), encontrados no parênquima cerebral. No entanto, no contexto da inflamação crônica, há evidências que sugerem a entrada de células imunes periféricas no SNC, como monócitos, os quais são altamente fagocíticos e se proliferam e se diferenciam ao redor de áreas que sofreram injúrias, com o objetivo de fagocitar patógenos e debris celulares (DIONISIO-SANTOS; OLSCHOWKA; O'BANION, 2019).

Em condições fisiológicas, as barreiras limitam a imunovigilância de linfócitos T periféricos, impedindo que estes atravessem para o tecido nervoso, promovendo danos através de uma resposta imune adaptativa exacerbada (CROESE; CASTELLANI; SCHWARTZ, 2021). Assim, células residentes do tecido nervoso, responsáveis pela imunidade inata, como as células gliais, astrócitos e micróglia, são as principais responsáveis pela imunovigilância no SNC, podendo reagir ao aumento de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas), à indutores exógenos (padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs) ou endógenos (padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (KIGERL *et al.*, 2014).

Apesar dos mecanismos de proteção das barreiras, sabe-se que o sistema nervoso é suscetível aos efeitos da inflamação crônica sistêmica, bem como à invasão de patógenos, e pode desenvolver resposta imune inata e adaptativa específicas (CROESE; CASTELLANI; SCHWARTZ, 2021). A presença crônica de mediadores pró-inflamatórios na circulação sistêmica pode promover alterações nas barreiras cerebrais, permitindo a infiltração de células imunes periféricas, como linfócitos e monócitos, entre outras, além dos patógenos (RANSOHOFF; BROWN, 2012). Ainda, os mediadores inflamatórios promovem a ativação da micróglia e astrócitos, que passam a produzir imunomoduladores e expressar receptores

relacionados à imunidade inata, como os receptores para sistema complemento ou receptores do tipo Toll (TLRs) (RANSOHOFF; BROWN, 2012). A micróglia, cuja função é análoga a de macrófagos periféricos, é responsável pela remoção de debris celulares e patógenos por meio da fagocitose, e, ao ser ativada, produz uma série de mediadores pró ou anti-inflamatórios, incluindo citocinas, proteínas neurotóxicas, quimiocinas e fatores neurotróficos (DIONISIO-SANTOS; OLSCHOWKA; O'BANION, 2019).

A entrada de agentes infecciosos no sistema nervoso central pode ocorrer via hematogena, como no caso de bactérias, via infecção de células endoteliais ou através da BHE pela entrada de células mononucleares infectadas. Algumas áreas do SNC possuem capilares fenestrados, como o plexo coroide e órgãos circumventriculares, por onde agentes infecciosos podem ter acesso ao cérebro diretamente (GIANNUZZI *et al.* 2017).

Lesões traumáticas da medula espinal resultam em danos diretos nos axônios, corpos celulares neuronais e na glia, que causam perdas funcionais abaixo do local de lesão. A inflamação na medula espinal é uma resposta complexa que envolve células residentes do sistema nervoso central, bem como infiltrações de células imunes, e é mediada por uma variedade de vias moleculares e moléculas de sinalização (DAVID; ZARRUK; GHASEMLOU, 2012).

O sistema nervoso central, similarmente aos outros tecidos, também possui um sistema imune inato, representado por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como receptores Toll-like (TLRs), os quais são capazes de reconhecer certas estruturas moleculares, patógenos ou alterações de constituintes teciduais. (VANDEVELDE *et al.* 2012).

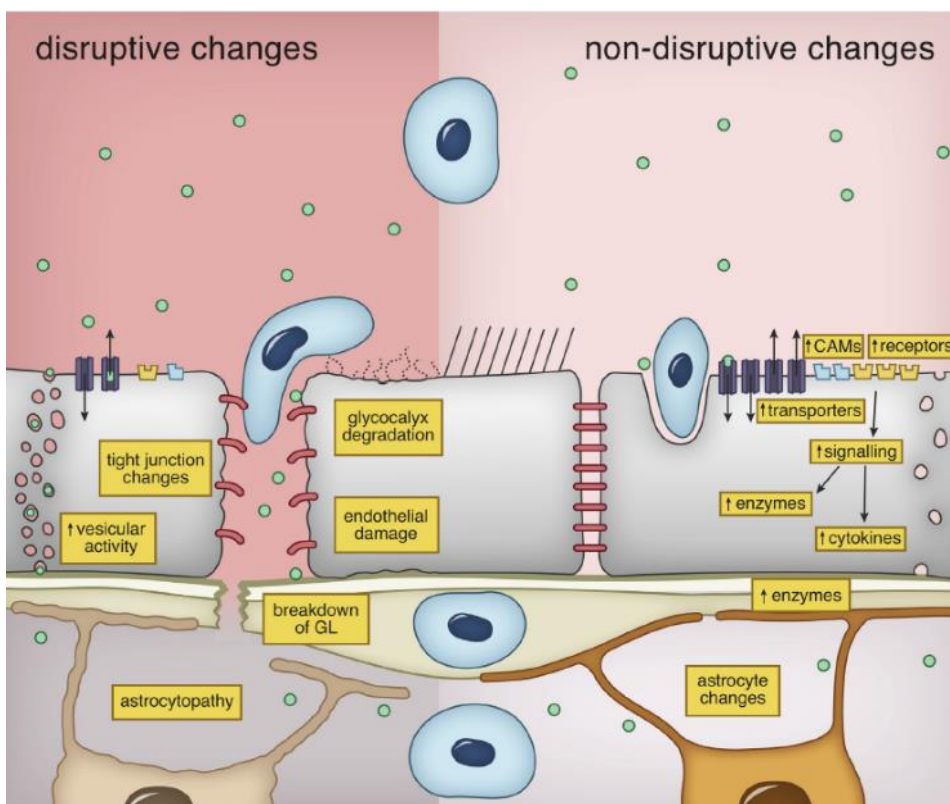
Os efeitos da inflamação sistêmica adaptativa na função do SNC pode ter efeitos benéficos, quando ocorre uma resposta inflamatória controlada, ou pode ter efeitos deletérios, quando a inflamação persiste de maneira descontrolada e é exacerbada devido à presença contínua de citocinas pró-inflamatórias, ou pela falha ou inibição de citocinas antiinflamatórias (PERRY, 2007).

