

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

**IMUNOFENÓTIPOS DE LINFÓCITOS T NO SANGUE E
NO LIQUOR DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL:
CORRELAÇÃO COM AS LESÕES ENCEFÁLICAS**

Fernanda Grecco Grano

Médica Veterinária

Zootecnista

Araçatuba – SP

2013

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

**IMUNOFENÓTIPOS DE LINFÓCITOS T NO SANGUE E
NO LIQUOR DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL:
CORRELAÇÃO COM AS LESÕES ENCEFÁLICAS**

Fernanda Grecco Grano
Orientadora: Prof.^a Adjunto Gisele Fabrino Machado

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

Araçatuba – SP

2013

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

	Grano, Fernanda Grecco
G759i	Imunofenótipos de linfócitos T no sangue e no liquor de cães com leishmaniose visceral: correlação com as lesões encefálicas / Fernanda Grecco Grano. Araçatuba: [s.n], 2013 77f. il.; + CD-ROM Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013 Orientador: Profª. Adj. Gisele Fabrino Machado 1. Animais - imunologia 2. Citometria de fluxo. 3. <i>Leishmania</i> 4. Linfócitos T CD4 positivos 5. Linfócitos T CD8 positivos. 6. Receptor de células T 7. Subpopulações de linfócitos T CDD 571.961



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: *Imunofenótipos de linfócitos T no sangue
e no líquido de cães com leishmaniose visceral:
Correlação com as lesões encefálicas.*

AUTORA: FERNANDA GRECCO GRANO

ORIENTADORA: Dra. GISELE FABRINO MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL
(FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.

Valéria M. S. de Lima
Dra. VALÉRIA MARÇAL FELIX DE LIMA

Antonio Carlos Alessi
Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI

Gisele Fabrino Machado
Dra. GISELE FABRINO MACHADO

DATA DA REALIZAÇÃO: 23 de agosto de 2013.

Gisele Fabrino Machado

Presidente da Comissão Examinadora
Dra. GISELE FABRINO MACHADO
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FERNANDA GRECCO GRANO – Itápolis – SP, 18 de março de 1985. Graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Câmpus de Dracena, São Paulo, em julho de 2008. Graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça – FAMED, Garça, São Paulo, em dezembro de 2010. Bolsista de Iniciação Científica CNPq durante a primeira graduação (2004 a 2005 e 2006 a 2007). Aluna do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Câmpus de Araçatuba, São Paulo e bolsista FAPESP desde março de 2012. Estágio de pesquisa na *Universidad de Extremadura – Facultad de Veterinaria – Departamento de Sanidad Animal – Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias*, na cidade de Cáceres, Espanha, entre fevereiro e abril de 2013.

"A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem."

Arthur Schopenhauer (1788-1860)

Dedico

À minha família:

Rosana, António, Mariana e Carolina.

À Hanny, minha cachorrinha.

Com amor, sempre.

AGRADECIMENTOS

À Professora Adjunto Gisele Fabrino Machado pela orientação, auxílio científico e confiança durante todo o curso de mestrado.

À Professora Adjunto Valéria Marçal Félix de Lima pela introdução à técnica da citometria de fluxo e disponibilização do citômetro para a realização das análises.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, pela disponibilização de todos os recursos fundamentais para o desenvolvimento dessa dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa (#2012/01540-0) que originou a presente dissertação, bem como pela concessão da bolsa de mestrado (#2011/03504-4) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior (#2012/21129-9), que foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa.

À *Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias* da *Facultad de Veterinaria* da *Universidad de Extremadura* de Cáceres/Espanha. Em especial ao professor Dr. Luis Carlos Gómez Nieto e sua equipe: Virginia Iniesta Orozco, Silvia Belinchón Lorenzo, Javier Fernández Cotrina, Rubén Muñoz Madrid, José Luis Barneto Lozano e demais pela recepção carinhosa, apoio técnico e todo o aprendizado durante a realização do estágio de pesquisa.

À técnica de laboratório e mestranda Juliana Perosso pelo suporte na leitura das amostras no citômetro de fluxo.

A todos os pós-graduandos e estagiários dos Laboratórios de Patologia Aplicada (LApap), Imunologia e Ornitopatologia, pelo convívio diário harmonioso, auxílios científicos e conversas.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração prática da pesquisa, bem como da dissertação.

Aos colegas e amigos Guilherme, José Eduardo, Milena e Augusto pela companhia, carinho e amizade sincera durante todo o curso de mestrado.

Aos amigos antigos, por nunca desistirem de mim, mesmo quando a vida insiste em nos distanciar. O que hoje a distância separa, o coração irá sempre unir.

À toda minha família e ao meu namorado Diego pelo amor fortalecedor, estímulo constante e apoio incondicional.

Aos cães com leishmaniose visceral que cederam suas vidas involuntariamente para a realização dessa pesquisa.

E finalmente a Deus, pela fé, esperança e amor. Acima de tudo o amor.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Leishmaniose Visceral	18
2.1.1 Leishmaniose visceral e o sistema nervoso central	19
2.2 Sistema Imune: Linfócitos T	20
2.2.1 Sistema imune e a leishmaniose visceral ..	21
2.3 Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio....	23
2.3.1 Comunicação entre o SNC e o sistema imune periférico.....	24
3 OBJETIVOS.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Ética	27
4.2 Animais	27
4.3 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral	27
4.4 Colheita de material	28
4.5 Citometria de Fluxo	29
4.6 Análise estatística	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Exame Macroscópico.....	31
5.2 Imunofenótipos de Linfócitos T.	32
5.3 Avaliação do Infiltrado Inflamatório no Encéfalo.	40
5.4 Correlação dos Imunofenótipos de Linfócitos T do Liquor com a Intensidade da Inflamação Encefálica.	45
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
µm	micrômetro
%	porcentagem
α	alpha
β	beta
γ	gama
δ	delta
BHE	barreira hematoencefálica
BHL	barreira hematoliquórica
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CMSF	células mononucleares do sangue periférico
DN	células duplo-negativas
DP	células duplo-positivas
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FITC	fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
H-E	hematoxilina-eosina
IFN-γ	interferon gama
IgG	imunoglobulina G
IL-1β	interleucina 1 beta
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-10	interleucina 10
IL-17	interleucina 17
LC	leishmaniose cutânea
LCR	líquido cefalorraquidiano
LV	leishmaniose visceral
MHC	antígeno principal de histocompatibilidade
PBS	tampão fosfato-salino

SNC	sistema nervoso central
Syn	sinônimo
TCR	receptor de células T
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
RPE	fluorocromo R-ficoeritrina
TGF- β	fator de crescimento transformador beta
TNF- α	fator de necrose tumoral alpha

LISTA DE FIGURAS

Página

FIGURA 1- Análise por citometria de fluxo de sangue periférico (CMSP) e líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães com leishmaniose visceral. “Dot plot” de fluorescência representativo para CD3+CD4+, CD3+CD8+, DP e DN. **(A)** CMSP. **(B)** LCR. Os valores de cada subpopulação são apresentados em porcentagem.....**34**

FIGURA 2- Análise por citometria de fluxo de sangue periférico (CMSP) e líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães com leishmaniose visceral. “Dot plot” de fluorescência representativo para TCRs. **(A)** TCR $\alpha\beta$ em CMSP. **(B)** TCR $\gamma\delta$ em CMSP. **(C)** TCR $\alpha\beta$ em LCR. **(D)** TCR $\gamma\delta$ em LCR. Os valores são apresentados em porcentagem.....**35**

FIGURA 3- Imunofenótipos de linfócitos T analisados em cães com LV. Os valores estão expressos em porcentagem. As linhas horizontais contínuas representam as medianas (intervalo interquartil). As linhas tracejadas vermelhas correspondem aos valores normais de referência no sangue e as linhas azuis contínuas representam os valores normais de referência no líquor de cães saudáveis, segundo Tipold et al. (1998). Para as células DP e DN do sangue utilizou-se como referência o artigo de Alexandre-Pires et al. (2010). Ausência de diferença estatística significativa entre a quantidade de células T no sangue e líquor para todos os fenótipos avaliados.....**36**

FIGURA 4- **(A)** Porcentagem das subpopulações de linfócitos T CD3+CD4+, CD3+CD8+, DP e DN no sangue periférico (CMSP) de cães com LV. **(B)** Porcentagem das subpopulações de linfócitos T CD3+CD4+,

CD3CD8+, DP e DN no líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães com LV. As colunas representam a mediana (intervalo interquartil). Letras diferentes indicam significância estatística ao nível de 5%.....**38**

FIGURA 5- (A) Porcentagem de TCRs no sangue periférico (CMSP) de cães com LV, onde observa-se o predomínio de TCR $\alpha\beta$. **(B)** Porcentagem de TCRs no líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães com LV, onde observa-se o predomínio de TCR $\alpha\beta$. As colunas representam a mediana (intervalo interquartil); * indica significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.....**39**

FIGURA 6- Porcentagem de cães em função da intensidade da inflamação no plexo coroide, região subependimária e leptomeninges. -: ausência de infiltrado inflamatório; +: infiltrado inflamatório discreto; ++: infiltrado inflamatório moderado; +++ infiltrado inflamatório intenso. * indica diferença estatística significativa.....**41**

FIGURA 7- Fotomicrografias representativas do infiltrado inflamatório em leptomeninges de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (setas). **(C)** Infiltrado inflamatório intenso (*). No detalhe observa-se maior aumento. Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m.....**42**

FIGURA 8- Fotomicrografias representativas do infiltrado inflamatório no plexo coroide de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (seta). **(C)** Infiltrado inflamatório intenso (*). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m.....**43**

FIGURA 9- Fotomicrografias representativas do infiltrados inflamatório no subependima de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório

discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (seta). No detalhe observa-se maior aumento. Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 µm.....**44**

FIGURA 10- Correlação entre as intensidades da inflamação observada nas leptomeninges, em escala semiquantitativa de 0-3, e os imunofenótipos de linfócitos T do liquor. Observa-se ausência de correlação estatística....**46**

FIGURA 11- Correlação entre as intensidades da inflamação nas leptomeninges, em escala semiquantitativa de 0-3, e os imunofenótipos de linfócitos T do sangue periférico. Observa-se ausência de correlação estatística.....**47**

FIGURA 12- Correlação entre as intensidades da inflamação no plexo coroide, em escala semiquantitativa de 0-3, e os imunofenótipos de linfócitos T do liquor. A linha contínua representa a reta estimada.....**48**

FIGURA 13- Correlação entre as intensidades da inflamação no subepêndima, em escala semiquantitativa de 0-3, e os imunofenótipos de linfócitos T do liquor. A linha contínua representa a reta estimada.....**49**

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1- Alterações observadas no exame macroscópico dos animais sintomáticos com leishmaniose visceral.....**31**

Tabela 2- Valores médios das subpopulações de linfócitos T em sangue periférico e liquor em cães com leishmaniose visceral expressos em %....**33**

Tabela 3- Valores médios das subpopulações de linfócitos T no sangue e no liquor de cães com LV e saudáveis expressos em %.....**37**

IMUNOFENÓTIPOS DE LINFÓCITOS T NO SANGUE E NO LIQUOR DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL: CORRELAÇÃO COM AS LESÕES ENCEFÁLICAS

RESUMO – A leishmaniose visceral é uma doença que causa manifestações clínicas variadas em cães, que podem apresentar desde alterações subclínicas a desordens generalizadas, incluindo alterações neurológicas. Há evidências do comprometimento das barreiras encefálicas, como a presença de infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos T CD3+ no sistema nervoso central. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi determinar e comparar os imunofenótipos de linfócitos T no sangue periférico e no liquor e avaliar as lesões encefálicas em cães infectados. Verificou-se que os linfócitos T presentes em maior quantidade no liquor foram os duplos negativos (DN) e os duplos positivos (DP), com predomínio de TCR $\alpha\beta$. Também verificou-se que as células sanguíneas não diferiram das células do liquor em quantidade, o que indica que pode estar havendo um comprometimento da barreira hematoliquórica, permitindo que as células do sangue migrem para o liquor. Ocorreu também o predomínio de infiltrado linfohistioplasmocitário no encéfalo, principalmente em leptomeninges. Porém, não houve correlação entre a inflamação nessa área e as células T. Além disso, a correlação positiva entre a inflamação no subepêndima e as células T DN do liquor indica que essas células chegam no encéfalo também pelos vasos subependimários. Em conjunto, os resultados contribuem para explicar a inflamação observada no encéfalo de cães com leishmaniose, sendo que as células T DN podem ser responsáveis pela progressão neurológica da doença.

Palavras-chave: citometria de fluxo; *Leishmania*; linfócitos T CD4 positivos; linfócitos T CD8 positivos; receptor de células T; subpopulações de linfócitos T.

IMMUNOPHENOTYPES OF T LYMPHOCYTES IN BLOOD AND CEREBROSPINAL FLUID OF DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS: CORRELATION WITH BRAIN LESIONS

SUMMARY - Visceral leishmaniasis (VL) is a disease causing several clinical manifestations in dogs, that can present from subclinical to generalized disorders, including neurological disorders. There are evidences of cerebral barriers involvement, such as the presence of inflammatory infiltrate with predominance of CD3⁺ T cells in the brain of infected dogs. Therefore, the aim of this study was to determine and to compare the immunophenotypes of T lymphocytes in the peripheral blood and in the cerebrospinal fluid (CSF) of dogs with VL and evaluate the brain lesions. It was detected that the double negative (DN) and double positive (DP) T cells were present in higher percentage in the CSF, with predominance of TCR $\alpha\beta$. Besides, the amount of blood T cells did not differ from those observed in the CSF, indicating that the blood-CSF barrier may be damaged, allowing the migration of cells from the blood to the CSF. Moreover, inflammatory infiltrate with predominance of lymphohistioplasmacytic cells was observed, mainly in leptomeninges. However, there was no correlation between the intensity of the inflammation in this area and the T cells. Furthermore, the positive correlation between intensity of the inflammation in the subependymal area and DN T cells in the CSF indicates that these cells also may reach the brain through the subependymal vessels. Together, the results contribute to explain the inflammation observed in the brain of dogs with VL, where the DN T cells may contribute to the neurological progression of the disease.

Keywords: CD4-positive T-lymphocytes; CD8-positive T-lymphocytes; flow cytometry; *Leishmania*; T cell-receptor; T-lymphocyte subsets.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença que está distribuída mundialmente, abrangendo cerca de 88 países. É caracterizada por quatro síndromes clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea, leishmaniose visceral ou calazar (LV) e leishmaniose dérmica pós-calazar. (ALVAR et al., 2004; CHAPPUIZ et al., 2007).

A LV é uma antroponose causada pela *Leishmania chagasi* (Syn. *infantum*) nas Américas e Mediterrâneo e pela *Leishmania donovani* na Ásia e na África (BANETH et al., 2008; LUKEŠ et al., 2007; MAURICIO et al., 2000).

No Brasil, o cão é considerado o principal hospedeiro do parasita *L. chagasi*. A apresentação clínica da LV pode variar de cães assintomáticos a manifestações crônicas e sistêmicas, caracterizadas por febre, anemia, perda progressiva de peso, dermatopatias, hepatomegalia, esplenomegalia, alterações renais e desordens do sistema cardiovascular e respiratório (BLAVIER et al., 2001; CIARAMELLA et al., 1997; REIS et al., 2009).

