



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus Araçatuba

MARIA CECÍLIA CLARINDO PELLISSARI

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

Araçatuba

2023

MARIA CECÍLIA CLARINDO PELLISSARI

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

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

Orientadora: Prof.^a Adjunta Gisele Fabrino Machado

Araçatuba

2023

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


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

AUTORA: MARIA CECILIA CLARINDO PELLISSARI

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

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


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


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

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

Araçatuba, 07 de fevereiro de 2023.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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


AUTORA: MARIA CECILIA CLARINDO PELLISSARI

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

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

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

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

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

Araçatuba, 07 de fevereiro de 2023.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

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

2 CAPÍTULO 1

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

ANEXO A

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Inflamação do Sistema Nervoso Central

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

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

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

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

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

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

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

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

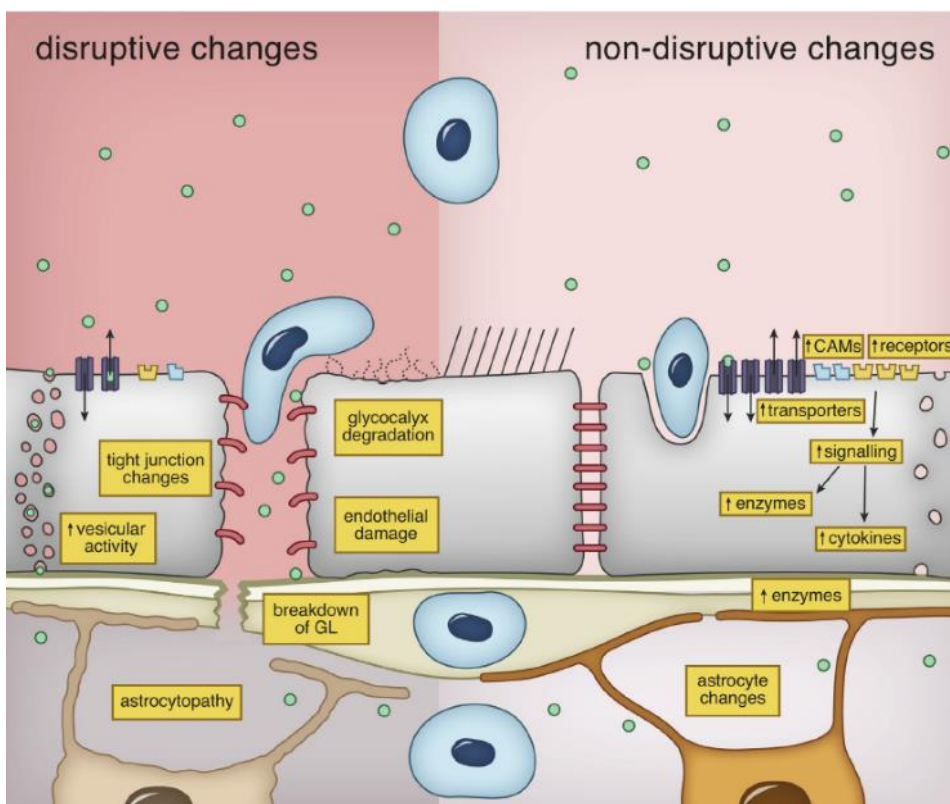
Os efeitos da inflamação sistêmica adaptativa na função do SNC pode ter efeitos benéficos, quando ocorre uma resposta inflamatória controlada, ou pode ter efeitos deletérios, quando a inflamação persiste de maneira descontrolada e é exacerbada devido à presença contínua de citocinas pró-inflamatórias,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

1.2 Barreiras do Sistema Nervoso Central

1.2.1 Barreira Hemato-encefálica (BHE)

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

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



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

Fonte: VARATHARAJ, GALEA, 2017.