## 1.2 Barreiras do Sistema Nervoso Central

### 1.2.1 Barreira Hemato-encefálica (BHE)

Histologicamente, a barreira hemato-encefálica é uma unidade neurovascular especializada composta por diversas camadas: um glicocálix contínuo e espesso, células endoteliais não-fenestradas com reduzida atividade vesicular e conectadas por junções oclusivas; duas membranas basais (a endotelial e a dos astrócitos da glia limitante interna, além dos pés terminais de astrócitos. Ao nível molecular, há ectoenzimas, receptores e moléculas transportadoras nas diversas camadas, as quais regulam ou revertem o trânsito de moléculas através da BHE. Juntos, tais elementos fornecem um microambiente estável ao SNC, o qual é único pelos seguintes motivos: composição iônica diferencial, necessária para a função neuronal; um pool de neurotransmissores especializados; baixa concentração proteica para minimizar a proliferação celular; baixa exposição a toxinas sistêmicas, para minimizar danos neuronais, e reduzido transporte de células e moléculas inflamatórias, para minimizar a inflamação local, em condições normais. Mudanças na permeabilidade da BHE podem ser relacionadas ou não à ruptura em si ou ao aumento da permeabilidade da mesma. Quando ocorre a ruptura da BHE, esta é acompanhada por danos endoteliais ou nas junções oclusivas, além de danos aos astrócitos, ao passo que quando não ocorre a ruptura, as mudanças ocorrem à nível molecular, como por exemplo alterações enzimáticas. (Fig. 1) (VARATHARAJ; GALEA, 2017).

**Figura 1 - Representação esquemática das alterações que ocorrem na BHE em situações de ruptura ou não-ruptura.**



As mudanças quando ocorre a ruptura ocorrem a nível histológico, com alterações nas junções oclusivas, denudação do glicocálix, aumento do tráfico vesicular, re-indução da fenestração capilar, disfunção da glia limitante, astropatias em associação com mudanças endoteliais. Já quando não ocorre a ruptura, as alterações ocorrem a nível molecular, e são a produção de citocinas pelas células endoteliais, aumento de receptores endoteliais e moléculas transportadoras, modulação da função dos astrócitos e aumento da invasão de patógenos.

Fonte: VARATHARAJ, GALEA, 2017.

### 1.2.2 Barreira Hemato-liquórica (BHL)

A barreira hemato-liquórica (BHL) consiste em uma camada simples de células endimárias localizadas revestindo o plexo coroide (PC), que garantem a separação entre o plasma e o líquido. É responsável por vedar a passagem de substâncias sanguíneas para o líquido por meio de difusão passiva, de forma que a passagem de substâncias ocorre unicamente por canais de proteínas transmembrana, de forma semelhante a BHE (HAQQANI *et al.*, 2011). Com um fluxo sanguíneo rápido (10x maior que no cérebro) e capilares altamente permeáveis, o PC humano fornece ao SNC uma elevada taxa de renovação de fluido contendo micronutrientes, peptídeos e hormônios para redes neuronais. O movimento de proteínas/peptídeos através da BHL é muito limitado, ocorrendo por vias

paracelulares através de junções oclusivas incompletas e pinocitose/exocitose transcelular de baixa capacidade. As células da BHL também são unidas na porção apical por junções do tipo oclusivas e separadas por uma fina membrana basal. Sua função é fundamental, visto que o líquido tem acesso a todo o SNC e medula espinal por meio do espaço perivascular (JOHANSON; STOPA; MCMILLAN, 2010).

### 1.2.3 Barreira Hemato-medular (BHM)

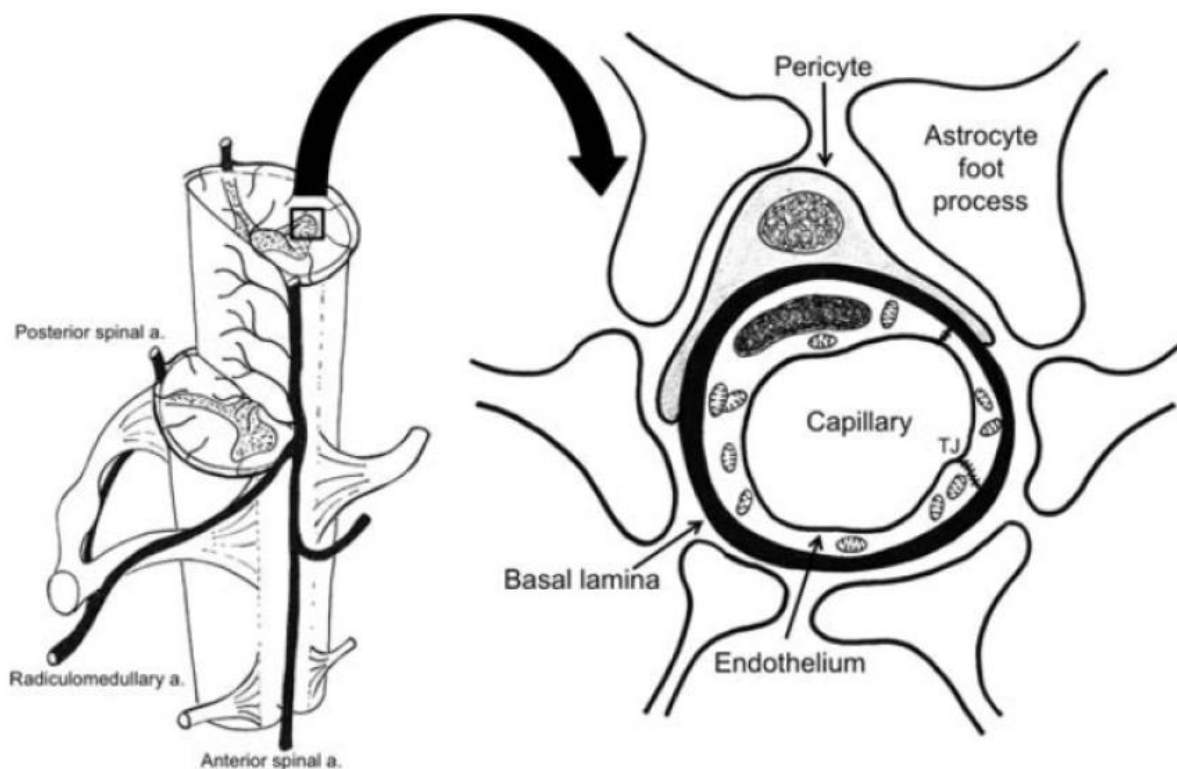
A barreira hemato-medular é uma estrutura fundamental para a ocorrência de reações inflamatórias na medula espinal. Esta ainda necessita de mais investigações sobre seu papel nas desordens neurológicas medulares, e ainda é considerada como uma extensão da BHE, porém, possuem componentes estruturais similares com diferenças funcionais que podem diferir quanto ao seu papel nas desordens medulares (CHOPRA *et al.*, 2021).