A LV canina pode ser considerada uma doença imunomediada, já que o parasita tem a capacidade de modificar o sistema imunológico do hospedeiro (BARBIERI, 2006). Em estudo anterior foi observado que cães com LV apresentam infiltrado inflamatório com predomínio de linfócitos T no encéfalo (MELO et al., 2009). Além disso, cães sintomáticos possuem resposta humoral acentuada e simultânea depressão na resposta celular específica à *Leishmania*, o que resulta na progressão da doença (NIETO et al., 1999. PINELLI et al., 1994).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral

A LV é transmitida pela picada de insetos da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae. No Brasil a espécie relacionada à transmissão da doença é a *Lutzomyia longipalpis*, popularmente chamada de mosquito-palha (ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; DESJEUX, 2004).

De acordo com revisão feita por Bates (2007), os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam-se em duas formas ao longo de seu ciclo de vida, sendo elas: promastigota e amastigota. A forma promastigota metacíclica, flagelada, é transmitida ao hospedeiro durante o repasto sanguíneo pela fêmea infectada do flebotomíneo. As amastigotas são parasitas intracelulares aflagelados, principalmente de macrófagos, sendo encontradas no hospedeiro vertebrado.

O cão e o homem são os principais hospedeiros, embora o parasita *Leishmania* já tenha sido encontrado em canídeos silvestres (TENÓRIO et al., 2011), gatos (VIDES et al., 2011), marsupiais (HUMBERG et al., 2012) e roedores (OLIVEIRA et al., 2005).

A LV é uma doença sistêmica, afetando diversos órgãos, como pele, baço, linfonodos, fígado e medula óssea (ALVAR et al., 2004). A lesão histopatológica comumente encontrada nos tecidos é uma reação inflamatória granulomatosa associada à presença de formas amastigotas de *Leishmania* em macrófagos (BANETH et al., 2008).

Os macrófagos são as células alvo do parasita e a atividade antiparasitária dessas células é inibida na leishmaniose, resultando em um local para replicação parasitária. O estabelecimento da infecção e a evolução da doença dependem da resposta imunológica do hospedeiro, sendo que, uma vez estabelecida, a infecção persistirá nos tecidos (PALTRINIERI et al., 2010).

As células T apresentam um papel central na imunidade da leishmaniose por influenciar na produção de citocinas e na interação com macrófagos infectados. Estudos prévios demonstraram que cães cronicamente infectados possuem baixos números de células T com funcionalidade reduzida quando comparados aos cães não infectados (BRANDONISIO et al., 1988).

2.1.1 Leishmaniose visceral e o sistema nervoso central

Embora existam muitos relatos sobre lesões sistêmicas, poucos autores citam a ocorrência de lesões no sistema nervoso central (SNC) de cães com LV. Há alguns relatos sobre a migração de parasitas para o SNC (NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001) e deposição de antígenos e imunoglobulinas, levando a meningite e plexo coroidite (GARCIA-ALONSO et al., 1996; NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001). Esta última é uma lesão frequentemente encontrada no encéfalo de cães com LV (MELO; MACHADO, 2009).

Recentemente, Márquez et al. (2013) verificaram por imuno-histoquímica a presença de amastigotas de *L. infantum* na medula espinhal e nervos periféricos em um cão com LV. Além disso, também foi observado infiltrado linfocitário com predomínio de células CD3, reatividade das células da glia, satellitose, neuronofagia e lesões isquêmicas multifocais no SNC de cães com LV (JOSÉ-LÓPEZ et al., 2012; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2009; 2013).

Cães com LV com envolvimento do SNC podem apresentar sinais clínicos neurológicos, como convulsões generalizadas, tetraparesia, paraplegia, lesões oculares, caminhar em círculos e sinais clínicos cerebelares e vestibulares (FONT et al., 2004; IKEDA et al., 2007; JOSE-LOPEZ et al., 2012). Em humanos é mais comum o envolvimento dos nervos periféricos, mas também foram relatadas meningite, disfunção de nervos cranianos, polirradiculoneurite aguda (síndrome de Guillain-Barré) e tremores (DINIZ et al.,

2010; SNYDMAN et al., 2006).

2.2 Sistema Imune: Linfócitos T

Os linfócitos expressam um grande número de moléculas em sua superfície, que podem ser utilizadas para distinguir uma população celular de outra. O termo CD (*cluster of differentiation*), ou grupo de diferenciação, é utilizado para designar um marcador celular (ROITT, 2004; TIZARD, 2004).

Os linfócitos T auxiliares (ou T *helper*) são células que expressam as moléculas CD4, enquanto os linfócitos T citotóxicos expressam CD8 (ROITT, 2003; TIZARD, 2004). As células T podem também expressar ambos marcadores, apresentando-se com o fenótipo CD3+CD4+CD8+ (linfócitos T DP = duplo positivos) (ZUCKERMANN; HUSMANN, 1996; KENNY et al., 2000) ou, ainda, não expressar nenhum desses marcadores, pertencendo à subpopulação de linfócitos T CD3+CD4-CD8- (linfócitos T DN =duplo negativos) (ABBAS et al., 2008; HAAS et al., 1993; SUDA; ZLOTNIK, 1993;).

A maioria das células se desenvolve no timo, onde ocorre a maturação de precursores de linfócitos em células T funcionais (CIOFANI; ZUNIGA-PFLUCKER, 2007). Durante o desenvolvimento de células T $\alpha\beta$, as células DN CD4-CD8- dão origem a células DP CD4+CD8+, que se diferenciam em células CD4+CD8- ou CD4-CD8+ (D'ACQUISITO; CROMPTON, 2011). As células T DN podem se originar no timo, sobrevivendo à seleção negativa, seguido pela migração para a periferia (PRIATEL et al., 2001). Além disso, as células DN podem surgir da redução da expressão de CD4 e CD8 de células DP tímicas, quando estimuladas com antígenos em cultura (WANG et al., 2002); ou da redução de expressão da molécula CD8 durante maturação e expansão em linfócitos citotóxicos (ERARD et al., 1993).

Por outro lado, embora a maioria das células T CD4+ e CD8+ encontradas no sistema linfático necessite de seleção tímica para maturação

funcional, Chen et al. (2004) sugeriram, a partir de dados preliminares, que a timectomia não impede o desenvolvimento de células T DN no sistema linfático periférico e, portanto, parte dessas células podem se desenvolver extratimicamente.

A origem dos linfócitos T DP não está totalmente esclarecida. Bonomo et al. (1994) sugeriram que timócitos DP são liberados prematuramente do timo. Em humanos, a timectomia eliminou totalmente as células T DP (BERRIH et al., 1981). Por outro lado, em ratos a timectomia não alterou o número dessas células (GODDEN et al., 1985).

Os linfócitos T possuem também um receptor antigênico de superfície denominado TCR (*T cell receptor*), que reconhece os antígenos ligados a moléculas de MHC de uma célula apresentadora de antígeno. Os TCRs podem ser de dois tipos: um formado pelas cadeias de proteínas α e β e outro pelas cadeias γ e δ . 90 a 99% dos linfócitos T em humanos, ratos e provavelmente na maioria dos animais não ruminantes, possuem os receptores $\alpha\beta$.

2.2.1 Sistema imune e a leishmaniose visceral

A resistência do hospedeiro à infecção pelo parasita *Leishmania* ocorre por meio de resposta imune, que resulta na ativação de macrófagos e morte do parasita. A resposta imunológica contra *Leishmania* envolve mecanismos inatos e adaptativos e requer efetiva ativação dos macrófagos, células dendríticas e células T CD4⁺ e CD8⁺ (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Tanto células CD4⁺, como CD8⁺ são necessárias para uma defesa efetiva contra a infecção visceral por *L. donovani* em humanos e modelos murinos (KHARAZMI et al., 1999; MELBY; ANSTEAD, 2001).

Os linfócitos T CD4⁺ atuam na produção de citocinas fundamentais para a ativação de macrófagos e são necessários para que ocorra uma boa resposta

do hospedeiro à infecção por *Leishmania* (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010; KHARAZMI et al., 1999).

Cães infectados e saudáveis clinicamente apresentam predomínio de resposta imune do tipo Th1, sendo mediada por IL-2, IFN- γ e TNF- α , ao contrário do que ocorre em animais sintomáticos, onde há resposta imune do tipo Th2, mediada pelas citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β (BARBIERI, 2006; REIS et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; STRAUSS-AYALI et al., 2005).

Os linfócitos T CD8⁺ são importantes na proteção imune na leishmaniose visceral (GIUNCHETTI et al., 2008), possivelmente devido a mecanismos citotóxicos (PINELLI et al., 1999; REIS et al., 2009), sendo fundamentais para a eliminação do parasita e geração de resposta de memória (STAGER et al., 2000).

Há poucos estudos na literatura descrevendo a funcionalidade dos linfócitos T DN e DP. Os linfócitos T DP parecem ter, no geral, funções de células T helper ou citotóxica, embora suas atividades não tenham sido totalmente esclarecidas (NAM et al., 2000; ZUCKERMANN, 1999). Essas células já foram descritas em cães (BISMARCK et al., 2012), humanos (CHAUHAN et al., 2012), suínos (ZUCKERMANN; HUSMANN, 1996), ratos (KENNY et al., 2000) e macacos (AKARI et al., 1997).

As células T DN atuam na produção de citocinas na leishmaniose cutânea humana (ANTONELLI et al., 2006) e, também, podem apresentar atividade citolítica em alguns outros casos (BROOKS et al., 1993; PORCELLI et al., 1992;). Os linfócitos T DN são ativados por meio dos TCRs $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. As células T DN $\alpha\beta$ possuem funções regulatória e inflamatória e foram detectadas em desordens autoimunes como o lúpus e a artrite reumatoide (LIU et al., 1999; SIELING et al., 2000).

2.3 Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio

Em condições normais, o SNC é considerado um local imunoprivilegiado. Isto pode ser devido à eficiência das barreiras do SNC, à limitada entrada de anticorpos pela barreira hematoencefálica (BHE), ausência de drenagem linfática do parênquima encefálico para os linfonodos periféricos, inabilidade de astrócitos e micróglia em permanecer com a resposta imune, ausência de células dendríticas no parênquima cerebral e baixa expressão de MHC (GALEA et al., 2007; MULDOON et al., 2013).

O SNC é isolado da corrente sanguínea por meio da BHE, que é caracterizada por apresentar células endoteliais não fenestradas e que possuem junções intercelulares do tipo oclusivas (“tight junctions”) nos vasos sanguíneos cerebrais (PERSIDSKY et al., 2006; SAUNDERS et al., 2008; WOLBURG; LIPPOLDT, 2002). Além disso, outros componentes reforçam a defesa da BHE como os pericitos, a membrana basal, os pedículos dos astrócitos e alguns terminais axônicos (LENT, 2010).

A saída de substâncias dos vasos sanguíneos e o tráfego de leucócitos no SNC são limitados pela BHE. No entanto, estudos indicam que leucócitos ativados são capazes de atravessar a barreira, realizando a vigilância imunológica do SNC (KIVISÄKK et al., 2009; MAN et al., 2007).

Uma outra interface entre o parênquima encefálico e o sangue é o plexo coroide, principal estrutura responsável pela produção de liquor. O plexo coroide permite o isolamento entre o liquor e o sangue por meio da barreira hematoliquórica (BHL), que é formada por células epiteliais com junções intercelulares oclusivas (DZIEGIELEWSKA et al., 2001; WOLBURG; PAULUS, 2010).

Além da BHE e BHL, uma outra barreira está presente nas meninges. Os vasos sanguíneos da dura-máter não apresentam função de barreira devido às fenestrações intercelulares. Porém, as células mais internas da aracnoide possuem junções intercelulares oclusivas, formando uma barreira física nas

meninges, isolando o liquor contido no espaço subaracnoide de estruturas adjacentes. Além disso, as características das junções intercelulares oclusivas nos vasos sanguíneos da superfície da pia-máter e da aracnoide são semelhantes às da BHE, embora não apresentem pericitos e pés terminais de astrócitos (SAUNDERS et al., 2008).

Apesar da eficiência das barreiras encefálicas, existem algumas evidências do comprometimento destas em cães com LV. Isto inclui a deposição de antígenos de *Leishmania* nas paredes de vasos sanguíneos e no plexo coroide, ativação das células da glia, altos títulos de anticorpos no liquor e presença de infiltrado de células inflamatórias no encéfalo (GARCÍA-ALONSO et al., 1996; IKEDA et al., 2007; MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2013)

2.3.1 Comunicação entre o SNC e o sistema imune periférico

As principais estruturas envolvidas na migração de leucócitos do sangue para o SNC são o plexo coroide, as meninges (KIVISAKK et al., 2003; PETITO; ADKINS, 2005) e os órgãos circunventriculares (ENGELHARDT; RANSOHOFF, 2005), devido a presença de junções intercelulares comunicantes (“gap junctions”) no endotélio dessas regiões, tidas como portas de entrada de células inflamatórias e patógenos no ambiente nervoso.

Carrithers et al. (2002) sugeriram que linfócitos ativados podem passar da circulação sistêmica para o espaço subaracnoide por meio de vasos nas meninges ou podem chegar no liquor ventricular pelo epitélio do plexo coroide.

Em especial, o plexo coroide tem um importante papel como mediador de sinalização imune entre o SNC e a periferia (MARQUES et al., 2007), principalmente pelas evidências do acúmulo local de células T CD3+ após estimulação periférica. Além disso, os capilares do plexo coroide são fenestrados, o que pode favorecer a migração dos linfócitos do sangue para o

liquor (PETITO; ADKINS, 2005).

O SNC também se comunica com as células do sistema imune periférico por meio de citocinas circulantes e/ou quimiocinas, que são produzidas por células neuronais e células da glia no SNC e que são mediadores de várias funções comportamentais e cerebrais (BAUER et al., 2007). Além disso, essas citocinas e quimiocinas podem alertar o SNC por mecanismos neuroquímicos e podem causar ou potencializar os sintomas da doença (TONELLI et al., 2005; YIRMIYA; GOSHEN, 2011), o que indica uma comunicação ativa entre as células da glia do SNC com o sistema imune periférico (TIAN et al., 2012). Estudos anteriores relatam a ativação das células da glia e a presença de infiltração de leucócitos, com predomínio de células T CD3+ no SNC de cães com LV (MELO; MACHADO, 2011; MELO et al., 2009; 2013).

O plexo coroide e o liquor podem atuar como portas de entrada para o parasita *Leishmania*. Deste modo, essas estruturas podem ser as primeiras a responder a um estímulo inflamatório periférico (MARANGONI et al., 2011; MELO; MACHADO, 2009, 2011). Como existe proximidade do liquor com as lesões inflamatórias no SNC, ele pode refletir suas alterações (DUQUE et al., 2002). Em estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, detectou-se em cães com LV a presença de infiltrado inflamatório no encéfalo com predomínio de linfócitos T CD3+ e baixa marcação para CD4+ e CD8+, por imuno-histoquímica, sugerindo-se que a principal subpopulação de células T do encéfalo poderia ser do imunofenótipo CD3+CD4-CD8-.