1.2.2 Barreira Hemato-liquórica (BHL)

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

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

1.2.3 Barreira Hemato-medular (BHM)

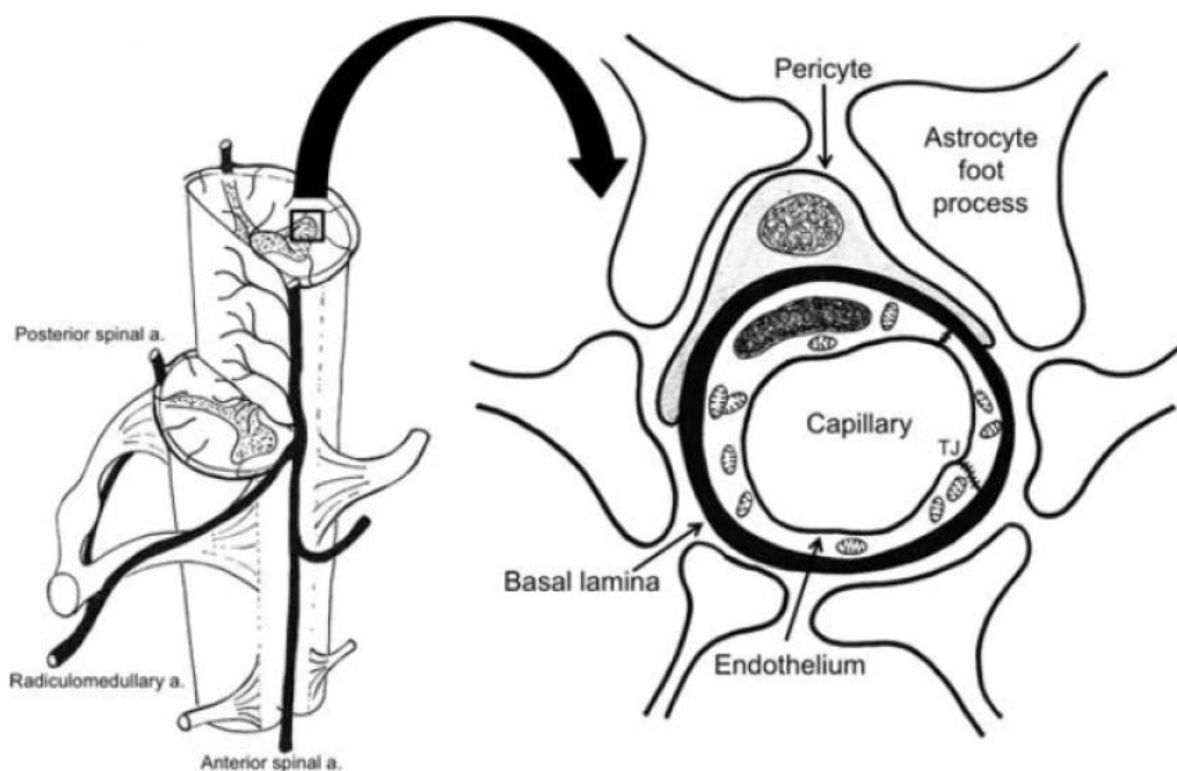
A barreira hemato-medular é uma estrutura fundamental para a ocorrência de reações inflamatórias na medula espinhal. Esta ainda necessita de mais investigações sobre seu papel nas doenças neurológicas medulares, e ainda é considerada como uma extensão da BHE, porém, possuem componentes estruturais similares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

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

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

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

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



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

Fonte: BARTANUSZ et al. 2011.