A função dos capilares da barreira hemato-medular (BHM) é baseada em um sistema especializado de células endoteliais não fenestradas e estruturas acessórias, incluindo a membrana basal, pericitos e pés terminais de astrócitos. A interação destas estruturas constitui as funções regulatórias e protetoras da BHM (BARTANUSZ *et al.*, 2011) (Figura 2).

As células da BHM são responsáveis por restringir ou permitir a entrada de moléculas do sangue para a medula espinal. A membrana basal desempenha um papel no bloqueio da entrada de macromoléculas, fornecendo integridade estrutural para as células e as separando dos pericitos, cuja função é associada a proliferação, migração e diferenciação das células endoteliais. Adjacente à lâmina basal, os processos astrocíticos mantêm a integridade funcional e estrutural das características da barreira, como polaridade e permeabilidade (CHOPRA *et al.*, 2021).

As proteínas das junções oclusivas que compõem a BHM são principalmente a claudina-1, claudina-5 e ocludina, assim como proteínas que compõem a *Zonula occludens* (ZO-1). A maior permeabilidade da BHM tem sido atribuída a níveis reduzidos de proteínas específicas, como a ocludina e ZO-1 (CHOPRA *et al.*, 2021). Estudos atestaram maior permeabilidade de citocinas inflamatórias como interferons (IFNs) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) na medula espinal em relação ao encéfalo (PAN; BANKS; KASTIN, 1997).

**Figura 2 - Representação esquemática dos principais componentes da barreira hemato-medular (BHE).**



As artérias vertebrais (não mostradas) e artérias radiculomedulares segmentadas que constituem o sistema que fornece suporte sanguíneo às artérias espinais posteriores e anteriores. A barreira da medula espinhal consiste de células endoteliais não fenestradas ligadas por junções oclusivas, lâmina basal, pericitos e pés terminais de astrócitos.

Fonte: BARTANUSZ et al. 2011.

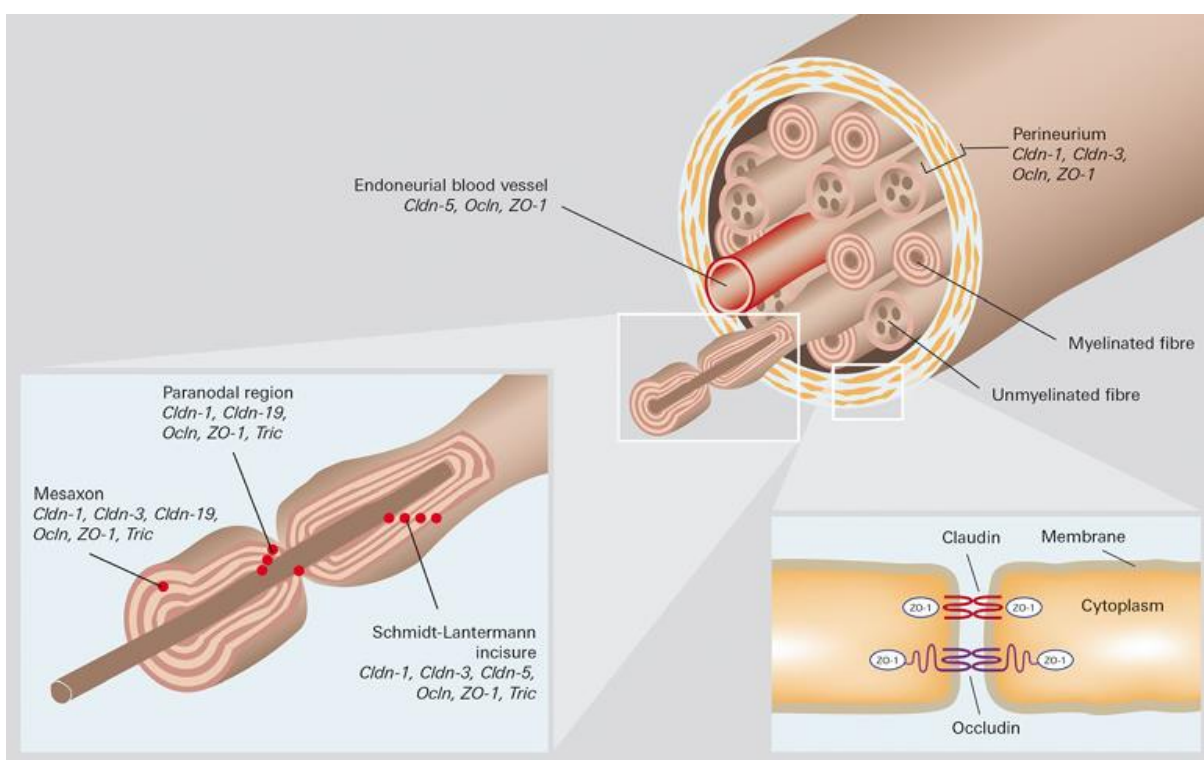
#### **1.2.4 Barreira Hemato-Neural (BHN)**

A barreira hemato-neural (BHN) é uma barreira seletiva formada pelas células endoteliais dos capilares do SNP tipicamente circundada por prolongamentos astrocíticos, localizada entre o perineuro e os capilares endoneurais (KIM *et al.*, 2006). Estruturalmente, é muito semelhante a BHE e BHM, porém é considerada mais permeável, devido a menor quantidade de junções oclusivas entre as células (KAPLAN; CHOW; GU, 2020). Os astrócitos desempenham um papel crítico na indução e manutenção da BHN, regulando positivamente proteínas a transcrição das proteínas de junções oclusivas e de proteínas transportadores (KIM *et al.*, 2006).

Portanto, deve-se considerar a possibilidade de entrada de leucócitos e

agentes infecciosos através da barreira hemato-neural (BHN), devido ao contato direto do endotélio microvascular do endoneuro com a circulação sanguínea sistêmica. Alterações estruturais nos vasos endoneurais ou interações com leucócitos hematógenos são descritas em diversos casos de neuropatias periféricas em humanos, e pode ser um fator que contribui na fisiopatogenia de doenças infecciosas, visto que a BHN é uma interface crucial entre a circulação sistêmica e o compartimento interno de nervos periféricos e raízes nervosas que emergem da medula espinhal (UBOGU, 2021). Além disso, fibras nervosas mielinizadas possuem uma barreira adicional, a barreira de mielina, formada pelo mesaxônio, incisuras de Schmidt-Lantermann e a região perinodal, nos quais se encontram proteínas de junções oclusivas como claudinas e ocludinas (Figura 3) (REINHOLD; RITTNER, 2016).