Desta forma, considerando que é possível a passagem de células do sangue periférico para o liquor e que há predomínio de infiltrado inflamatório de linfócitos T no SNC de cães com LV (MELO et al., 2009), a finalidade desta pesquisa foi auxiliar o esclarecimento da origem do processo inflamatório observado no encéfalo de cães com LV, sendo que a hipótese esperada seria a migração de células inflamatórias sanguíneas para o liquor e, conseqüentemente, para o SNC, principalmente de células T duplo negativas.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram: avaliar e comparar os imunofenótipos de linfócitos T CD3+CD4+, CD3+CD8+, duplo positivos (DP) e duplo negativos (DN) no sangue periférico e no liquor, bem como determinar o TCR predominante; caracterizar as lesões encefálicas e correlacioná-las com os imunofenótipos de linfócitos T presentes no liquor de cães com LV.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, Unesp, Campus de Araçatuba, processo #01463-2012.

4.2 Animais

Foram utilizados 17 cães provenientes do Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Araçatuba-SP, com diagnóstico positivo para leishmaniose. A eutanásia foi autorizada pelos proprietários em cumprimento da Lei Estadual vigente (SÃO PAULO, 2006).

4.3 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral

Os cães deste estudo foram selecionados com base nos diagnósticos positivos por exame sorológico (ELISA), conforme Lima et al. (2005) e parasitológico (punção biópsia aspirativa de linfonodos) para leishmaniose. Foram incluídos apenas cães com pelo menos três sinais clínicos da doença (ex.: onicogribose, aumento de volume de linfonodos e baço, caquexia, lesões cutâneas).

4.4 Colheita de Material

Foi feita colheita de 4mL de sangue em tubo com heparina sódica por meio de punção da veia jugular antes da aplicação do anestésico geral nos cães. Os animais foram então sedados com pentobarbital sódico (Hypnol® 3%) e amostra do LCR foi colhida por punção na articulação atlanto-occipital, com os animais em decúbito lateral e sob anestesia geral. O volume máximo retirado foi de 1mL para cada 5Kg de massa corporal, conforme Schwartz et al. (2008). Somente foram incluídas neste estudo as amostras de líquido cefalorraquidiano livres de contaminação sanguínea.

Os cães foram eutanasiados com cloreto de potássio (19%) por via intravenosa. A eutanásia foi feita segundo a Resolução nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais.

O encéfalo foi colhido imediatamente após a administração de cloreto de potássio e verificação da morte do animal e foi fixado em formalina 10% para inclusão em parafina. Após o tempo de manutenção no fixador, foram obtidos cortes coronais de regiões do cérebro, tronco cerebral e cerebelo, de onde foram selecionados fragmentos das seguintes áreas: córtex temporal, córtex piriforme, hipocampo, tálamo, regiões periventriculares, plexo coroide dos ventrículos laterais e 4º ventrículo e cerebelo. As amostras foram incluídas em parafina segundo procedimentos de rotina e cortes de 5 µm foram corados pela hematoxilina-eosina (H-E) para a avaliação e caracterização das lesões inflamatórias.

A presença de células inflamatórias no plexo coroide, subepêndima e leptomeninges foi avaliada semiquantitativamente por meio de escala de 0-3, sendo que 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, intensa presença de células inflamatórias (acúmulo intenso e difuso de grande quantidade de células).

4.5 Citometria de Fluxo

Para avaliação e quantificação dos fenótipos de linfócitos T CD3⁺ e os TCRs $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ em cães com leishmaniose visceral, o sangue e o líquido cefalorraquidiano foram processados e analisados de forma pareada imediatamente após a colheita.

O protocolo seguiu em linhas gerais o trabalho de Guarga et al. (2002) e Lima et al. (2012), com modificações. Para separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP), foi utilizado gradiente de Ficoll-PaqueTM Plus (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer. Cerca de 1×10^5 células foram utilizadas para marcação de CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$. Inicialmente foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com soro autólogo canino a 10%. As amostras foram então incubadas por 60 minutos a 4°C com os anticorpos monoclonais conjugados produzidos para a espécie canina da Serotec[®]: anti CD3 FITC (clone CA17.2A12), anti CD4 RPE (clone YKIX302.9) e anti CD8 Alexa Fluor[®] (clone YCATE55.9).

Para a identificação dos TCRs foram utilizados anticorpos monoclonais primários produzidos em camundongo para a espécie canina (anti-TCR $\alpha\beta$ = clone CA15.8G7; anti-TCR $\gamma\delta$ = clone CA20.8H1) e anticorpos secundários policlonais para camundongo produzidos em cabra (ab99912 RPE para o TCR $\alpha\beta$ e ab98697 FITC para o TCR $\gamma\delta$; Abcam[®]), que foram incubados também por 60 minutos. Foi feita incubação de outra alíquota com isotipo controle e uma alíquota foi deixada sem qualquer marcação. Após o período de incubação foram feitas lavagens das amostras com PBS contendo 2% de soro fetal bovino e, posteriormente, adicionou-se tampão de estocagem (formol 10% diluído em PBS).

Os isotipos controles que foram utilizados tanto no sangue como no liquor foram: IgG1 conjugado a FITC (camundongo) para o CD3, IgG1 conjugada a A647 (rato) para o CD4 e IgG2a conjugado a RPE (rato) para o

CD8; IgG1 conjugada a RPE (camundongo) para o TCR $\alpha\beta$; e IgG2a conjugada a FITC (camundongo) para o TCR $\gamma\delta$.

As amostras de liquor foram centrifugadas repetidas vezes a 800xg por 10 minutos a 20°C e o pellet foi separado e ressuspenso em PBS1x. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e cerca de 1×10^5 células foram utilizadas para marcação com os anticorpos monoclonais. A marcação de CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ e TCR $\gamma\delta$ foi realizada como descrito anteriormente para o sangue. Posteriormente foi realizada correlação entre os imunofenótipos de linfócitos do liquor e a intensidade da inflamação do encéfalo.

A aquisição das células foi feita em um citômetro de fluxo EasyCyte mini® (Guava, Hayward, CA) e os dados foram analisados por meio do software CytoSoft.

4.6 Análise Estatística

A comparação entre as células do sangue e do liquor foi realizada por meio de teste de Wilcoxon pareado. A análise estatística para comparação entre as subpopulações de linfócitos T foi feita por teste de Friedman, seguido por teste de Dunn pareados.

Para a avaliação das lesões observadas no encéfalo foi feito teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para a correlação entre a intensidade de inflamação encefálica e as células do liquor foi feito teste de Spearman.

A mediana foi usada como estimador de medida de posição e o intervalo interquartil, como estimador de medida de dispersão. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises foram realizadas usando-se o software estatístico *Prism* (Prism 5, GraphPad).

5 RESULTADOS

5.1 Exame Macroscópico

A Tabela 1 relaciona as principais alterações encontradas durante o exame necroscópico dos animais. Os achados mais prevalentes foram representados por alterações dermatológicas (seborréia, alopecia generalizada, hiperqueratose de plano nasal, hipotricose em membros), linfadenopatia generalizada, onicogribose, caquexia, alterações oftálmicas (conjuntivite e secreção ocular) e atrofia dos músculos temporais. Todos os cães deste estudo não apresentaram sinais clínicos neurológicos da doença.

Tabela 1- Alterações observadas no exame macroscópico dos cães sintomáticos com leishmaniose visceral.

Alterações macroscópicas	Sintomáticos	
	n = 17	
	N	%
Alterações dermatológicas	14	82,35
Linfadenomegalia	13	76,47
Onicogribose	9	52,94
Caquexia	9	52,94
Alterações oftálmicas	5	29,41
Atrofia de musculatura temporal	2	11,76

n = nº de animais

5.2 Imunofenótipos de Linfócitos T

Os valores médios em porcentagem ($\pm$ desvio padrão) das células analisadas no sangue periférico e no líquido podem ser visualizados na Tabela 2. A quantificação total dos linfócitos T foi feita de acordo com a fluorescência de CD3+. Um “gate” foi feito na população de CD3+ para avaliação e quantificação das subpopulações de linfócitos T CD4+, CD8+, DP e DN, que podem ser observadas na Figura 1. Na Figura 2 é possível visualizar “dot plot” representativo dos TCRs.

Na análise dos fenótipos das populações não foi observada diferença entre as células do sangue e do líquido ($P>0,05$) (Tabela 2). A Figura 3 representa os valores individuais para todas as populações de células analisadas no sangue e no líquido nos cães com LV deste estudo, onde é possível observar que as células sanguíneas estão presentes na mesma proporção das células do líquido. Além disso, a maioria dos tipos celulares encontravam-se reduzidos em cães com LV, quando comparados com os padrões de cães saudáveis da literatura (Tabela 3). Já os linfócitos T DP e DN apresentaram-se em número elevado nos cães infectados.

Na Figura 4 é possível observar o resultado da comparação entre as subpopulações de linfócitos T CD3+ no sangue e no líquido de cães com LV. No sangue (Figura 4A) não foi observada diferença estatística entre a porcentagem de linfócitos T CD4+, CD8+ e DP. Além disso, não houve diferença entre os linfócitos T CD4+, DP e DN, apesar de os valores de linfócitos T DN serem os mais elevados ($P= 0,0004$).

No líquido (Figura 4B) também não foi observada diferença estatística entre os linfócitos T CD4+ e CD8+ e entre CD4+ e DP. Os imunofenótipos predominantes no líquido foram as células T DN e DP ($P<0,0001$). Tanto no sangue, como no líquido, verificou-se que os linfócitos T CD8+ apresentavam-se reduzidos, quando comparados aos linfócitos T DN.

Na Figura 5 observa-se que houve predomínio de linfócitos T com TCR $\alpha\beta$ +, tanto no sangue ($P<0,0001$) como no liquor ($P<0,0001$), enquanto linfócitos com TCR $\gamma\delta$ + foram encontrados em menor porcentagem.

Tabela 2- Valores médios das subpopulações de linfócitos T em sangue periférico e liquor em cães com leishmaniose visceral expressos em %.

Populações	CMSP	LCR	Estatística
CD3+	14,86 $\pm$ 5,29	15,15 $\pm$ 9,10	$P = 0,9632$
CD3+CD4+	13,42 $\pm$ 18,00	11,80 $\pm$ 10,91	$P = 0,4874$
CD3+CD8+	8,22 $\pm$ 7,92	6,11 $\pm$ 7,13	$P = 0,3060$
CD3+CD4+CD8+	26,19 $\pm$ 23,66	23,10 $\pm$ 21,95	$P = 0,8900$
CD3+CD4-CD8-	49,24 $\pm$ 27,34	59,07 $\pm$ 26,61	$P = 0,2633$
TCR $\alpha\beta$ +	9,30 $\pm$ 7,16	13,67 $\pm$ 10,82	$P = 0,1402$
TCR $\gamma\delta$ +	0,98 $\pm$ 1,93	1,47 $\pm$ 2,12	$P = 0,5016$

CMSP = células mononucleares do sangue periférico

LCR = líquido cefalorraquidiano

Estatística: Teste de Wilcoxon pareado ao nível de 5% de significância; sem significância estatística ($P>0,05\%$).

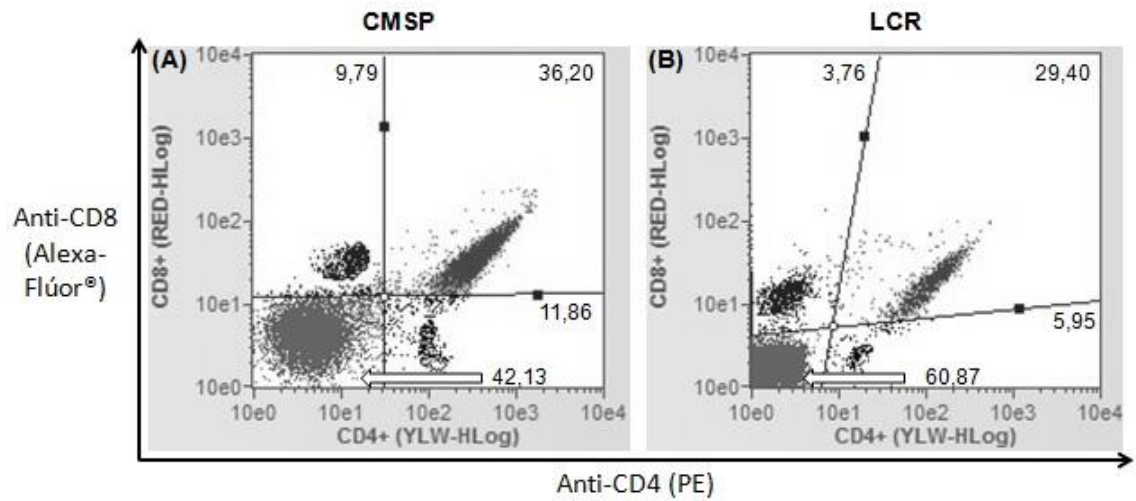


FIGURA 1- Análise por citometria de fluxo de sangue periférico (CMSP) e líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães com leishmaniose visceral. “Dot plot” de fluorescência representativo para CD3+CD4+, CD3+CD8+, DP e DN. **(A)** CMSP. **(B)** LCR. Os valores de cada subpopulação são apresentados em porcentagem.

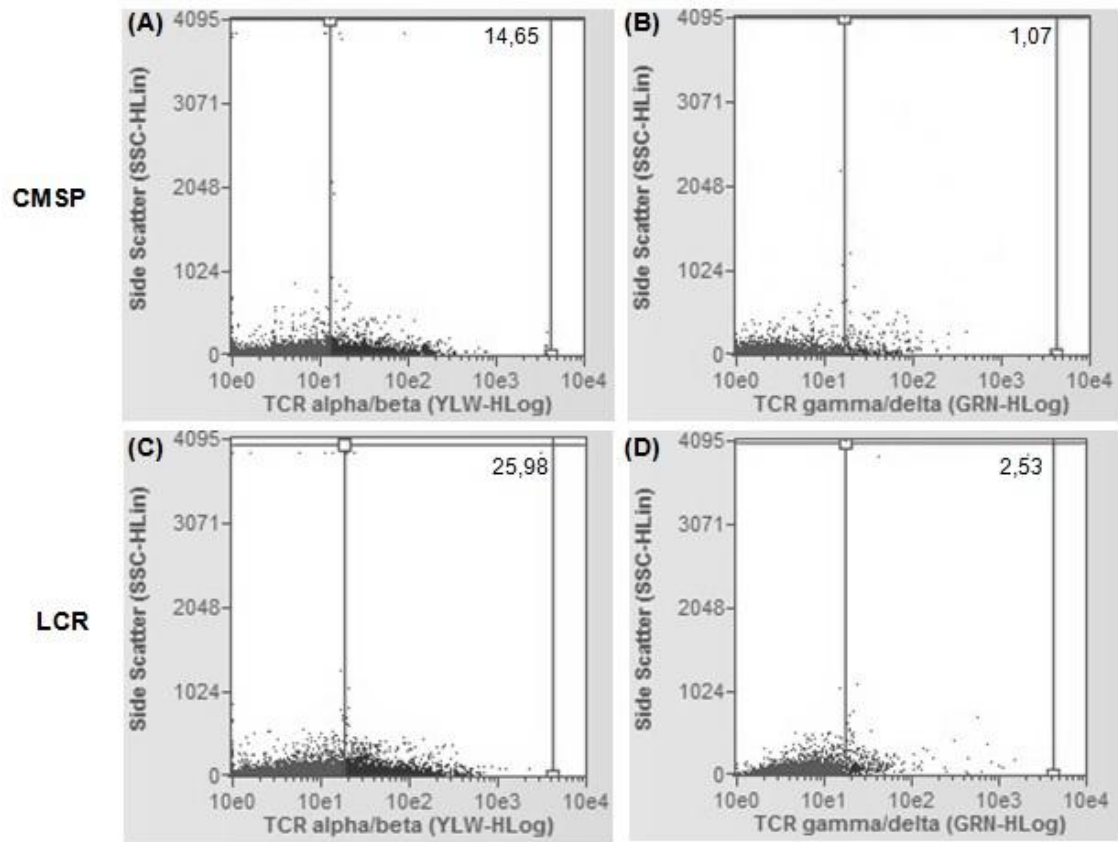


FIGURA 2- Análise por citometria de fluxo de sangue periférico (CMSP) e líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães com leishmaniose visceral. “Dot plot” de fluorescência representativo para TCRs. **(A)** TCR $\alpha\beta$ em CMSP. **(B)** TCR $\gamma\delta$ em CMSP. **(C)** TCR $\alpha\beta$ em LCR. **(D)** TCR $\gamma\delta$ em LCR. Os valores são apresentados em porcentagem.