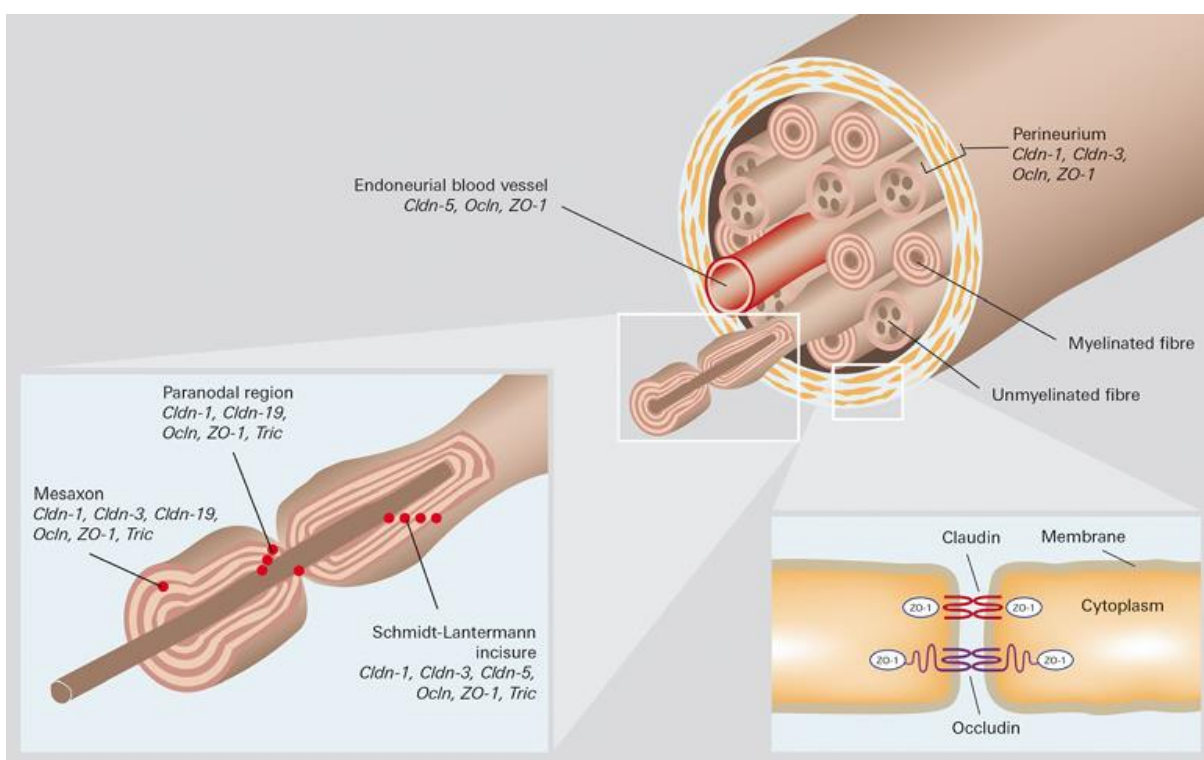
1.2.4 Barreira Hemato-Neural (BHN)

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

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

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

Figura 3 - Representação esquemática das barreiras do SNP



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

Fonte: REINHOLD; RITTNER (2016)

1.3 Células da glia: Astrócitos e micróglia

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

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

1.4 Linfócitos T no tecido nervoso

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

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

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

1.5 Resposta imune durante a leishmaniose visceral

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

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

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

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

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

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

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

1.6 Encefalite e mielite por protozoários

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

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

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

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

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

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

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

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

1.7 Comprometimento do tecido nervoso central e periférico na leishmaniose visceral

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

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

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

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

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

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

1.8 Justificativa

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

1.9 Objetivos

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

2 CAPÍTULO 1 - REAÇÃO INFLAMATÓRIA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL E PESQUISA DE AMASTIGOTAS E LINFÓCITOS T NA MEDULA ESPINHAL

Maria Cecília Clarindo Pelissari¹, Gisele Fabrino Machado^{2*}

1 Pós-graduanda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba-SP

2 Professora de Patologia Veterinária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba-SP

Autor de correspondência: gisele.fabrino@unesp.br

Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, São Paulo, Brasil, Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Rua Clovis Pestana, 793, CEP: 16050-680, +55-18-3636-1419

2.1 Resumo

Lesões inflamatórias na medula espinhal são pouco descritas em cães naturalmente infectados por *L.infantum*. O presente estudo tem como objetivo caracterizar a reação inflamatória em regiões do encéfalo e na medula cervical, torácica e lombar de cães acometidos pela Leishmaniose Visceral (LV), em cortes corados por hematoxilina-eosina e de análise imuno-histoquímica para identificar a distribuição e intensidade de linfócitos TCD3, além de pesquisar a presença de formas amastigotas do parasito. Os animais foram divididos em três grupos: grupo 1: Cães com LV e com inflamação medular e encefálica; grupo 2: Cães com LV sem inflamação medular e com inflamação encefálica, e grupo 3, Cães com LV sem inflamação encefálica ou medular, com o intuito de avaliar possíveis vias de migração leucocitária até a medula espinhal de cães infectados. Neste estudo observamos que lesões inflamatórias são frequentes no sistema nervoso central e periférico de cães com leishmaniose. A coroidite e meningite encefálicas, meningite medular e perineurite foram mais frequentes. Dois cães apresentaram mielite. Os linfócitos TCD3 foram observados compondo o infiltrado inflamatório em nervos periféricos, leptomeninges e parênquima da medula espinhal, com distribuição perivascular de intensidades variando entre discreta e intensa. O segmento da medula cervical e lombar foram os que tiveram maior reação inflamatória. Na avaliação imuno-histoquímica para pesquisa de *Leishmania* sp., não foram observadas formas amastigotas do parasito na medula espinhal dos animais.

Palavras-chave: *Leishmania*, mielite, neurite, linfócitos T.