**Figura 3 - Representação esquemática das barreiras do SNP**



Observar a BHN, que consiste nas células endoteliais de vasos perineurais e endoneurais, com junções oclusivas, e a BM, formada pelo mesaxônio, incisuras de Schmidt-Lantermann e a região perinodal.

Fonte: REINHOLD; RITTNER (2016)

### 1.3 Células da glia: Astrócitos e micróglia

As funções dos astrócitos incluem a participação na manutenção da barreira hematoencefálica e hemato-liquórica, regulação do fluxo sanguíneo, metabolismo energético, suporte antioxidativo, homeostase hidroeletrolítica, e defesa imune formando a glia limitante externa na base da pia-máter, transmissão sináptica e neurogênese (OBERHEIM; GOLDMAN; NEDERGAARD, 2012). Os efeitos da heterogeneidade regional dos astrócitos sob as funções anteriormente citadas têm sido amplamente investigados. Astrócitos protoplasmáticos predominam por toda a substância cinzenta, e sua morfologia caracteriza-se por numerosos prolongamentos que originam delicadas ramificações dispostas de forma globoide e uniforme. Já os astrócitos fibrosos são comumente encontrados na substância branca, e exibem morfologia de longos processos semelhantes a fibras. Ambos os subtipos fazem contato extenso com vasos sanguíneos (SOFRONIEW; VINTERS, 2009).

A micróglia, sensores constantes às mudanças no microambiente do SNC, possui funções como restabelecer a homeostase, mas também servem como células imunes primárias do SNC, regulando a resposta imune inata e a função dos astrócitos reativos, determinando suas funções como neuroprotetoras ou neurotóxicas. Por outro lado, os astrócitos secretam moléculas que regulam os fenótipos e funções da micróglia, desde a motilidade até sua atividade fagocítica. Portanto, a interação microglia-astrócitos é fundamental para a manutenção da homeostase e detecção de distúrbios no SNC (JHA *et al.*, 2019).

### 1.4 Linfócitos T no tecido nervoso

Durante a imunovigilância, células T podem patrulhar as regiões periféricas relacionadas ao SNC (ventrículos, plexo coroide e leptomeninges), que são sítios mais expostos e menos restritos que o parênquima do tecido nervoso, e detectar alterações. Enquanto o acesso ao parênquima do SNC é restrito em condições normais, diversos processos podem iniciar a invasão de células T ao parênquima. Tais células são incapazes de reconhecer antígenos nativos, mas reconhecem pequenos peptídeos ligados à molécula do complexo MHC e apresentadas na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs). Macrófagos associados às fronteiras (BAMs), células dendríticas (DCs), células linfoides inatas (ILCs), células T, monócitos e granulócitos fazem parte da interface imune entre o

parênquima e o ambiente externo ao SNC. Somente células que foram ativadas sistemicamente antes de entrarem no parênquima nervoso são capazes de invadí-lo, e se acumular nas meninges e ao redor de vasos, enquanto células T em repouso são incapazes de adentrar a BHE (MUNDT *et al.*, 2019).

Células T que adentram o SNC por via hematogena podem se utilizar de três rotas: vasos do plexo coroide, das leptomeninges ou do parênquima propriamente dito. Qual via tais células imunes podem utilizar para a imunovigilância do SNC ou quando elas podem iniciar um processo autoimune, como em casos de esclerose múltipla em humanos, ainda continua em debate entre autores (MUNDT *et al.*, 2019; PINHEIRO *et al.*, 2016; ZHU; PAUL, 2009).

## 1.5 Resposta imune durante a leishmaniose visceral

No que diz respeito à resposta imune inata, a *Leishmania spp.* desenvolveu estratégias para perpetuar a infecção e reprodução em células infectadas. Um dos mecanismos é conhecido como o uso da apoptose de células infectadas a seu favor, uma vez que parasitos mortos induzem a exposição de fosfatidilserina, um fosfolípido de membrana que sinaliza a fagocitose de corpos apoptóticos. O reconhecimento da fosfatidilserina presente na membrana celular de parasitos mortos favorece a “invasão silenciosa” de novas células e induz a produção de citocinas antiinflamatórias como TGF- $\beta$ . Além disso, o parasito retarda a apoptose de neutrófilos, inibindo a síntese de caspase-3 e de proteínas anti-apoptóticas. Este fenômeno é essencial para que haja mais células apresentadoras de antígenos (APCs) no local de infecção e o parasito possa infecta-las, ou seja, enquanto outros parasitos intracelulares têm mecanismos de evasão do sistema imune, a *Leishmania spp.* deve cooperar com diferentes moléculas efetoras do sistema imune inato para sobreviver (CECÍLIO *et al.* 2014).

Enquanto o a resposta imune inata do hospedeiro contra a leishmaniose é importante, é agora claro que a imunidade mediada por células T e as citocinas produzidas a partir de várias células imunes têm um papel crucial na determinação do resultado da doença. Neste contexto, o fenômeno conhecido como “dicotomia de Th1-Th2” tornou-se popular com base no papel das citocinas produzidas por estas células na progressão da doença e/ou proteção do hospedeiro (DAYAKAR *et al.*, 2019).

As células TCD4, conhecidas como células T auxiliares, regulam a resposta imune celular e humoral adequadas a uma vasta gama de agentes patogênicos e envolvem-se no progresso de muitas doenças, como a LV, pela produção de células B, hipergamaglobulinemia e depósito de imunocomplexos. Elas recrutam e ativam outras células imunes incluindo células B, células CD8 T, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Com base nas suas funções, no seu padrão de secreção de citocinas e na expressão de fatores específicos de transcrição, as células, diferenciadas das células TCD4 ativadas são classificadas em quatro linhagens principais, células Th1, Th2, Th17 e T reguladoras (Treg) (ZHANG *et al.*, 2014).

A recuperação do hospedeiro na LV é dependente principalmente da resposta Th1, na qual há indução da produção de células T pela interleucina-12 (IL-12) de células dendríticas e macrófagos. Células T ativadas produzem óxido nítrico (NO), o qual é responsável pela destruição do parasito (BACELLAR *et al.*, 1996; DAYAKAR *et al.*, 2019; GHALIB *et al.*, 1995).