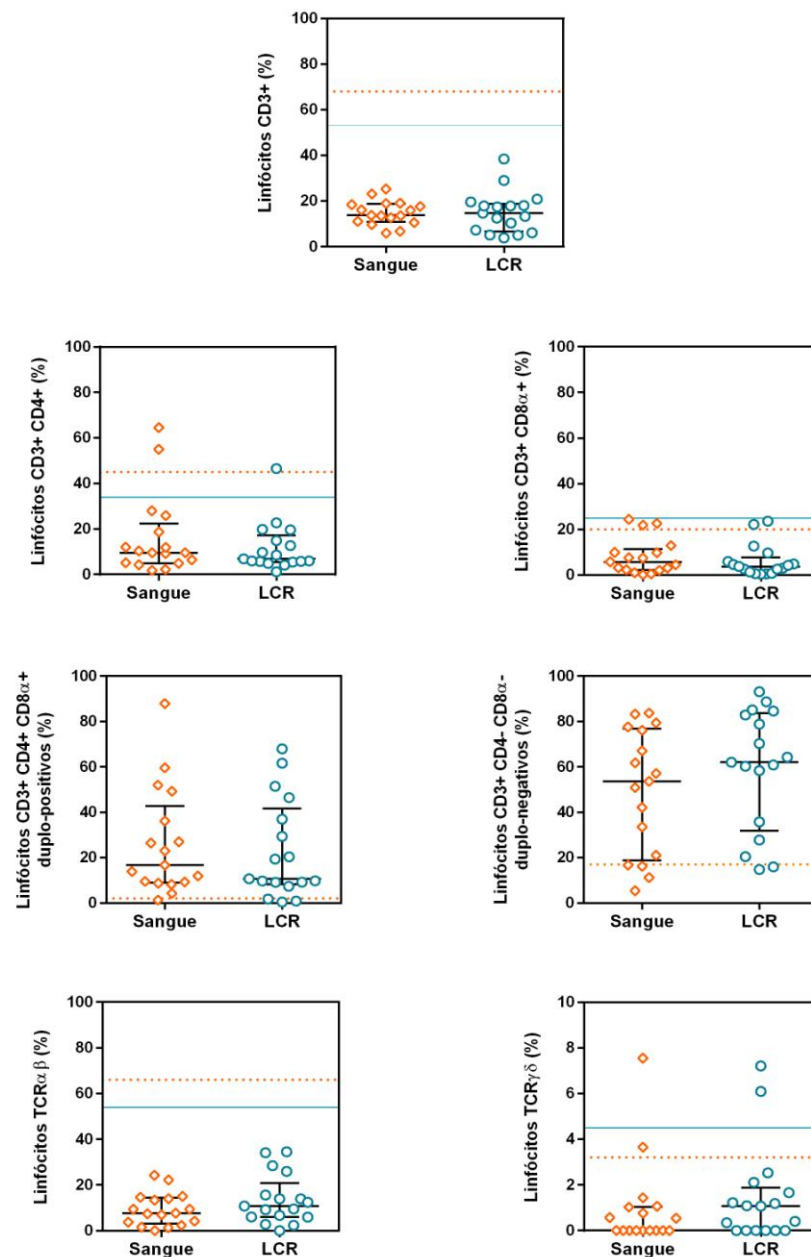


FIGURA 3- Imunofenótipos de linfócitos T analisados em cães com LV. Os valores estão expressos em porcentagem. As linhas horizontais contínuas representam as medianas (intervalo interquartil). As linhas tracejadas vermelhas correspondem aos valores normais de referência no sangue e as linhas azuis contínuas representam os valores normais de referência no líquido de cães saudáveis, segundo Tipold et al. (1998). Para as células DP e DN do sangue utilizou-se como referência o artigo de Alexandre-Pires et al. (2010). Ausência de diferença estatística significativa entre a quantidade de células T no sangue e líquido para todos os fenótipos avaliados.

Tabela 3- Valores médios das subpopulações de linfócitos T no sangue e no liquor de cães com LV e saudáveis expressos em %.

Populações	CMSP			LCR		
	Cães com LV	Saudáveis	*	Cães com LV	Saudáveis	*
CD3+	14,8	68,0	1	15,1	53,0	1
		70,0	2			
		80,6	3			
CD3+CD4+	13,4	39,1	4	11,8	28,6	6
		40,1	5		34,0	1
CD3+CD8+	8,2	22,1	4	6,1	22,0	6
		22,2	5		25,0	1
CD3+CD4+CD8+	26,1	2,0	2	23,1	-	-
CD3+CD4-CD8-	49,2	17,0	2	59,0	-	-
TCR $\alpha\beta$ +	9,3	66,0	1	13,6	54,0	1
TCR $\gamma\delta$ +	0,9	3,2	1	1,4	4,5	1

* Referências dos parâmetros de cães saudáveis descritos na literatura.

1 Tipold et al. (1998)

2 Alexandre-Pires et al. (2010)

3 Lima et al. (2012)

4 Watabe et al. (2011)

5 Itoh et al. (2009)

6 Duque et al. (2002)

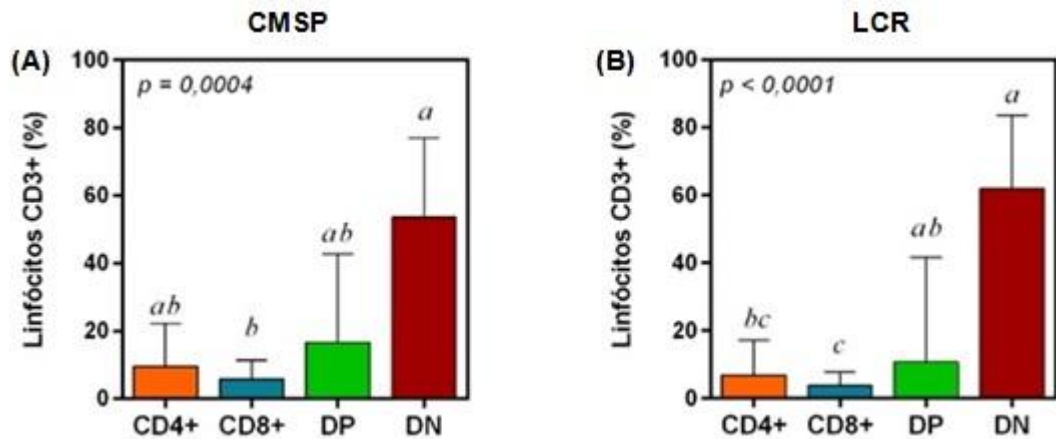


FIGURA 4- **(A)** Porcentagem das subpopulações de linfócitos T CD3+CD4+, CD3+CD8+, DP e DN no sangue periférico (CMSP) de cães com LV. **(B)** Porcentagem das subpopulações de linfócitos T CD3+CD4+, CD3CD8+, DP e DN no líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães com LV. As colunas representam a mediana (intervalo interquartil). Letras diferentes indicam significância estatística ao nível de 5%.

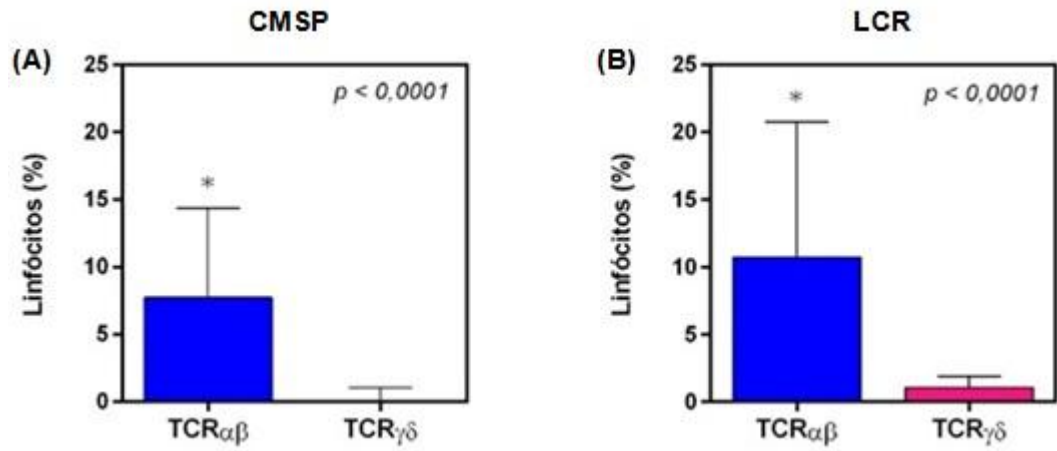


FIGURA 5- (A) Porcentagem de TCRs no sangue periférico (CMSP) de cães com LV, onde observa-se o predomínio de TCR $\alpha\beta$. (B) Porcentagem de TCRs no líquido cefalorraquidiano (LCR) de cães com LV, onde observa-se o predomínio de TCR $\alpha\beta$. As colunas representam a mediana (intervalo interquartil); * indica significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

5.3 Avaliação do Infiltrado Inflamatório no Encéfalo

Na análise histopatológica do encéfalo dos cães com LV foram verificadas alterações inflamatórias em leptomeninges, subepêndima e plexo coroide.

Detectou-se infiltrado de células mononucleares com infiltrado composto principalmente por células linfohistioplasmocitárias em plexo coroide e leptomeninges e células linfoplasmocitárias em áreas periventriculares, com intensidade da inflamação variando de leve a intensa. As leptomeninges foram o local de maior concentração de células inflamatórias, diferindo estatisticamente das outras áreas avaliadas. Não houve diferença estatística na avaliação da intensidade do infiltrado observado no plexo coroide e na região subependimária (Figura 6). Nas Figuras 7, 8 e 9 observa-se fotomicrografias representativas das três áreas encefálicas avaliadas, de acordo com a intensidade da inflamação.

Nas leptomeninges 58,8% dos cães apresentavam infiltrado de intensidade moderada de células inflamatórias (++), 35,3% intensidade leve (+) e 5,9% intensidade intensa (+++). No subepêndima 64,7% dos animais apresentaram intensidade leve, 11,8% intensidade moderada e 23,5% não apresentaram infiltrado inflamatório. No plexo coroide 35,3% dos cães apresentaram intensidade leve, 17,6% apresentaram intensidade moderada, 5,9% intensidade intensa e 41,2% não apresentaram infiltrado inflamatório (Figura 6). No estudo apresentado aqui não foram observadas formas amastigotas de *Leishmania chagasi* nos cortes corados por H-E.

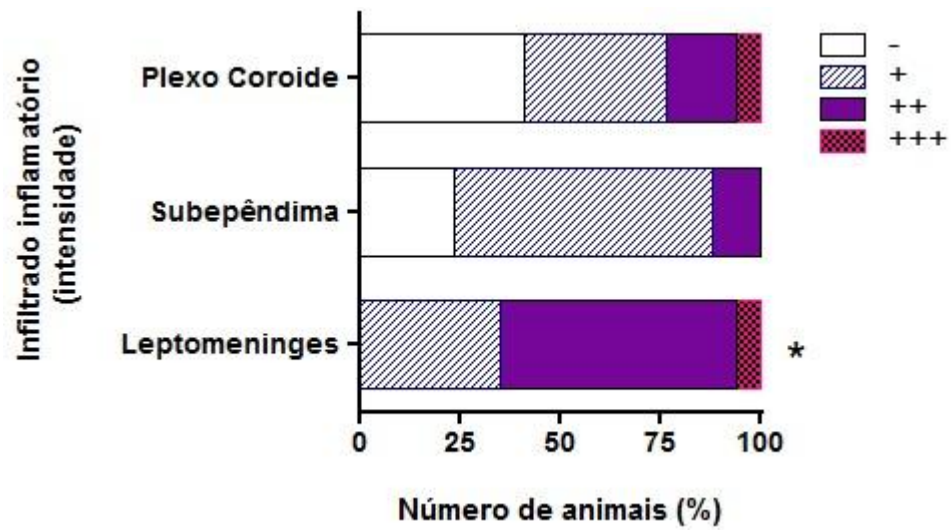


FIGURA 6- Porcentagem de cães em função da intensidade da inflamação no plexo coroide, região subependimária e leptomeninges. -: ausência de infiltrado inflamatório; +: infiltrado inflamatório discreto; ++: infiltrado inflamatório moderado; +++ infiltrado inflamatório intenso. * indica diferença estatística significativa.

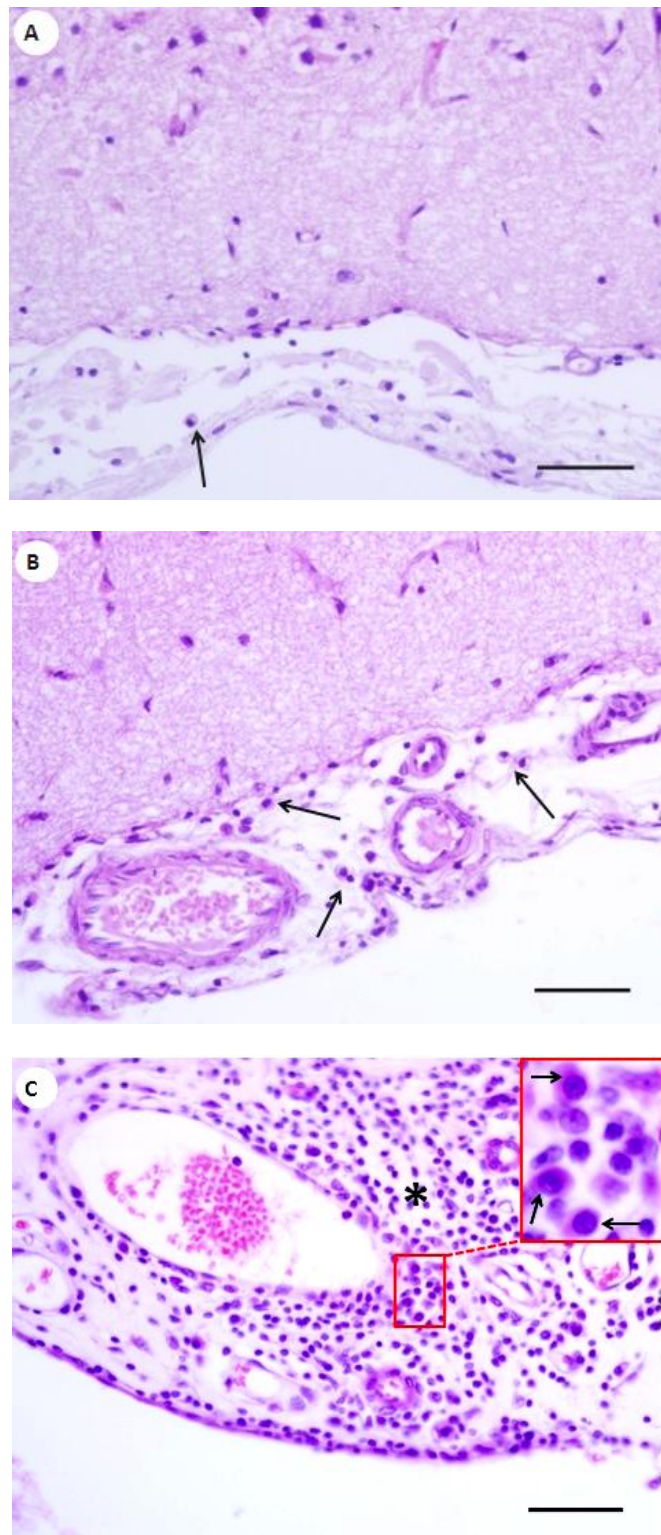


FIGURA 7- Fotomicrografias representativas do infiltrado inflamatório em leptomeninges de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (setas). **(C)** Infiltrado inflamatório intenso (*). No detalhe observa-se maior aumento; setas indicam presença de plasmócitos. Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 µm.