2.2 Abstract

Inflammatory lesions in the spinal cord are poorly described in dogs naturally infected by *L.infantum*. This study aims to characterize the inflammatory reaction in different areas of the encephalon and the cervical, thoracic, and lumbar spinal cord of dogs affected by Visceral Leishmaniasis (VL), in sections stained by hematoxylin-eosin and immunohistochemical analysis to identify the intensity of inflammation and distribution and quantity of TCD3 lymphocytes. Also, the presence of amastigotes of was investigated. The animals were divided into three groups of infected dogs: group 1: VL dogs with spinal cord and brain inflammation; group 2: VL dogs without spinal

cord inflammation and with brain inflammation, and group 3, VL dogs without brain or spinal cord inflammation. In this study we observed that inflammatory lesions are frequent in the central and peripheral nervous system of dogs with visceral leishmaniasis. Encephalic choroiditis and meningitis, medullary meningitis, and perineuritis were most frequent morphological changes. Two dogs from group 1 presented myelitis. TCD3 lymphocytes were observed composing the inflammatory infiltrate in peripheral nerves, leptomeninges, and spinal cord parenchyma, with perivascular distribution of intensities ranging from mild to intense. The cervical and lumbar spinal cord segments had the most inflammatory reaction. In the immunohistochemical evaluation for *Leishmania* sp. investigation, no amastigote forms of the parasite were observed in the spinal cord of the animals.

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

2.3 Introdução¹

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença infecciosa e zoonótica, causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, da classe Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Cães domésticos são considerados os principais reservatórios para a infecção humana. [1].

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) abrange um amplo espectro de manifestações clínicas, tais como anemia, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia generalizada, alterações renais e hepáticas, lesões cutâneas [2]. Apesar da diversidade de sinais clínicos, manifestações neurológicas durante a infecção pela *Leishmania infantum* são pouco descritas. Entretanto, sinais neurológicos como convulsões, deficiências motoras, andar em círculos, tremores, vocalização, hemiparesia/hemiplegia e tetraplegia têm sido reportados em cães acometidos por LV [3,4,5]. Assim, a leishmaniose visceral deve ser considerada como um dos diagnósticos diferenciais para cães com afecções neurológicas em regiões endêmicas [4,6] visto que esta doença possui diferentes protocolos de tratamento e prognósticos a serem considerados por médicos veterinários.

Em seres humanos foram descritas anormalidades neurológicas em até 46% dos pacientes com VL. Os pacientes reportavam sensação de queimação nos pés,

¹ Normas de publicação da revista (Anexo A).

dificuldade para andar, surdez e déficit de nervos cranianos [7], ou seja, há relatos de sinais nervosos tanto centrais quanto periféricos. Sinais clínicos associados a lesões na medula espinhal dependem da localização anatômica e severidade da lesão, podendo variar desde pequenas alterações sensoriais ou motoras até a tetraplegia completa [8]. Algumas destas manifestações clínicas observadas em seres humanos são difíceis de serem avaliadas em cães, o que provavelmente resulta na possível subnotificação dos problemas neurológicos que acometem esta espécie durante a infecção por *L. infantum*.

No cérebro de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, com e sem sinais neurológicos, foram observadas degeneração neuronal com neuronofagia, gliose focal a difusa, leptomeningite, congestão e infiltrado linfoplasmocitário perivascular,[3]. Mesmo na ausência do parasito no encéfalo, as lesões inflamatórias são observadas [9].

A ocorrência de inflamação na medula espinhal e em nervos periféricos em cães com LV é pouco descrita e caracterizada na literatura [10, 5]. Há três principais interfaces especializadas em humanos que permitem seletivamente a entrada de nutrientes, íons, lipídeos e pequenas moléculas da circulação sistêmica para o SNC; dentre elas, a barreira hemato-medular (BHE), a barreira hemato liquórica (BHL) e a barreira hemato-medular (BHM) [11]. Dentre estas, a mais estudada é a BHE [10, 12]. Apesar da BHE e BHM apresentarem similaridades anatômicas, há diferenças funcionais pouco estudadas na BHM, e que são de suma importância para elucidar a patogenia das lesões medulares. A permeabilidade à leucócitos e mediadores inflamatórios da BHM é maior que o da BHE [11, 12]. Segundo Pan e colaboradores (1997) [14] , há ainda diferenças regionais de permeabilidade à mediadores inflamatórios observados dentre os segmentos medulares, sendo o segmento cervical o que possui maior permeabilidade.