No que diz respeito à ação de citocinas na Leishmaniose Visceral Canina (LVC), aquelas relacionadas à progressão da doença são IL-4 e IL-10, as quais desativam macrófagos e suprimem a resposta imune Th1, ou seja, a resposta imune celular responsável pela fagocitose de amastigotas (SAMANT *et al.*, 2021); a IL-6, que estimula a hipergamaglobulinemia e, portanto, aumenta a deposição de complexos imunes em diversos órgãos vitais que contribuem para a piora do quadro clínico do animal (LIMA *et al.*, 2003); a IL-10 em sinergia com o fator de crescimento TGF- $\beta$ , o qual inibe a proliferação de células T e a ativação de macrófagos, a expressão de iNOS, TNF- $\alpha$  e IFN- $\chi$  (DAYAKAR *et al.*, 2019). Já as citocinas envolvidas na proteção do hospedeiro são o IFN- $\gamma$ , o qual ativa macrófagos, e, portanto, a destruição de formas amastigotas de *Leishmania spp.* em colaboração com TNF- $\alpha$  e a IL-2, responsável pela ativação de iNOS; a IL-12 e IL-15, as quais estimulam a expressão de T-bet, um fator de transcrição que regula a expressão de quimiocinas na resposta imune celular (LAZAREVIC; GLIMCHER, 2011) e modulam a expressão da proteína de morte celular programada (PD-1) em linfócitos (COSTA *et al.*, 2020).

Há relatos em humanos sobre o papel da IL-15, a qual ativa ambas respostas Th1 e Th2 e demonstra um papel pleiotrópico, induz a proliferação de células T, inibe

a apoptose, preserva células T de memória e a maturação de células B. Outra citocina que possui papel duplo na imunologia durante a LV humana é a IL-17, a qual induz a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 e quimiocinas; afeta a função de neutrófilos, reduzindo a apoptose, além de induzir a produção de IL-6 (DAYAKAR *et al.*, 2019).

## 1.6 Encefalite e mielite por protozoários

As manifestações neurológicas por protozoários têm sido reportadas em humanos em casos de infecções por *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e espécies de *Leishmania* como *L. amazonensis* e *L. infantum* em humanos, principalmente em regiões tropicais nas quais tais doenças afetam desproporcionalmente populações de baixa renda. Apesar de algumas doenças terem manifestações neurológicas conhecidas, como nos casos da doença de Chagas, muitas outras recebem pouca atenção com relação às complicações neurológicas e devem ser reconhecidas para fornecer maiores informações às populações mais vulneráveis como turistas e emigrantes de áreas endêmicas (BERKOWITZ *et al.*, 2015).

Com relação à doença de Chagas, ou Tripanosomíase americana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é conhecida por apresentar a forma aguda e crônica. O achado histopatológico fundamental associado à forma nervosa aguda da doença é a encefalite multifocal, geralmente apresentando necrose associada a presença de numerosas formas amastigotas do parasito. A reativação de encefalite crônica na doença de Chagas, embora pouco comum, foi notificada em pacientes imunossuprimidos com neoplasias malignas do sistema hematopoiético-linfoide. (PITELLA, 2009). Os achados histopatológicos mais comuns descritos nesta forma da doença são infiltrados inflamatórios mononucleares multifocais sem a presença do parasito, distribuída discretamente pelo tecido nervoso do paciente chagásico. Normalmente, há envolvimento desta forma crônica da doença com a forma cardíaca crônica (PITELLA; MENEGUETTE; BARBOSA, 1993).

Um amplo espectro de manifestações motoras pode ocorrer em estágios tardios da tripanosomíase humana africana. Tremores nas mãos e língua, incoordenação de movimentos da cabeça, tronco e membros, paralisia de membros posteriores também pode acontecer como resultado do envolvimento da medula espinhal (mielite ou mielopatia) ou neuropatia motora periférica. Também há relatos

de distúrbios sensoriais como hiperestesia profunda, anestesia e prurido, além de alterações mentais, distúrbios de sono e envolvimento visual como a neurite óptica (KENNEDY, 2008). Os modelos animais de tripanossomíase africana crônica são relevantes para estudar como os tripanossomas atravessam o BHE e invadir o parênquima cerebral, a neuropatogênese do tripanossomíase africana e também para avaliar ou conceber novas estratégias de tratamento para a fase tardia da tripanossomíase africana. *Trypanosoma brucei* (TB) migra para fora dos vasos sanguíneos cerebrais para invadir o parênquima cerebral deixando a BHE intacta. Semelhante a invasão linfocitária do sistema nervoso, as composições das membranas basais de vasos intracerebrais têm um papel decisivo na determinação dos locais de penetração de TB no cérebro. O IFN- $\gamma$ , por um lado, está envolvido no controle imunológico da infecção, por outro lado, facilita a passagem de *Trypanosoma brucei* até o parênquima através da membrana basal da BHE (KENNEDY, 2008).

O acometimento de nervos periféricos também foi descrito recentemente em equinos naturalmente infectados por *Trypanosoma equiperdum*, que causa a Durina, uma doença venérea dos equinos. Foram observadas alterações em nervos periféricos, gânglios e medula espinhal, levando à degeneração axonal. Lesões histopatológicas foram mais graves nos nervos periféricos (e gânglios associados) e consistentes em todos os animais. Nos nervos afetados, infiltração multifocal de linfócitos, plasmócitos e macrófagos foram encontrados entre os axônios de fascículos nervosos, com variável edema axonal e fragmentação (YASINE *et al.*, 2019).

A toxoplasmose é a infecção oportunista mais comum que afeta seres humanos com AIDS, a qual é causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Toxoplasma gondii* (MAJMUNDAR *et al.*, 2019). Os principais achados de biópsias em humanos incluem inflamação crônica com a presença de taquizoítos, por vezes presença de cistos com bradizoítos e algumas vezes havia concomitância com pacientes com HIV. Os protozoários podem então atingir uma série de sítios-alvo de infecção, sendo uma delas o SNC. A infecção inicial pode muitas vezes apresentar uma linfadenopatia discreta ou pode também ser assintomática. A infecção torna-se reativada quando há imunossupressão severa com linfócitos CD4+ contando menos de 200 células/ml, o que justifica a sua forte associação com a HIV. A encefalite por *Toxoplasma* é uma síndrome bem estudada e observada em casos de

imunossupressão. No entanto, na medula espinal o envolvimento não é uma apresentação tão comum, e a infecção da medula espinal raramente é vista sozinha. (KUNG *et al.*, 2011; MAJMUNDAR, *et al.*, 2019).