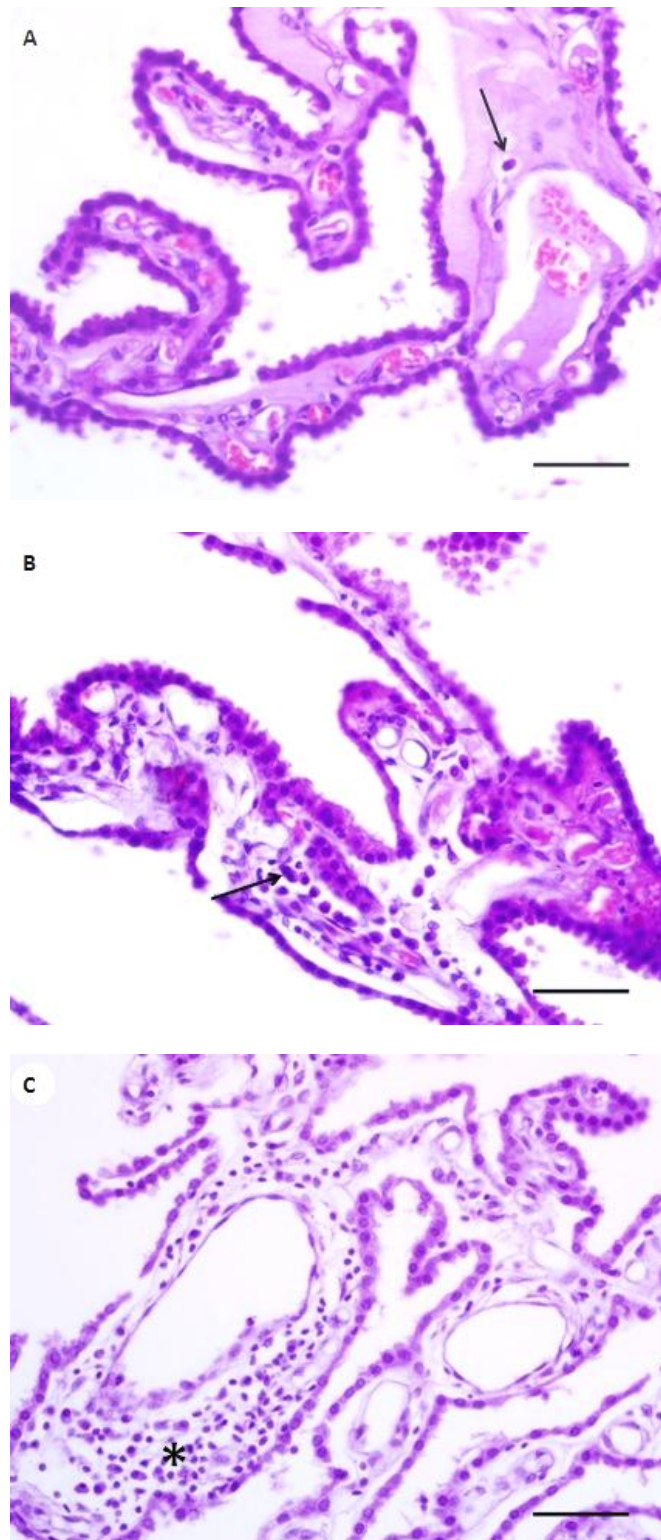


FIGURA 8- Fotomicrografias representativas do infiltrado inflamatório no plexo coroide de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (seta). **(C)** Infiltrado inflamatório intenso (*). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 µm.

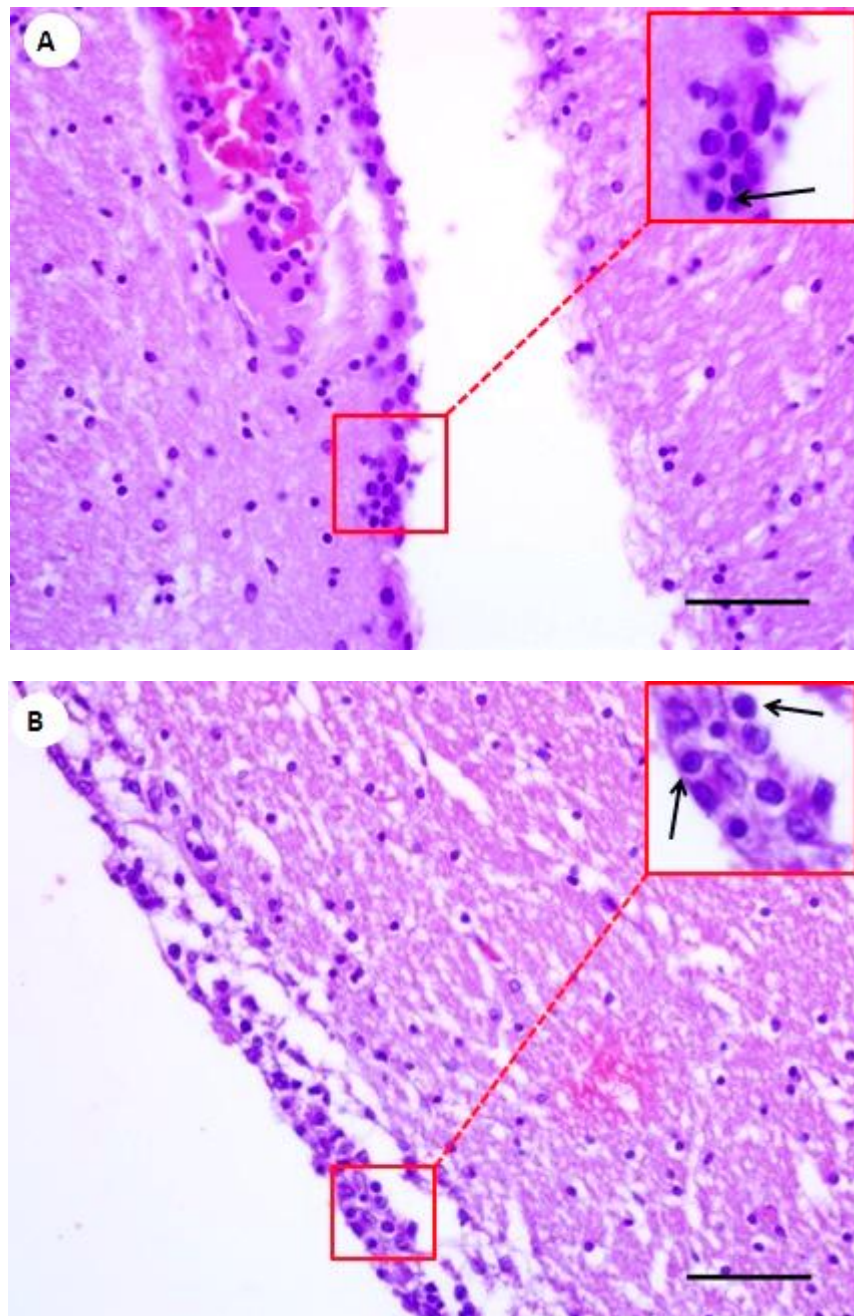


FIGURA 9- Fotomicrografias representativas do infiltrados inflamatório no subepêndima de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (seta). No detalhe observa-se maior aumento. Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m.

5.4 Correlação dos Imunofenótipos de Linfócitos T do Líquor com a Intensidade da Inflamação Encefálica

Na análise de correlação entre os imunofenótipos de linfócitos T do líquido e a intensidade da inflamação nas leptomeninges não foi observada correlação estatística entre esses dois parâmetros para nenhuma das células T avaliadas (CD3+CD4+: $P=0,6403$; CD3+CD8+: $P=0,4257$; DP: $P=0,0877$; DN: $P=0,3011$) (Figura 10). Como não houve correlação entre as células do líquido com a inflamação em leptomeninges, foi realizada também análise de correlação das células sanguíneas com a intensidade de inflamação nas leptomeninges, onde não foi observada correlação entre esses parâmetros (CD3+CD4+: $P=0,0711$; CD3+CD8+: $P=0,2655$; DP: $P=0,5991$; DN: $p=0,0787$) (Figura 11).

Por outro lado, no plexo coroide houve correlação negativa entre as células T DP do líquido e o processo inflamatório ($P=0,0224$). Quanto maior a intensidade da inflamação menor a quantidade de linfócitos T DP. Para os outros tipos celulares não houve correlação (CD3CD4+: $P=0,6518$; CD3+CD8+: $P=0,7799$; DN: $P=0,4338$) (Figura 12).

No subependíma houve correlação negativa para as células T CD3+CD4+ ($P= 0,0245$), CD3+CD8+ ($P<0,0001$) e DP ($P<0,0001$). Assim, quanto mais intenso o infiltrado inflamatório menor a quantidade de linfócitos T CD4+, CD8+. DP. Para as células DN foi observada correlação positiva com a intensidade da inflamação ($P=0,0042$). Deste modo, quanto mais intensa a inflamação na região subependimária, maior a quantidade de linfócitos DN foi detectada no líquido. (Figura 13).

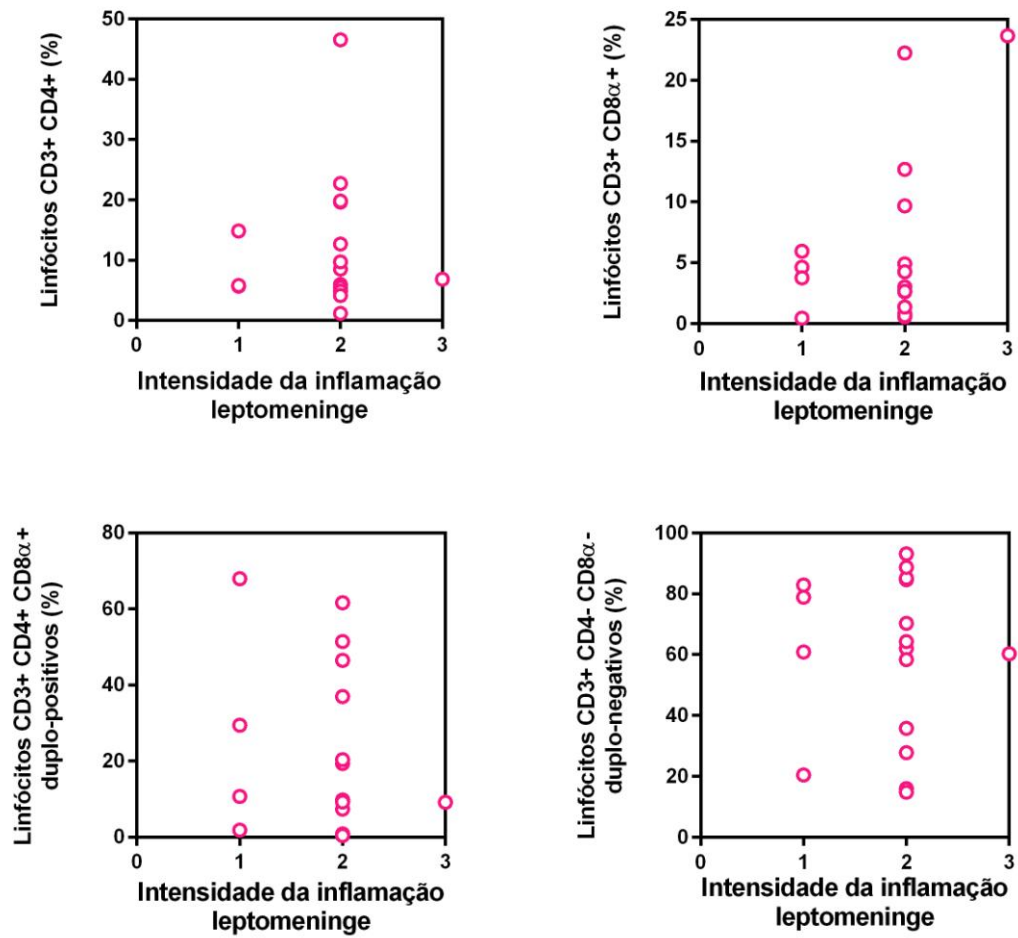


FIGURA 10- Correlação entre as intensidades da inflamação observada nas leptomeninges, em escala semiquantitativa de 0-3, e os imunofenótipos de linfócitos T do liquor. Observa-se ausência de correlação estatística.