2.4 Materiais e métodos

Todos os procedimentos e métodos utilizados no estudo foram submetidos à avaliação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da FOA, UNESP, Araçatuba/SP, nº 0144-2021 (Anexo B).

2.4.1 Animais

Foram selecionados 21 cães, machos e fêmeas, adultos, com diagnóstico de Leishmaniose Visceral, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, e do hospital veterinário Luis Quintiliano de Oliveira da FMVA/UNESP Araçatuba. Os animais foram encaminhados ao Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA-UNESP) para realização de necropsia. Todos os animais apresentaram teste imunocromatográfico (DPP) positivo para *Leishmania sp*, e a eutanásia foi realizada segundo o Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, do Ministério da Saúde [15] e a Resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária [16]. Em adição, foi realizado exame parasitológico direto para análise citológica de punção biópsia aspirativa de linfonodo poplíteo para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania spp*. Todos os animais possuíam ao menos três sinais clássicos da LV, como lesões de pele ulcerativas, alopecias, por vezes crostosas, caquexia e linfadenomegalia, e foram submetidos a necropsia para avaliação das lesões macroscópicas e colheita de material de diversos órgãos para exame histopatológico, com atenção especial ao encéfalo e diferentes segmentos da medula espinhal. Em adição ao DPP, foi realizado exame parasitológico direto para análise citológica de punção biópsia aspirativa de linfonodo poplíteo para pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania spp*.

O encéfalo e medula espinhal foram removidos do esqueleto axial e fixados inteiros, por imersão em formol tamponado a 10% pH 7,2 a 7,4, por 24 a 48 horas. Realizou-se então cortes coronais do encéfalo passando pelo infundíbulo hipofisário e pedúnculos cerebelares para a colheita de amostras. Para avaliação histológica foram incluídas amostras da região do diencéfalo, incluindo hipocampo e plexo coroide do ventrículo lateral do cerebelo e plexo coroide do quarto ventrículo [9]. Além disso, foram colhidos fragmentos medulares localizados entre a 1ª e 2ª vértebra cervical, entre a 4ª e 5ª vértebra torácica, e entre a 3ª e 4ª vértebra lombar. Amostras de cães não infectados não foram colhidas devido a dificuldades de se necropsiar cães sadios. Foram excluídos deste estudo cães com diagnóstico de leishmaniose que possuíam também neoplasias, suspeita de doenças infecciosas como a cinomose, e com exame citológico com ausência de formas amastigotas de *Leishmania spp*.

2.4.2 Análise histopatológica

As amostras foram processadas rotineiramente para obtenção de cortes histológicos com 5µm. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) para pesquisa de formas amastigotas e avaliação das alterações inflamatórias. A intensidade da inflamação do encéfalo foi classificada segundo [17] da seguinte maneira: grau 0, cães sem inflamação; grau I, cães com inflamação discreta (infiltrado inflamatório discreto principalmente nas leptomeninges e plexo coroide); grau II, cães com inflamação moderada (infiltrado inflamatório nas leptomeninges e plexo coroide com presença de discreta quantidade de linfócitos na região perivascular do parênquima cerebral); grau III, animais com inflamação acentuada (infiltrado inflamatório nas leptomeninges e plexo coroide e intenso infiltrado inflamatório perivascular no parênquima cerebral).

Para avaliação da intensidade das alterações inflamatórias da medula espinhal foram adotados os seguintes critérios: grau 0 (animais sem inflamação); grau I (animais com inflamação discreta nas leptomeninges); grau II (animais com inflamação moderada nas leptomeninges e raízes nervosas); grau III (animais com inflamação acentuada nas leptomeninges e raízes nervosas) e grau IV (animais com inflamação acentuada, presença de manguito perivascular no parênquima medular). (Fig. S1)

Os animais com LV foram distribuídos em grupos, denominados: grupo 1, cães com inflamação medular e encefálica (n=7) e grupo 2, cães sem inflamação medular e com inflamação encefálica (n=8), grupo 3, cães sem inflamação medular e sem inflamação encefálica (n=6).