A malária é a infecção com um ou mais de quatro possíveis espécies de *Plasmodium sp.* adquiridas por seres humanos quando um mosquito *Anopheles* fêmea inocula os protozoários parasitas através da pele. Apenas *Plasmodium falciparum* invade o SNC, causando malária cerebral, apesar de relatórios crescentes de que *Plasmodium vivax*, pode produzir malária cerebral, anemia, e problemas respiratórios (PICOT; BIENVENU, 2009). A neuropatologia de malária cerebral consiste em edema cerebral difuso, hemorragias localizadas na substância branca cerebral, e ligação de capilares cerebrais e vênulas por eritrócitos infectados; pigmentação com hemozoina é bastante típico (ROMÁN, 2011).

## **1.7 Comprometimento do tecido nervoso central e periférico na leishmaniose visceral**

Nos pacientes humanos com leishmaniose, a ocorrência de neuropatia periférica é mais comum do que as manifestações relacionadas com o SNC. Recentemente, Llanos-Cuentas e colaboradores (2013) resumiram o principal dano neurológico em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e visceral (LV) como sendo (i) neuropatia periférica desmielinizante imunomediada em LV, (ii) neuropatia periférica em CL devido a envolvimento direto parasitário com o nervo ou bainha nervosa, (iii) envolvimento do SNC por disseminação hematogena em LV ou contiguidade próxima em ML, e (iv) neuropatia associada a tratamentos leishmanicidas (MAIA *et al.*, 2015). Assim, a leishmaniose visceral deve ser considerada como um dos diagnósticos diferenciais para tanto para humanos quanto para cães com sinais de afecções neurológicas, tanto centrais quanto periféricas, em regiões endêmicas (GIANUZZI *et al.*, 2017; ZOBBA *et al.*, 2017).

Um estudo realizado com 288 pacientes humanos com Leishmaniose cutânea mostrou que 5% dos pacientes apresentavam inflamação perineural constituída por linfócitos ou uma mistura de linfócitos, plasmócitos e macrófagos. Quatro pacientes apresentavam neurite, num deles a inflamação granulomatosa estava associada à destruição nervosa; e foram observadas formas de amastigotas dentro dos nervos em dois pacientes (KUBBA *et al.*, 1987).

Outros poucos relatos bem documentados em humanos referem-se principalmente à meningoencefalite e às manifestações oculares (LLANOS-CUENTAS; VALENCIA; PETERSEN, 2013; PETERSEN; GREENLEE, 2011). Em um estudo com doentes com LV da África Oriental relatou que os parasitas se propagam para o SNC, principalmente para as meninges cerebrais, no líquido cefalorraquidiano (LCR) e os endotélios dos vasos da meninge.

Em cães infectados por *L. infantum*, a taxa de prevalência de sintomas neurológicos na cidade de Araçatuba, Brasil, foi estimada em 4% (FEITOSA *et al.*, 2000). Deve-se notar que estes sintomas são muito genéricos, e, portanto, torna-se difícil associar estas anomalias neurológicas à infecção por *Leishmania spp.* Estudos *post-mortem* revelaram que os sinais de alterações cerebrais são frequentemente encontrados em cães que não apresentavam qualquer sinal de doença neurológica (MELO *et al.*, 2009).

Quanto aos mecanismos envolvidos nas alterações neurológicas durante a leishmaniose canina, os trabalhos sugerem a participação da imunidade humoral e celular (MELO *et al.*, 2009, 2013; MELO; MACHADO, 2011). Além disso, além de uma intensa infiltração inflamatória composta principalmente por linfócitos TCD3, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos no plexo coroide, meninges e parênquima de animais, foi observada uma marcada ativação astrocítica e microglial associada à proliferação de células microgliais em áreas cerebrais de cães infectados (MELO; MACHADO, 2011).

Oliveira e colaboradores (2017) também observaram lesões no encéfalo e medula de cães acometidos por LV. Dentre os 48 cães analisados, 31 possuíam reação inflamatória no encéfalo e um cão apresentou mielite, com presença de formas amastigotas de *Leishmania spp.* na substância branca cervical.

## 1.8 Justificativa

O presente trabalho justifica-se pelo fato de haver poucos estudos sobre a patogenia da LVC no SNC, particularmente no que diz respeito às lesões observadas na medula espinhal, tendo em vista a diversidade na permeabilidade das diferentes barreiras encefálicas, e a maior permeabilidade descrita para a BHM, podemos supor que existem lesões inflamatórias mais acentuadas na medula espinhal.

## 1.9 Objetivos

Caracterizar a distribuição e intensidade da inflamação em regiões do encéfalo e medula espinhal em cortes corados por HE, e verificar, pela análise imuno-histoquímica, a presença e distribuição de linfócitos TCD3+ e possíveis vias de migração destas células na medula espinhal de cães com leishmaniose. Além disso, verificar a presença de formas amastigotas de *Leishmania spp* na medula espinhal dos cães.

## APÊNDICE A - REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C. H.; COFFMAN, R. L.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E. M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 173, n. 6, p. 1515-1518, 1996. DOI: 10.1093/infdis/173.6.1515. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/173/6/1515/945551>. Acesso em: 2 mar. 2022.

BARTANUSZ, V.; JEZOVA, D.; ALAJAJIAN, B.; DIGICAYLIOGLU, M. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. **Annals of Neurology**, Boston, v. 70, n. 2, p. 194-206, 2011. DOI: 10.1002/ana.22421. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.22421>. Acesso em: 2 mar. 2022.

BERKOWITZ, A. L.; RAIBAGKAR, P.; PRITT, B. S.; MATEEN, F. J. Neurologic manifestations of the neglected tropical diseases. **Journal of the Neurological Sciences**, Amsterdam, v. 349, n. 1-2, p. 20-32, 2015. DOI: 10.1016/j.jns.2015.01.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.01.001>. Acesso em: 2 mar. 2022.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; CORDEIRO DA SILVA, A. Deception and manipulation: the arms of Leishmania, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, artigo 480, 16 p., 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00480. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00480>. Acesso em: 22 fev. 2023.