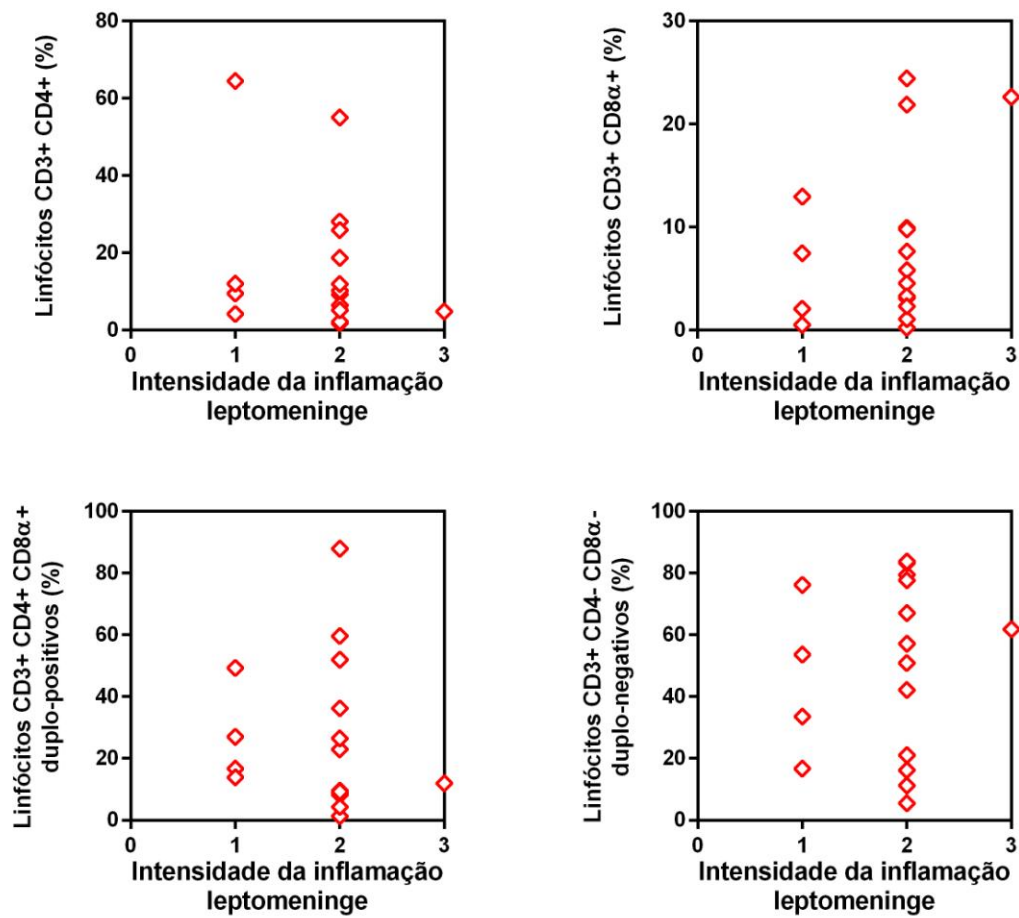


FIGURA 11- Correlação entre as intensidades da inflamação nas leptomeninges, em escala semiquantitativa de 0-3, e os imunofenótipos de linfócitos T do sangue periférico. Observa-se ausência de correlação estatística.

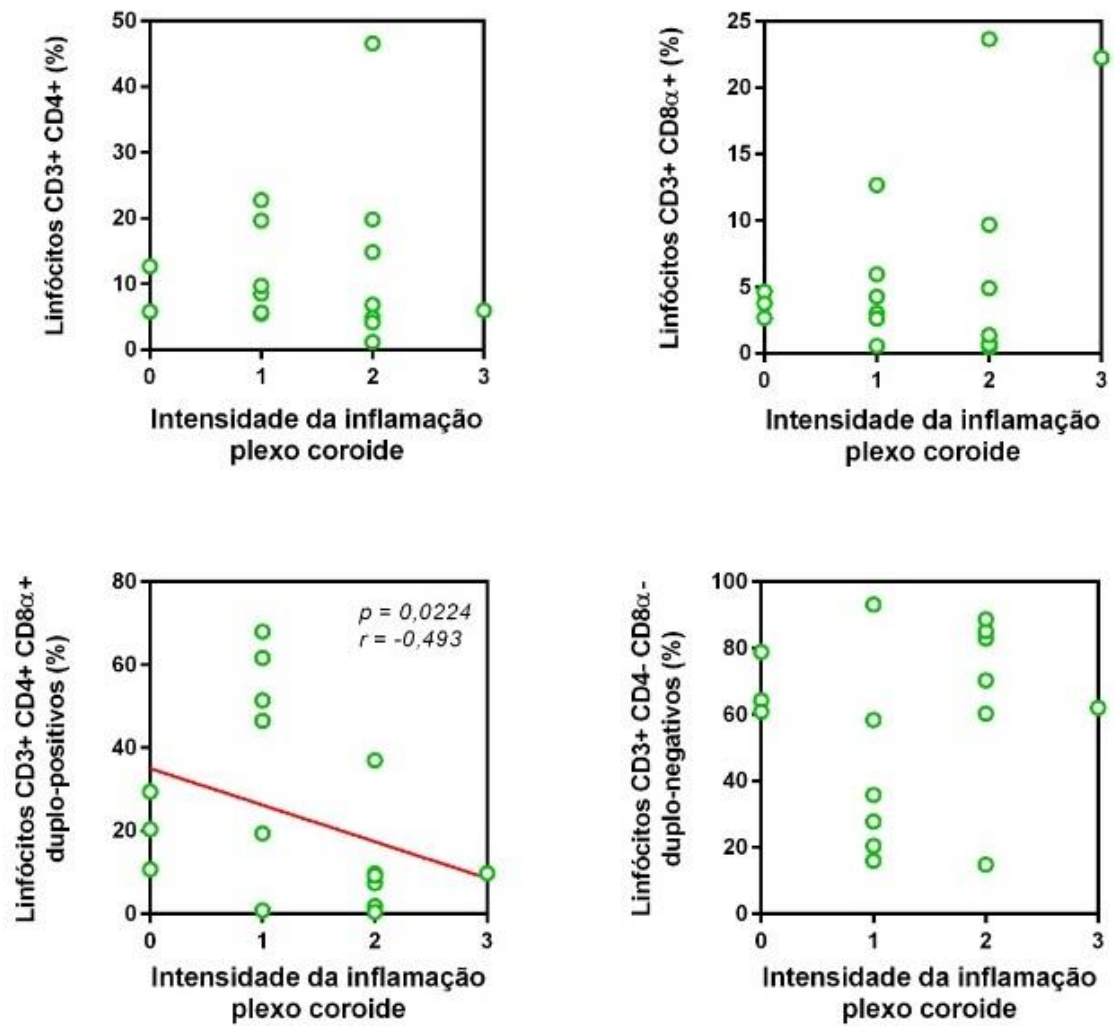


FIGURA 12- Correlação entre as intensidades da inflamação no plexo coroide, em escala semiquantitativa de 0-3, e os imunofenótipos de linfócitos T do liquor. A linha contínua representa a reta estimada.

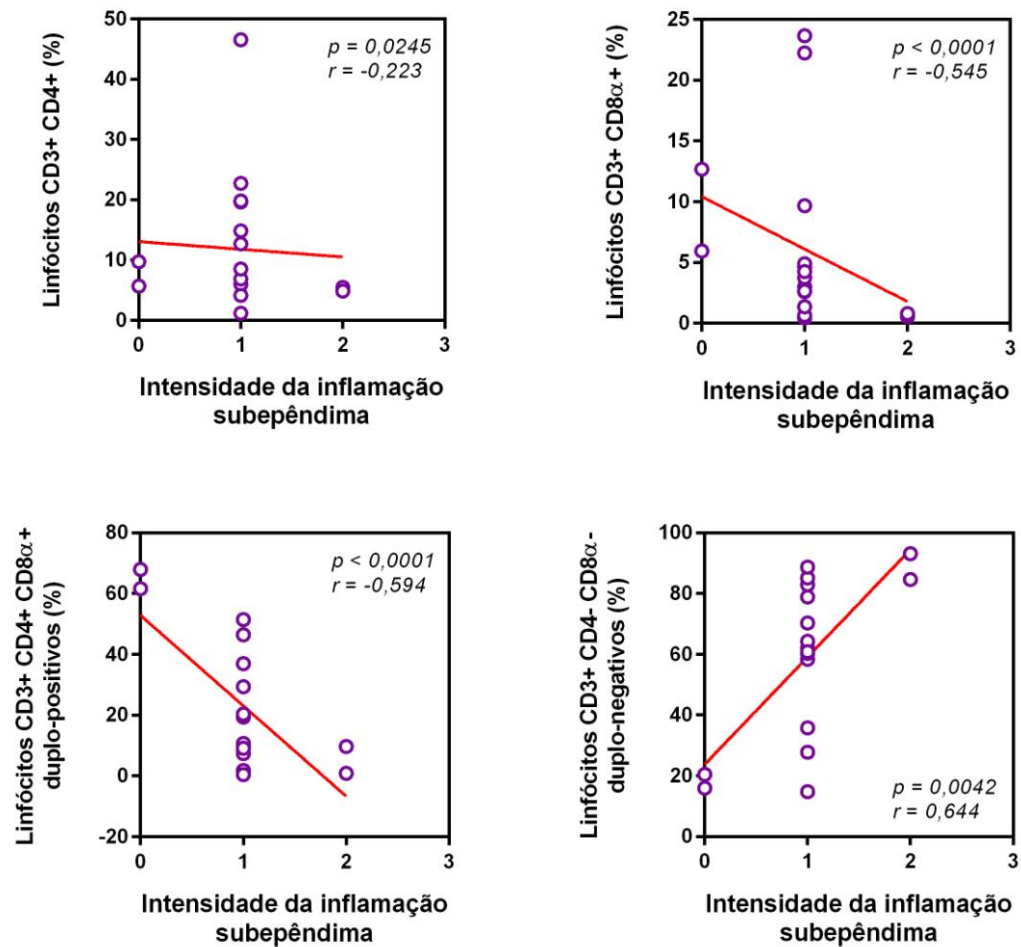


FIGURA 13- Correlação entre as intensidades da inflamação no subependíma, em escala semiquantitativa de 0-3, e os imunofenótipos de linfócitos T do liquor. A linha contínua representa a reta estimada.

6 DISCUSSÃO

A citometria vem se tornando uma ferramenta acessível na medicina veterinária (FALDYNA et al., 2001). Como o SNC é relativamente inacessível para muitos procedimentos diagnósticos comumente realizados em outros órgãos, achados no líquido cerebroespinal podem ser usados como ferramenta preditiva de afecções do parênquima do SNC em condições inflamatórias particulares (DUQUE et al., 2002). De acordo com a literatura consultada este é o primeiro estudo que determina todos os imunofenótipos propostos de linfócitos T no liquor de cães com LV.

Para a maioria das células analisadas, tanto no sangue como no liquor, verificou-se que houve grande variabilidade individual entre os cães com LV. Isto pode ocorrer devido a diferentes raças, idades e sexo dos cães infectados pelo parasita (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010).

Os cães com leishmaniose visceral apresentaram em média 14,86% de linfócitos T CD3+ no sangue periférico e 15,15% no líquido cefalorraquidiano. Esses resultados indicam que os linfócitos T estão reduzidos nos animais com LV, quando comparados com os valores de avaliações de cães saudáveis descritos previamente na literatura. Em cães saudáveis, Tipold et al. (1998) observaram 68% de linfócitos T CD3+ no sangue e 53% no liquor, Alexandre-Pires et al. (2010) verificaram 70% de células CD3+ no sangue e Lima et al. (2012) verificaram em média 80,6% no sangue.

A redução acentuada de linfócitos T CD3+ observada nos cães com LV deste estudo está de acordo com os relatos existentes na literatura sobre o assunto. Bourdoiseau et al. (1997) e Moreno et al. (1999) também relataram diminuição significativa de linfócitos T (CD3+) em animais infectados por *Leishmania infantum*. Segundo Lima et al. (2012), a redução do número de linfócitos T CD3+ em cães pode ocorrer devido a um nível superior de apoptose de células T nos cães infectados por *Leishmania chagasi*. Em pacientes humanos com leishmaniose visceral ativa, Hailu et al. (2005)

verificaram redução de linfócitos T no sangue, e os autores sugerem que isto poderia ser consequência do recrutamento dessas células para órgãos parasitados.

Avaliando as subpopulações de linfócitos T CD3+ nos cães com LV observamos redução de linfócitos CD4+ e CD8+ no sangue e líquido. Em média foram detectados 16,42% de linfócitos T CD3+CD4+ e 8,22% de CD3+CD8+ no sangue periférico; 11,80% de CD3+CD4+ e 6,11% de CD3+CD8+ no líquido. Os resultados indicam que as subpopulações de linfócitos CD4+ e CD8+ estão significativamente reduzidas nos animais com leishmaniose visceral. Em análises com animais saudáveis, Watabe et al. (2011) verificaram no sangue periférico 39,1%(±10,7) de linfócitos CD3+CD4+ e 22,1%(±8,4) de CD3+CD8+ e Itoh et al. (2009) determinaram 40,1% (±5,6) de CD3+CD4+ e 22,21%(±2,9) de CD3+CD8+. Para o líquido, Duque et al. (2002) descreveram 28,6%(±12,4) de CD3+CD4+ e 22%(±13,6) de CD3+CD8+, enquanto Tipold et al. (1998) relataram 34%(±8) de CD3+CD4+ e 25%(±19) de CD3+CD8+.

Os linfócitos T CD4+ são fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva na infecção por *Leishmania* e podem contribuir para a redução local da replicação de parasitas em alguns cães (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010). A redução de células T CD4+ também foi observada no sangue em outros estudos com leishmaniose canina (GUERRA et al., 2009; REIS et al., 2006).

Os linfócitos T CD8+ têm sido correlacionados com o controle da leishmaniose visceral em humanos (MARY et al., 1999) e camundongos (GOMES-PEREIRA et al., 2004), mas poucos estudos têm demonstrado o envolvimento dessas células na leishmaniose canina. A redução de linfócitos T CD8+ foi relatada por Bourdoiseau et al. (1997) no sangue dos cães com leishmaniose, estando portanto de acordo com os resultados obtidos neste trabalho.

Os cães com LV apresentaram em média 26,19% de linfócitos T CD3+ DP no sangue e 23,10% no líquido; e 49,24% de linfócitos T CD3+ DN no sangue e 59,07% no líquido. Esses resultados indicam que os linfócitos T DP e

DN estão presentes em quantidades elevadas no sangue periférico de cães com LV, quando comparados com os valores de cães saudáveis descritos por Alexandre-Pires et al. (2010), que observaram no sangue de animais saudáveis cerca de 2% de células T DP e 17% de DN. Por outro lado, em estudo com leishmaniose cutânea humana Antonelli et al. (2006) observaram que a porcentagem média de linfócitos T DN no sangue dos pacientes infectados pelo parasita foi menor do que nos pacientes saudáveis.

As células T DN foram também descritas em pacientes humanos com doenças autoimunes (NALBANDIAN et al., 2009; TEACHEY et al., 2005). Para Reinhardt e Melms (2000) os linfócitos T DN têm participação na patogênese da miastenia gravis e estão correlacionados com a doença e achados histológicos. Pacientes com lúpus eritematoso possuem elevada população de células T DN, que são as principais produtoras de IL-17, umas das citocinas pró-inflamatórias envolvidas nesta doença (NALBANDIAN et al., 2009). Considerando que manifestações clínicas ou laboratoriais de doenças autoimunes, como o aumento de anticorpos autoimunes, já foram descritas em cães e pacientes humanos com LV (GINEL et al., 2008; LIBEROPOULOS et al., 2012), as células T DN podem estar atuando em cães com LV de maneira similar ao que ocorre em doenças autoimunes, contribuindo para o desenvolvimento e a progressão da doença.

A atividade pró-inflamatória das células T DN tem sido observada durante o desenvolvimento dessas células no timo, onde timócitos CD44⁺ DN produziram elevados níveis de IL-2, TNF- α e IFN- γ (ZLOTNIK et al., 1992). Na leishmaniose já foram descritas algumas dessas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IFN- γ e IL-17 (KOSTKA et al., 2009; MELO et al., 2013).

Melo et al. (2013) verificaram que a presença de citocinas proinflamatórias como IL-1 β e TNF- α promove o início, a manutenção e a persistência da inflamação no SNC de cães com LV. Deste modo, é possível que a presença de elevada porcentagem de células T DN no liquor esteja influenciando o processo inflamatório observado no SNC dos cães deste

estudo, possivelmente pela produção de citocinas pró-inflamatórias no local e migração das células para o encéfalo.