2.4.3 Análise imuno-histoquímica

Cortes histológicos de 5 µm dos diferentes segmentos medulares foram submetidos à imuno-histoquímica para detecção de linfócitos TCD3 (IR524, Dako; "ready to use"). Os cortes foram desparafinizados utilizando 3 banhos de xilol, em seguida hidratados em uma sequência decrescente de soluções de álcool (absoluto, 95%, 70%, 50%) e água, todos com 5 minutos de imersão. A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6,0 a 100 °C, em panela de vapor, para o anticorpo anti-CD3 durante 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de metanol (50 mL), água destilada (50 mL) e peróxido de hidrogênio

30 volumes (Merck®) (2 mL), por 30 minutos. Para o bloqueio de sítios inespecíficos, foi utilizada a solução de leite em pó desnatado (Molico®) a 3% em PBS (pH 7,2 a 7,4), por 30 minutos. O anticorpo primário foi incubado por aproximadamente 18 horas, e após a lavagem com PBS, foi utilizado o anticorpo secundário com sistema de detecção baseado em polímeros (EnVision™ 151 FLEX – HRP; Dako, K8010), por 40 minutos. Como revelador foi utilizado o kit DAB (Dako, K3468) e, por fim, a hematoxilina de Harris diluída em água destilada a 50% foi utilizada para a contra-coloração. Para a pesquisa da presença do parasito, foi utilizado como anticorpo primário o soro de um animal positivo para *Leishmania spp.* (D.O. 1189), na diluição de 1:100, segundo o protocolo de [18]. Como controle positivo das reações, foram utilizadas amostras de linfonodo de um cão positivo para *Leishmania spp.*

Com relação aos linfócitos TCD3+, foi realizada uma avaliação semiquantitativa utilizando o programa Image J, e as células foram contadas manualmente com o auxílio da ferramenta “multi-point” [19]. Foram avaliados seis campos no aumento de 400x por área de cada segmento medular, incluindo substância branca, substância cinzenta e meninge de cada segmento medular (cervical, torácica e lombar), totalizando 54 campos por animal, o equivalente a 5.010796,62 μ^2 . (Figura S2).

2.4.4 Análise Estatística

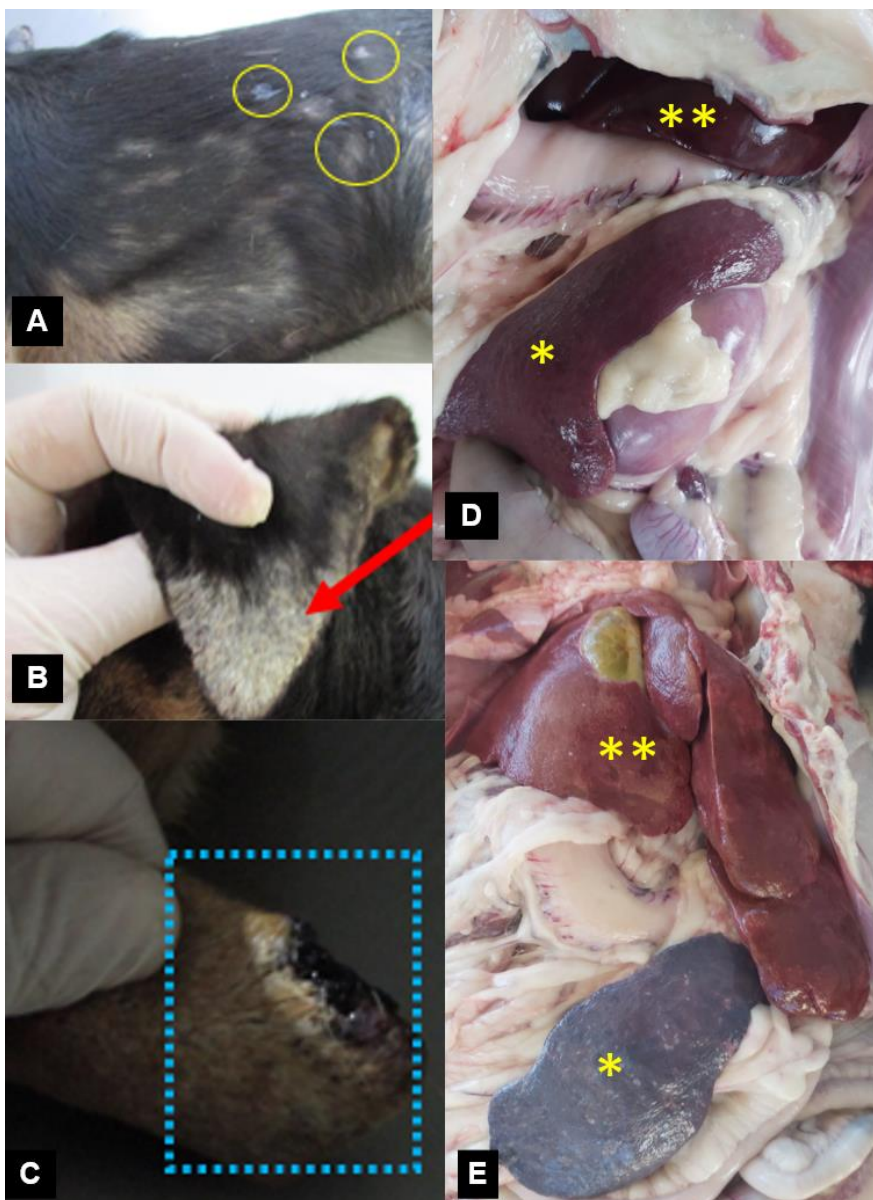
O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para avaliação da normalidade dos resíduos e o teste de Brown-Forsythe para a homoscedasticidade das variâncias. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 8.4.3 para Windows. Considerando que os dados não possuem variâncias homoscedásticas e resíduos de distribuição normal, os testes de Kruskal-Wallis e Dunn foram aplicados para comparação entre as medianas das células TCD3 por grupo.