CHOPRA, N.; MENOUNOS, S.; CHOI, J. P.; HANSBRO, P. M.; DIWAN, A. D.; DAS, A. Blood-spinal cord barrier: its role in spinal disorders and emerging therapeutic strategies. **NeuroSci**, Basel, v. 3, n. 1, 27 p., 2021. DOI: 10.3390/neurosci3010001. Disponível em: <https://www.mdpi.com/journal/neurosci>. Acesso em: 22 fev. 2022.

COSTA, S. F.; GOMES, V. O.; MACIEL, M. O. S.; MELO, L. M.; VENTURIN, G. L.; BRAGATO, J. P.; REBECH, G. T.; SANTOS, C. O.; OLIVEIRA, B. M. N.; OLIVEIRA, G. G. S.; LIMA, V. M. F. Combined in vitro IL-12 and IL-15 stimulation promotes cellular immune response in dogs with visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 14, n. 1, artigo e0008021, 21 p., 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7006941/>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CROESE, T.; CASTELLANI, G.; SCHWARTZ, M. Immune cell compartmentalization for brain surveillance and protection. **Nature Immunology**, New York, v. 22, n. 9, p. 1083-1092, 2021. DOI: 10.1038/s41590-021-00994-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00994-8>. Acesso em: 2 mar. 2022.

DAVID, S.; ZARRUK, J. G.; GHASEMLOU, N. Inflammatory pathways in spinal cord injury. **International Review of Neurobiology**, San Diego, v. 106, p. 127-152, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-407178-0.00006-5. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124071780000065>. Acesso em: 2 mar. 2022.

DAYAKAR, A.; CHANDRASEKARAN, S.; KUCHIPUDI, S. V.; KALANGI, S. K. Cytokines: key determinants of resistance or disease progression in visceral leishmaniasis: opportunities for novel diagnostics and immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 10, artigo 670, 23 p., 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00670. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.01976/full>. Acesso em: 2 mar. 2022.

DIONISIO-SANTOS, D. A.; OLSCHOWKA, J. A.; O'BANION, M. K. Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, London, v. 16, n. 1, artigo 74, 13 p., 2019. DOI: 10.1186/s12974-019-1453-0.

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). **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 28, p. 36-44, 2000.

GHALIB, H. W.; WHITTLE, J. A.; KUBIN, M.; HASHIM, F. A.; EL-HASSAN, A. M.; GRABSTEIN, K. H.; TRINCHIERI, G.; REED, S. G. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 154, n. 9, p. 4623-4629, 1995.

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. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 125-138, 2017. DOI: 10.1111/jsap.12650. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsap.12602>. Acesso em: 2 mar. 2022.

HAQQANI, A. S.; HILL, J. J.; MULLEN, J.; STANIMIROVIC, D. B. **The blood-brain and other neural barriers: reviews and protocols**. Totowa: Humana Press, 2011. (Methods in Molecular Biology, 686).

JHA, M. K.; JO, M.; KIM, J.-H.; SUK, K. Microglia-astrocyte crosstalk: an intimate molecular conversation. **The Neuroscientist**, Thousand Oaks, v. 25, n. 3, p. 227-240, 2019. DOI: 10.1177/1073858418783959. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1073858418783958>. Acesso em: 15 mar. 2021.

JOHANSON, C. E.; STOPA, E. G.; MCMILLAN, P. N. The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 686, p. 101-131, 2010. DOI: 10.1007/978-1-60761-938-3\_4. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_6). Acesso em: 2022.

KAPLAN, L.; CHOW, B. W.; GU, C. Neuronal regulation of the blood-brain barrier and neurovascular coupling. **Nature Reviews Neuroscience**, London, v. 21, n. 8, p. 416-432, 2020. DOI: 10.1038/s41583-020-0322-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41583-020-0322-2>. Acesso em: 15 mar. 2022.

KENNEDY, P. G. E. The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Annals of Neurology**, Hoboken, v. 64, n. 2, p. 116-126, 2008.

DOI: 10.1002/ana.21429. Disponível em:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.21429>. Acesso em: 15 jan. 2022.

KIGERL, K. A.; DE RIVERO VACCARI, J. P.; DIETRICH, W. D.; POPOVICH, P. G.; KEANE, R. W. Pattern recognition receptors and central nervous system repair. **Experimental Neurology**, Orlando, v. 258, p. 5-16, 2014. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.01.001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488614000119?via%3Dihub>. Acesso em: 15 jan. 2022.

KIM, J. H.; KIM, J. H.; PARK, J. A.; LEE, S.-W.; KIM, W. J.; YU, Y. S.; KIM, K.-W. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Seoul, v. 39, n. 4, p. 339-345, 2006. DOI: 10.5483/bmbrep.2006.39.4.339. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889675>. Acesso em: 15 jan. 2022.

KUBBA, R.; EL-HASSAN, A. M.; AL-GINDAN, Y.; OMER, A. H. S.; BUSHRA, M.; KUTTY, M. K. Peripheral nerve involvement in cutaneous leishmaniasis (Old World). **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 26, n. 8, p. 527-531, 1987. DOI: 10.1111/j.1365-4362.1987.tb02295.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-4362.1987.tb02295.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 15 mar. 2022.

KUNG, D. H.; HUBENTHAL, E. A.; KWAN, J. Y.; SHELBURNE, S. A.; GOODMAN, J. C.; KASS, J. S. Toxoplasmosis myelopathy and myopathy in an AIDS patient. **The Neurologist**, Hagerstown, v. 17, n. 1, p. 49-51, 2011. DOI: 10.1097/NRL.0b013e3181d35c62. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e318202e954>. Acesso em: 15 mar. 2022.

LAZAREVIC, V., GLIMCHER, L. T-bet in disease. **Nature Immunology**, New York, v. 12, n. 7, p. 597-606, 2011. DOI: 10.1038/ni.2059. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ni.2059>. Acesso em: 20 jan. 2023.

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FEITOSA, M. M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 485-489, abr. 2003. DOI: 10.1590/S0100-879X2003000400010.

LLANOS-CUENTAS, A.; VALENCIA, B.; PETERSEN, C. Neurological manifestations of human leishmaniasis. *In*: PETERS, W.; SLATER, A. F. G. (Eds.). **Leishmaniasis: biology, control and new approaches for its treatment**. Amsterdam: Elsevier, 2013. Cap. 13, p. 263-281.

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 Immunology**, Oxford, v. 37, n. 8, p. 385-393, ago. 2015. DOI: 10.1111/pim.12203.