Um número elevado de linfócitos T DP também foi observado em humanos com doenças autoimunes como a tireoidite auto-imune (IWATANI et al., 1993), dermatite atópica (BANG et al., 2001), câncer (SARRABAYROUSE et al., 2011) e infecção viral (SUNI et al., 2001). Esta população de células também foi observada nos linfócitos do sangue periférico de cães com LV (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010), estando de acordo com os resultados deste trabalho.

Não houve diferença estatística entre a população de linfócitos CD4+, CD8+ e DP no sangue e entre CD4+ e CD8+ e CD4+ e DP no liquor, ao contrário do que é observado no sangue de cães normais, onde a população de linfócitos CD4+ é significativamente maior do que a de CD8+ (DUQUE et al., 2002; ALEXANDRE-PIRES et al., 2010).

Além disso, no sangue dos cães deste estudo observou-se que não houve diferença entre as células T CD4+, DP e DN, que estão predominando neste compartimento. No liquor as células T DN e DP foram os linfócitos predominantes. Por outro lado, Alexandre-Pires et al. (2010) observaram maior porcentagem de células CD4+, seguida por CD8+, DN e DP no sangue de animais sintomáticos para LV, o que difere dos resultados obtidos no presente estudo.

Os cães com LV apresentaram em média 9,30% de TCR $\alpha\beta$ no sangue e 13,67% no liquor, e 0,98% de TCR $\gamma\delta$ no sangue e 1,47% no liquor, em relação às células totais. Deste modo, houve predomínio de linfócitos com TCR $\alpha\beta$ no sangue e no liquor de cães com LV, o que também ocorre em animais saudáveis em ambos tecidos de acordo com Tipold et al. (1998). Esses autores verificaram dentro da subpopulação de linfócitos, em média 66% de TCR $\alpha\beta$ no sangue e 54% no liquor e 3,2% de TCR $\gamma\delta$ no sangue e 4,5% no liquor de cães sadios.

Os linfócitos T $\gamma\delta$ representam uma pequena população na circulação, estando de acordo com os valores observados neste estudo. Este fenótipo é

descrito como sendo mais abundante nas mucosas, na pele, no pulmão e em outros tecidos epiteliais (ANDREW; CARDING, 2005; RANSOHOFF et al., 2003).

Verificou-se também que todos os imunofenótipos de linfócitos T analisados no sangue apresentavam-se em proporção similar às células do liquor, não havendo diferença entre os dois compartimentos. Por outro lado, Duque et al. (2002), observaram maior proporção de células CD4+ no sangue do que no liquor em estudo com imunofenotipagem de linfócitos T em cães saudáveis. A diferença estatística não significante entre as células sanguíneas e as células do liquor é indicativa de déficit na barreira hematoliquórica, o que possibilitaria a migração das células do sangue para o liquor.

Disfunções na barreira hematoencefálica têm sido descritas em muitas doenças neurológicas, não somente como um evento que ocorre em fase tardia da doença, mas também estão envolvidas nas etapas iniciais da progressão da doença. A disfunção da barreira pode ocorrer quando há o aumento de sua permeabilidade com difusão passiva de substâncias sanguíneas pelas “tight junctions” da barreira ou quando há infiltração celular massiva pela BHE (WEISS et al., 2009). Deste modo, considerando que as células do sangue e do liquor deste estudo estão presentes na mesma proporção, sugere-se, assim como ocorre na barreira hematoencefálica, um aumento da permeabilidade da barreira hematoliquórica nos cães infectados por *Leishmania*, o que permitiria a passagem das células do sangue para o liquor. Uma vez que as células estão presentes no liquor, podem ter livre acesso ao parênquima encefálico por meio da migração pela parede ventricular, constituindo o infiltrado subependimário observado em alguns cães. Em resposta à lesão no subepêndima, pode ocorrer ativação da micróglia, sendo que é possível a migração de células microgliais periventriculares para regiões mais profundas do parênquima cerebral (CARBONELL et al., 2005). Isto poderia causar a ativação do processo inflamatório no SNC. Ainda, as células inflamatórias no liquor poderiam produzir citocinas pró-inflamatórias que, por difusão, poderiam

estimular a glia periventricular, provocando reatividade dessas células, assim como observado por Melo e Machado (2011).

A diminuição da filtração seletiva da barreira hematoliquórica, como sugerido no presente estudo, foi sugerida previamente por Lima et al. (2003) ao observar correlação dos títulos de anticorpos no soro e no liquor de cães infectados por *Leishmania chagasi*.

Em relação aos achados histopatológicos do encéfalo, todos os cães desse estudo demonstraram discreto a intenso infiltrado de células mononucleares, estando de acordo com Melo et al. (2009), que detectaram os linfócitos T CD3⁺ como a principal população inflamatória presente no SNC em cães com leishmaniose visceral.

Viñuelas et al. (2001), em estudo histopatológico em cães com LV, verificaram inflamação crônica com presença de infiltrado de linfócitos e plasmócitos em meninges, sendo que a inflamação foi mais intensa em regiões perivasculares. Isto está de acordo com nosso trabalho, onde detectamos infiltração de células linfohistioplasmocitárias principalmente em áreas perivasculares de leptomeninges. A observação de meningite em cães com leishmaniose visceral passaram a receber maior atenção após descrição da presença de amastigotas de *Leishmania* no líquido de uma criança infectada cronicamente pelo parasita e que apresentava sintomas de meningite (PRASAD; SEN, 1996).

Nos cães com LV também foi observada infiltração linfoplasmocitária no plexo coroide e na região subependimária. Alterações histopatológicas no plexo coroide e meninges são comuns em infecções por vírus e algumas doenças parasitárias, tendo sido relatadas mais comumente em humanos (VIÑUELAS et al., 2001). Além disso, não foi observada a presença de amastigotas de *Leishmania* nas avaliações histopatológicas do encéfalo, estando de acordo com estudos anteriores, onde não foi detectada a presença do parasita no SNC (IKEDA et al., 2007; MELO; MACHADO, 2009; 2011).

No presente estudo não foi observada correlação entre os tipos celulares pesquisados no liquor e no sangue com a intensidade de inflamação nas

leptomeninges. Apesar disso, os vasos sanguíneos das meninges foram descritos como uma rota de entrada de leucócitos no encéfalo, podendo extravasar para o espaço subaracnoide, onde está o liquor, ou para o espaço perivascular (RANSOHOFF et al., 2003), o que poderia causar inflamação no local. A avaliação feita por citometria neste estudo teve como objetivo principal a imunofenotipagem de linfócitos TCD3+, tendo em vista que estas células foram previamente detectadas no encéfalo de cães com LV (MELO et al., 2009). As lesões da LV se caracterizam pela presença de infiltrado linfohistioplasmocitário (MELO et al., 2009). Assim, é possível que o infiltrado inflamatório observado nas leptomeninges tenha composição diferente das outras regiões avaliadas, com presença de mais plasmócitos (Figura 7C), histiócitos e linfócitos B do que de linfócitos T e, por isso, não foi observada correlação neste tecido.

Correlação entre a intensidade da inflamação no plexo coroide e a quantidade de linfócitos T do liquor foi observada apenas para o fenótipo DP. A migração das células sanguíneas para o liquor por meio do plexo coroide tem sido descrita como uma das principais rotas de migração de leucócitos tanto em condições fisiológicas, como em algumas afecções (PROVENCIO; VORA, 2005; RANSOHOFF et al., 2003). No estudo apresentado aqui, ocorreu redução do número das células DP no liquor, conforme o aumento da intensidade da inflamação no plexo foi observado, sugerindo que com a evolução neurológica da doença, estas células poderiam ficar retidas no plexo coroide.

Na região subependimária, quanto mais intensa a inflamação, menor a quantidade das células T DP, e também das células T CD3+CD4+ e CD3+CD8+ no liquor. Por outro lado, houve correlação positiva entre a intensidade da inflamação e as células T DN no liquor. Isto indica que com o aumento da inflamação na região subependimária, as células DN podem estar migrando desta para o liquor. Essa rota de migração foi proposta previamente por Alvarez e Teale (2007) em estudo com neurocisticercose. Esses autores observaram que as células sanguíneas podem atingir o SNC por meio dos

vasos subependimários, penetrando a camada de células do epêndima, após injúria desta, chegando então no liquor. Assim, os imunofenótipos dos linfócitos T observados no liquor podem ter origem a partir de diferentes vias de migração celular.

A atividade pró-inflamatória das células T DN já foi descrita em algumas doenças autoimunes como o lúpus (NALBANDIAN et al., 2009). Embora a leishmaniose cutânea apresente mecanismos imunopatogênicos diferentes da forma visceral, Bottrel et al. (2001) atribuem às células T DN a produção de IFN- γ do sangue periférico. Deste modo, é possível que as células T DN estejam atuando no liquor de modo a contribuir para o agravamento da inflamação encefálica, talvez pela produção de citocinas inflamatórias neste local. Em resposta à produção de citocinas no liquor pode haver estimulação das células da glia, como já foi verificado por Kong et al. (2002) após estímulo com mediadores inflamatórios no liquor. Desta forma, é possível que as células T DN estejam atuando no desenvolvimento e progressão neurológica da LV canina. Considerando o elevado número de células T DN e que não houve diferença estatística na quantidade destas células entre o sangue e o liquor, o processo inflamatório encefálico pode estar relacionado a este tipo celular e ao sistema imune periférico. Isto corrobora com o trabalho de Garcia-Alonso et al. (1996) e Ikeda et al. (2007) que observaram que as alterações inflamatórias descritas no SNC de cães com leishmaniose visceral podem ser consideradas como consequência de estímulos imunológicos periféricos, além da deposição de imunocomplexos e antígenos circulantes.

7 CONCLUSÃO

No estudo apresentado aqui, observou-se que cães com LV apresentam alteração no perfil dos imunofenótipos de linfócitos T no sangue periférico e que esta alteração se reflete no liquor, o que evidencia o comprometimento da BHL. Isso permite a migração das células do sangue para o liquor, contribuindo consequentemente para o processo inflamatório observado no encéfalo.

As correlações observadas entre as células T do liquor e a intensidade da inflamação no plexo coroide e subepêndima indicam participação de ambas estruturas na migração de linfócitos para o SNC durante a LV. A ausência de correlação nas leptomeninges indica que o infiltrado inflamatório dessa região pode ser predominantemente composto por plasmócitos, histiócitos e linfócitos B. Além disso, a correlação positiva entre a inflamação no subepêndima e as células T DN do liquor sugere que essas células podem chegar ao encéfalo a partir dos vasos sanguíneos subependimários, além do trajeto pelo plexo coroide. As células T DN poderiam também estar estimulando a produção de citocinas no liquor, contribuindo para a progressão neurológica da LV canina e para o processo inflamatório observado no encéfalo dos cães infectados.

Novos estudos são necessários para determinar a função das células DN e DP na LV canina, bem como a determinação das vias de migração das células inflamatórias para o SNC.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. (Ed.) **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564p.

AKARI, H.; TERAOKA, K.; MURAYAMA, Y.; NAM, K.H.; YOSHIKAWA, Y. Peripheral blood CD4⁺CD8⁺ lymphocytes in cynomolgus monkeys are of resting memory T lineage. **Int. Immunol.**, v.9, p.591–597, 1997.

ALEXANDRE-PIRES, G.; BRITO, M.T.V.DE; ALGUERÓ, C.; MARTINS, C.; RODRIGUES, O.R.; FONSECA, I.P.DA; 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.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Adv Parasitol.**, v.57, p.1–88, 2004.

ALVAREZ, J.L.; TEALE, J.M. Differential changes in junctional complex proteins suggest the ependymal lining as the main source of leukocyte infiltration into ventricles in murine neurocysticercosis. **J. Neuroimmunol.**, v. 187, p. 102–113, 2007.

ANDREW, E.M.; CARDING, S.R. Murine $\gamma\delta$ T cells in infections: beneficial or deleterious? **Microbes Infect.**, v.7, n.3, p.529-536, 2005.

ANTONELLI, L.R.V.; DUTRA, W.O.; OLIVEIRA, R.R.; TORRES, K.C.L.; GUIMARÃES, L.H.; BACELLAR, O.; GOLLOB, K.J. Disparate Immunoregulatory Potentials for Double-Negative (CD4⁻ CD8⁻) $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Infect Immun.**, v.74, n.11, p.6317-6323, 2006.

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.

BANG, K.; LUND, M.; WU, K.; MOGENSEN, S.C.; THESTRUPPEDERSEN, K. CD4q CD8q (thymocyte-like) T lymphocytes present in blood and skin from patients with atopic dermatitis suggest immune dysregulation. **Br. J. Dermatol.**, v.144, p.1140 –7, 2001.

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.

BAUER, S.; KERR, B.J.; PATTERSON, P.H. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. **Nat. Rev. Neurosci.**, v.8, p.221–232, 2007.

BERRIH, S.; GAUD, C.; BACH, M.A.; LE BRIGAND, H.; BINET, J.P.; BACH, J.F. Evaluation of T cell subsets in myasthenia gravis using anti-T cell monoclonal antibodies. **Clin. Exp. Immunol.**, v.45, 1±8, 1981.

BISMARCK, D.; SCHUTZE, N.; MOORE, P.; BUTTNER, M.; ALBER, G.; BUTTLAR, H.V. Canine CD4+CD8+ double positive T cells in peripheral blood have features of activated T cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.149, p.157– 166, 2012.

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORE, J.L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **Vet. J.**, v.162, p.108–120, 2001.

BONOMO, A.; KEHN, P.J.; SHEVACH, E.M. Premature escape of doublepositive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. **J. Immunol.**, v.152, p.1509±14, 1994.

BORDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* infected treated and untreated dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.59, p.21–30, 1997.

BOTTREL, R. L.; DUTRA, W.O.; MARTINS, F.A.; GONTIJO, B.; CARVALHO, E.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; ALMEIDA, R.P.; MAYRINK, W.; LOCKSLEY, R.; GOLLOB, K.J. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v.69, p.3232–3239, 2001.

BRANDONISIO, O.; ALTAMURA, M.; CARELLI, G.; CECI, L.; ANTONACI, S.; JIRILLO, E. Lymphocyte functions in *Leishmania infantum* infected dogs. **J. Immunol. Immunopathol.**, v.9, 37–40. 1988.

BROOKS, E.G.; BALK, S.P.; AUPEIX, K; COLONNA, M.; STROMINGER, J.L.; GROH-SPIES, V. Human T-cell receptor (TCR) α/β + CD4-CD8- T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V_{β} -gene families, and phenotypically resemble memory T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.90, p.11787–11791, 1993.

CARBONELL, W.S.; MURASE, S.-I.; HORWITZ, A.F.; MANDELL, J.W. Infiltrative microgliosis: activation and long-distance migration of subependymal microglia following periventricular insults. **J. Neuroinflammation**, v.2, n.5, 2005.

CARRITHERS, M. D.; VISINTIN, I.; VIRET, C.; JANEWAY JUNIOR, C. S. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. **J. Neuroimmunol.**, v.129, p.51–57, 2002.

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

CHAUHAN, N.K.; VAJPAYEE, M.; MOJUMDAR, K.; SINGH, R.; SINGH, A. Study of CD4+CD8+ double positive T-lymphocyte phenotype and function in Indian patients infected with HIV-1. **J. Med. Virol.**, v.84, n.6, p.845-56, 2012.