MAJMUNDAR, N.; PATEL, P. D.; DODSON, V.; TRAN, A.; GOLDSTEIN, I.; ASSINA, R. Parasitic infections of the spine: case series and review of the literature. **Neurosurgical Focus**, Charlottesville, v. 46, n. 1, artigo E12, 10 p., jan. 2019. DOI: 10.3171/2018.10.FOCUS18472.

MELO, G. D.; MACHADO, G. F. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-Leishmania antibody titres. **Cell and Tissue Research**, Berlin, v. 346, n. 3, p. 293-304, 2011. DOI: 10.1007/s00441-011-1290-7.

MELO, G. D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R. O.; MACHADO, G. F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 162, n. 3-4, p. 248-256, 2009. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.002.

MELO, G.; 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. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, n. 1-3, p. 57-66, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.11.002. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/74605>>. Acesso em: 15 jan. 2023.

MUNDT, S.; GRETER, M.; FLÜGEL, A.; BECHER, B. The CNS immune landscape from the viewpoint of a T cell. **Trends in Neurosciences**, Amsterdam, v. 42, n. 10, p. 667-679, 2019. DOI: 10.1016/j.tins.2019.07.008.

OBERHEIM, N. A.; GOLDMAN, S. A.; NEDERGAARD, M. Heterogeneity of astrocytic form and function. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 814, p. 23-45, 2012. DOI: 10.1007/978-1-61779-452-0\_3.

OLIVEIRA, V. C.; BOECHAT, V. C.; MENDES JUNIOR, A. A. V.; MADEIRA, M. F.; FERREIRA, L. C.; FIGUEIREDO, F. B.; CAMPOS, M. P.; RODRIGUES, F. C. C.; OLIVEIRA, R. V. C.; AMENDOEIRA, M. R. R.; MENEZES, R. C. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. **PloS One**, San Francisco, v. 12, n. 4, artigo e0175588, 15 p., 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0175588. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28419136/>. Acesso em: 23 fev. 2023.

PAN, W.; BANKS, W. A.; KASTIN, A. J. Permeability of the blood-brain and blood-spinal cord barriers to interferons. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v. 76, n. 1-2, p. 105-111, 1997. DOI: 10.1016/s0165-5728(97)00034-9.

PERRY, V. H.; CUNNINGHAM, C.; HOLMES, C. Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 7, n. 2, p. 161-167, 2007. DOI: 10.1038/nri2015.

PETERSEN, C. A.; GREENLEE, M. H. W. Neurologic manifestations of *Leishmania* spp. infection. **Journal of Neuroparasitology**, Baudour, v. 2, artigo N110401, 5 p., 2011.

PICOT, S.; BIENVENU, A.-L. Plasmodium vivax sera-t-il un autre tueur en série . **Médecine Sciences**, Les Ulis Cedex, v. 25, n. 6-7, p. 622-626, 2009.

PINHEIRO, M. A. L.; KOOIJ, G.; MIZEE, M. R.; KAMERMANS, A.; ENZMANN, G.; LYCK, R.; SCHWANINGER, M.; ENGELHARDT, B.; DE VRIES, H. E. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1862, n. 3, p. 461-471, 2016. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.10.018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092544391500318X?via%3Dihub>. Acesso em: 20 jan. 2023.

PITTELLA, J. E. H. Central nervous system involvement in Chagas disease: a hundred-year-old history. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 103, n. 10, p. 973-978, 2009. DOI: 10.1016/j.trstmh.2009.04.012.

PITTELLA, J. E. H.; MENEGUETTE, C.; BARBOSA, A. J. A. Histopathological and immunohistochemical study of the brain and heart in the chronic cardiac form of Chagas' disease. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, São Paulo, v. 51, n. 1, p. 8-15, 1993. DOI: 10.1590/S0004-282X1993000100002.

RANSOHOFF, R. M.; BROWN, M. A. Innate immunity in the central nervous system. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 122, n. 4, p. 1164-1171, 2012. DOI: 10.1172/JCI58644.

REINHOLD, A.; RITTNER, H. Barrier function in the peripheral and central nervous system: a review. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, Berlin, v. 469, n. 1, p. 123-134, 2016. DOI: 10.1007/s00424-016-1920-8.

ROMÁN, G. C. The neurology of parasitic diseases and malaria. **Continuum: Lifelong Learning in Neurology**, Minneapolis, v. 17, n. 1, p. 113-133, 2011. DOI: 10.1212/01.CON.0000394678.13115.ad.

SAMANT, M.; SAHU, U.; PANDEY, S. C.; KHARE, P. Role of cytokines in experimental and human visceral leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Lausanne, v. 11, artigo 624009, 18 p., 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2021.624009.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, Heidelberg, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2009. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8.

UBOGU, E. E. Biology of the human blood-nerve barrier in health and disease. **Experimental Neurology**, Orlando, v. 328, artigo 113272, 29 p., 2020. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113272. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7145763/>. Acesso em: 25 set. 2022.

VANDEVELDE, M.; HIGGINS, R.; OEVERMANN, A. **Veterinary neuropathology: essentials of theory and practice**. : Hoboken: Wiley-Blackwell, 2012. Cap. 3, p. 48.

VARATHARAJ, A.; GALEA, I. The blood-brain Barrier in systemic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, San Diego, v. 60, 12 p., 2017. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.03.010.

YASINE, A.; ASHENAFI, H.; GELDHOF, P.; VAN BRANTEGEM, L.; VERCAUTEREN, G.; BEKANA, M.; TOLA, A.; VAN SOOM, A.; DUCHATEAU, L.; GODDEERIS, B.; GOVAERE, J. Histopathological lesions in reproductive organs, distal spinal cord and peripheral nerves of horses naturally infected with *Trypanosoma equiperdum*. **BMC Veterinary Research**, London, v. 15, n. 1, artigo 175, 10 p., 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-1916-7.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; GU, W.; HE, L.; SUN, B. Th1/Th2 cell's function in immune system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 841, p. 45-65, 2014. DOI: 10.1007/978-94-017-9487-9\_3.

ZHU, J.; PAUL, W. E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. **Cell Research**, Beijing, v. 20, n. 1, p. 4-12, 2009. DOI: 10.1038/cr.2009.138.

ZOBBA, R.; EVANGELISTI, M.; MANUNTA, M.; ALBERTI, A. A.; ZUCCA, D.; PARPAGLIA, M. L. P. case of canine neurological leishmaniasis. **Veterinaria Italiana**, Teramo, v. 53, n. 4, p. 321-326, 2017. DOI: 10.12834/VetIt.307.1193.4.