CHEN, W.; FORD, M.S.; YOUNG, K.J.; ZHANG, L. The Role and Mechanisms of Double Negative Regulatory T Cells in the Suppression of Immune Responses. **Cel Mol. Immunol.**, v.1, n.5., p.328-335, 2004.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R.; AMBROSIO, R.; CORTESE, L.; PERSECHINO, A.; GRADONI, L.; SCALONE, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Vet. Rec.**, v.141, p.539-543, 1997.

CIOFANI, M.; ZUNIGA-PFLUCKER, J.C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v.23, p.463-93, 2007.

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

D'ACQUISTO, F.; CROMPTON, T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? **Biochem. Pharmacol.**, v.82, 4, p.333-340, 2011.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Com. Immunol. Microbial. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DINIZ, L.M.O.; DUANI, H.; FREITAS, C.R.; FIGUEIREDO, R.M.; XAVIER, C.C. Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.43, n.6, p.743-745, 2010.

DUQUE, C.; PARENT, J.; BIENZLE, D. The immunophenotype of blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in dogs. **J. Vet. Intern. Med.**, v.16, p.714-719, 2002.

DZIEGIELEWSKA, K.M.; EK, J.; HABGOOD, M.D.; SAUNDERS, N.R. Development of the choroid plexus. **Microsc. Res. Tech.**, v.52, p.5-20, 2001.

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

ERARD, F.; WILD, M.T.; GARCIA-SANZ, J.A.; LE GROS, G. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. **Science**, v.260, p.1802-1805, 1993.

FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs: a flow cytometric study. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.82, p.23-37, 2001.

FONT, A.; MASCORT, J.; ALTIMIRA, J.; CLOSA, J.M.; VILAFRANCA, M. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, v.45, p.199–201, 2004.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, H. What is immune privilege (not)? **Trends Immunol.**, vol.28, n.1, 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.

GINEL, P.J.; CAMACHO, S.; LUCENA, R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. **Res. Vet. Sci.**, v.85, p.510-514, 2008.

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

GODDEN, U.; HERBERT, J.; STEWART, R.D.; ROSERIES, B. A novel cell type carrying both Th and Tc/s markers in the blood of cyclosporine treated, allografted rats. **Transplant**, v.39, p.624±8, 1985.

GOMES-PEREIRA, S.; RODRIGUES, O.R.; ROLÃO, N.; ALMEIDA, P.D.; SANTOS-GOMES, G.M. Hepatic cellular immune responses in mice with “cure” and “non cure” phenotype to *Leishmania infantum* infection: importance of CD8+ T cells and TGF- production. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.41, p.59–68, 2004.

GUARGA, J.L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J.; GRRACIA, M.J.; PERIBANEZ, M.A.; CASTILLO, J.A. Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.88, p.13–20, 2002.

GUERRA, L.L.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; REIS, A.B.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v.104, p.611–622, 2009.

HAAS, W.; PEREIRA, P.; TONEGAWA, S. Gamma/Delta Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, v.11, n.1, p.637-685, 1993.

HAILU, A.; MUSA, A.M.; ROYCE, C.; WASUNNA, M. Visceral leishmaniasis: New health tools are needed. **PLoS Med.**, v.2, n.7, e211, 2005.

HUMBERG, R.M.; OSHIRO, E.T.; CRUZ, M. DO S.; RIBOLLA, P.E.; ALONSO, D.P.; FERREIRA, A.M.; BONAMIGO, R.A.; TASSO, N. JR., DE OLIVEIRA, A.G. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.87, n.3, p.470-2, 2012.

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.

ITOH, H.; HORIUCHI, Y.; NAGASAKI, T.; SAKONJU, I.; KAKUTA, T.; FUKUSHIMA, U.; UCHIDE, T.; YAMASHITA, M.; KUWABARA, M.; YSA, S.; TAKASE, K. Evaluation of immunological status in tumor-bearing dogs. **Vet.**

Immunol. Immunopathol., 132, 85-90, 2009.

IWATANI, Y.; HIDAKA, Y.; MATSUZUKA, F.; KUMA, K.; AMINO, N. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4⁺ CD8⁺ cells and CD3^{lo} TCR alpha beta lo/CD4-CD8⁻ cells, in autoimmune thyroid disease. **Clin. Exp. Immunol.**, v.93, p.430 –6, 1993.

JOSÉ-LÓPEZ, R.; DE LA FUENTE, C.; AÑOR, S. Presumed brain infarctions in two dogs with systemic leishmaniasis. **J. Small Anim. Pract.**, v.53, p.554–557, 2012.

KENNY, E.; MASON, D.; POMBO, A.; RAMÍREZ, F. Phenotypic analysis of peripheral CD4⁺ CD8⁺ T cells in the rat. **Immunol.**, v.101, p.178–184, 2000.

KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J.A.; EL HASSAN, A.M.; THEANDER, T.G.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, v.65, p.105-8, 1999.

KIVISÄKK, P.; MAHAD, D.J.; CALLAHAN, M.K.; TREBST, C.; TUCKY, B.; WEI, T.; WU, L.; BAEKKEVOLD, E.S.; LASSMANN, H.; STAUGAITIS, S.M.; CAMPBELL, J.J.; RANSOHOFF, R.M. Human cerebrospinal fluid central memory CD4⁺ T cells: Evidence for trafficking through choroids plexus and meninges via P-selectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.100, p.8389–8394, 2003.

KIVISÄKK, P.; IMITOLA, J.; RASMUSSEN, S.; ELYAMAN, W.; ZHU, B.; RANSOHOFF, R.M.; KHOURY, S.J. Localizing central nervous system immune surveillance: Meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Annals Neurol.**, v.65, n.4, p.457-469, 2009.

KONG, G.Y.; KRISTENSSON, K.; BENTIVOGLIO, M. Reaction of Mouse Brain Oligodendrocytes and Their Precursors, Astrocytes and Microglia, to Proinflammatory Mediators Circulating in the Cerebrospinal Fluid. **GLIA**, v. 37, p.191–205, 2002.

KOSTKA, S.L.; DINGES, S.; GRIEWANK, K.; IWAKURA, Y.; UDEY, M.C.; STEBUT, E.V. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **J. Immunol.**, v.182, n.5, p.3039–3046. 2009.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios?** Conceitos fundamentais de neurociência. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2010, 765p.

LIBEROPOULOS, E.; KEI, A.; APOSTOLOU, F.; ELISAF, M. Autoimmune manifestations in patients with visceral leishmaniasis. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, xx, 1-4, 2012, *in press*.

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.

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.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.DE; EUGÊNIO, F.R.; SANTOS, P.S.P.DOS; ROZZA, D.B.; MACHADO, G.F. Apoptosis in T lymphocytes from spleen tissue and peripheral blood of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v.184, p.147–153, 2012.

LIU, M.F.; YANG, C.Y.; CHAO, S.C.; LI, J.S.; WENG, T.H.; LEI, H.Y. Distribution of double-negative (CD4⁻ CD8⁻, DN) T subsets in blood and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. **Clin. Rheumatol.**, v.18, p.227–231, 1999.

LUKEŠ, 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.

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

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, n.6, p.330-334, 2011.

MARY, C.; AURIALT, V.; FAUGERE, B.; DESSEIN, A.J. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8⁺ and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4⁺ antigen-specific T cells. **Infect. Immun.**, v.67, p.5559–5566, 1999.

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

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, n.1, 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.

MELBY, P.C.; ANSTEAD, G.M. Immune responses to protozoa. In: **Clinical immunology: principles and practices**. Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Kotzin, B.L., Schroder, Jr H.W. (Eds.), 2.ed. Mosby Intern Limited, Mosby. 2001, 29, 1-29.13.

MELO, G.D.; MACHADO, G.F. Choroid plexus involvement in dogs with spontaneous visceral leishmaniasis: a histopathological investigation. **Braz. J. Vet. Pathol.**, v.2, n.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, n.3, 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.; 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.

MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZALEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, J.; ALVA, J. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.71, p.181–195, 1999.

MULDOON, L.L.; ALVAREZ, J.I.; BEGLEY, D.J.; BOADO, R.J.; ZOPPO, G.J.; DOOLITTLE, N.D.; ENGELHARDT, B.; HALLENBECK, J.M.; LONER, R.R.; OHLFEST, J.R.; PRAT, A.; SCARPA, M.; SMEYNE, R.J.; DREWES, L.R.; NEUWELT, E.A. Immunologic privilege in the central nervous system and the blood–brain barrier. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 33, p.13–21, 2013.

NALBANDIAN, A.; CRISPIN, J.C.; TSOKOS, G.C. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. **Clin. Exp. Immuno.**, v.157, p.209-15, 2009.

NAM, K.; AKARI, H.; TERAOKA, K.; SHIBATA, H.; KAWAMURA, S.; YOSHIKAWA, Y. Peripheral blood extrathymic CD4+CD8+ T cells with high cytotoxic activity are from the same lineage as CD4+CD8– T cells in cynomolgus monkeys. **Int. Immunol.**, v.12, p.1095–1103, 2000.

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.

NIETO, C.G.; GARCIA-ALONSO, M.; REQUENA, J.M.; MIRON, C.; SOTO, M.; ALONSO, C.; NAVARRETE, I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.67, p.117– 130, 1999.

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, n.3-4, p.219-227, 2005.

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, n.11, p.1184-1191, 2010.

PERSIDSKY, Y.; RAMIREZ, S.H.; HAORAH, J.; KANMOGNE, G.D. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions, **J. Neuroimmune Pharmacol.**, v.1, p.223–236, 2006.

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

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infect. Immun.**, v.62, p.229–235, 1994.

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.

PORCELLI, S.; MORITA, C.T.; BRENNER, M.B. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. **Nature**, v.360, p.593–597, 1992.

PRASAD, L.S.; SEN, S. Migration of *Leishmania donovani* amastigotes in the cerebrospinal fluid. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.55, p.652–654, 1996.

PRIATEL, J. J.; UTTING, O.; THE, H.S. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. **J. Immunol.**, v.167, p.6188–6194, 2001.

PROVENCIO, J.J.; VORA, N. Subarachnoid hemorrhage and inflammation: bench to bedside and back. **Semin. Neurol.**, v.25, p.435–444, 2005.

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

REINHARDT, C.; MELMS, A. Normalization of elevated CD4-/CD8- (double-negative) T cells after thymectomy parallels clinical remission in myasthenia gravis associated with thymic hyperplasia but not thymoma. **Ann. Neurol.**, v.48, p.603-8, 2000.

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; GUERRA, L.L.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clin. Exp. Immunol.**, v.146, p.303–311, 2006.

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.

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

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de estado da saúde de São Paulo (SES-SP). Superintendência de controle de endemias (SUCEN). Coordenadoria de controle de doenças (CCD). **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo**. SES-SP, São Paulo, 161 pp, 2006.

SARRABAYROUSE, G.; CORVAISIER, M.; OUISSE, L.H.; BOSSARD, C.; LE, M.B.; POTIRON, L.; MEURETTE, G.; GERVOIS, N.; JOTEREAU, F. Tumor-reactive CD4⁺ CD8⁺ alpha⁺ CD103⁺ alpha⁺T cells: a prevalent tumorreactive T-cell subset in metastatic colorectal cancers. **Int. J. Cancer**, v.128, p.2923–2932, 2011.

SAUNDERS, N.R.; EK, C.J.; HABGOOD, M.D.; DZIEGIELEWSKA, K.M. Barriers in the brain: a renaissance? **Trends Neurosci.**, v.31, n.6, p.279–86, 2008.

SCHWARTZ, M.; MOORE, P.F.; TIPOLD, A. Disproportionally strong increase of B cells in inflammatory cerebrospinal fluid of dogs with Steroid-responsive Meningitis-Arteritis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.125, p.274-283, 2008.

SIELING, P.A.; PORCELLI, S.A.; DUONG, B.T.; SPADA, F.; BLOOM, B.R.; DIAMOND, B.; HAHN, B.H. Human double-negative T cells in systemic lupus

erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. **J. Immunol.**, v.165, p.5338–5344, 2000.

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

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 Vectors**, v.4, 86, 2011.

STAGER, S.; SMITH, D.F.; KAYE, P.M. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. **J. Immunol.**, v.165, p.7064-71, 2000.

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

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

SUDA, T.; ZLOTNIK, A. Origin, differentiation, and repertoire selection of CD3+CD4-CD8- thymocytes bearing either alpha beta or gamma delta T cell receptors. **J. Immunol.**, v.150, n.2, p.447-455, 1993.

SUNI, M.A.; GHANEKAR, S.A.; HOUCK, D.W.; MAECKER, H.T.; WORMSLEY, S.B.; PICKER, L.J.; MOSS, R.B.; MAINO, V.C. CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes

exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. **Eur. J. Immunol.**, v.31, p.2512–2520, 2001.

TEACHEY, D.T.; MANNO, C.S.; AXSOM, K.M.; ANDREWS, T.; CHOI, J.K.; GREENBAUM, B.H.; MCMANN, J.M.; SULLIVAN, K.E.; TRAVIS, S.F.; GRUPPET, S.A. Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). **Blood**, v.105, p.2443-8, 2005.

TENÓRIO, M. DA S.; OLIVEIRA E SOUSA, L.; PAIXÃO, M. DOS S.; ALVES, M.F.; PAULAN, S. DE C.; LIMA, F.L.; JUSI, M.M.; TASCA K.I.; MACHADO, R.Z.; STARKE-BUZETTI, W.A. Visceral leishmaniasis in a captive crab-eating fox *Cerdocyon thous*. **J. Zoo Wildl. Med.**, v.42, n.4, p.608-16, 2011.

TIAN, L.; MA, L.; KAARELA, T.; LI, Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. **J. Neuroinflam.**, v.9, p.155, 2012.

TIPOLD, A.; MOORE, P.; JUNGI, T.W.; SAGER, H.; VANDEVELDE, M. Lymphocyte subsets and CD45RA positive T-cells in normal canine cerebrospinal fluid. **J. Neuroimmunol.**, v.82, p.90–95, 1998.

TIZARD, I. R. (Ed.). **Imunologia veterinária**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier, 2004. 494p.

TONELLI, L.H.; POSTOLACHE, T.T.; STERNBERG, E.M. Inflammatory genes and neural activity: involvement of immune genes in synaptic function and behavior. **Front Biosci.**, v.10, p.675–680, 2005.

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

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

WANG, R.; WANG-ZHU, Y.; GREY, H. Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v.99, p.2181-2186, 2002.

WATABE, A.; FUKUMOTO, S.; KOMATSU, T.; ENDO, Y.; KADOSAWA, T. Alterations of lymphocyte subpopulations in healthy dogs with aging and in dogs with cancer. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.142, p.189-200, 2011.

WEISS, N.; MILLER, F.; CAZAUBON, S.; COURAUD, P.O. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1788, n.4, p.842-57, 2013.

WOLBURG, H.; LIPPOLDT, A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. **Vascul. Pharmacol.**, v.38, p.323–337, 2002.

WOLBURG, H.; PAULUS, W. Choroid plexus: biology and pathology. **Acta Neuropathol.**, v.119, n.1, p.75–88, 2010.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain Behav. Immun.**, v.25, p.181–213, 2011.

ZLOTNIK, A.; GODFREY, D.I.; FISCHER, M.; SUDA, T. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. **J. Immunol.**, v.149, p.1211-5, 1992.

ZUCKERMANN, F.A. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.72, p.55-66, 1999.

ZUCKERMANN, F.A.; HUSMANN, R.J. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. **Immunology**, v.87, p.500-512, 1996.