2.5 Resultados

As alterações macroscópicas observadas durante a necropsia nos animais incluíam predominantemente caquexia, lesões cutâneas ulcerativas e por vezes crostosas localizadas em ponta de orelha e/ou dorso, onicogribose, hepatoesplenomegalia e linfadenomegalia. Não foram observadas alterações macroscópicas no encéfalo e na medula espinhal. (Fig. 1).

As representações anatômicas das regiões encefálicas avaliadas estão presentes na figura 2. Na avaliação histopatológica, as principais lesões observadas no encéfalo foram meningite e coroidite, caracterizadas por infiltrado inflamatório não supurativo, linfoplasmocitário e perivascular, localizadas na meninge da região do hipocampo (n=9; 43%), tálamo (n=9; 43%) e cerebelo (n=9; 43%); no plexo coroide do 4º ventrículo (n=11; 52%) e plexo coroide do ventrículo lateral (n=8; 38%), respectivamente. (Fig. 3) A inflamação foi classificada quanto a intensidade, variando de grau 0 a III. Nos grupos 1 e 2, a intensidade variou entre grau I e grau II. No grupo 3 os animais não tinham inflamação encefálica (grau 0). As figuras 2C e 2D representam a reação inflamatória encefálica, de diferentes intensidades, observadas em cortes corados por HE.

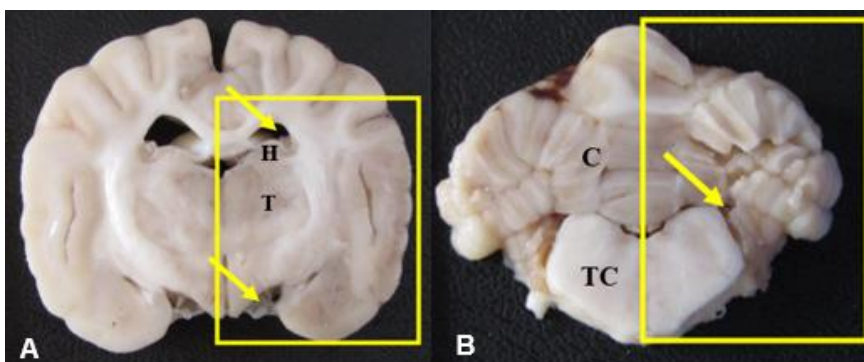
Figura 1 - Exame macroscópico dos cães.



(A) Observar lesões cutâneas alopécicas ou com rarefação pilosa multifocais na região torácica e abdominal esquerdas (círculos amarelos). (B) Observar lesão crostosa e alopécica na ponta de orelha (seta vermelha). (C) Observar lesão ulcerativa na ponta de orelha (retângulo azul). (D) Observar baço (*) e fígado (**) sem alterações evidentes exceto por discreto aumento de tamanho. (E) Observar esplenomegalia (*) e hepatomegalia (**) acentuadas, caracterizada por espessamento da cápsula esplênica e bordos hepáticos arredondados ultrapassando o gradil costal.

Fonte: Elaborado pela autora.

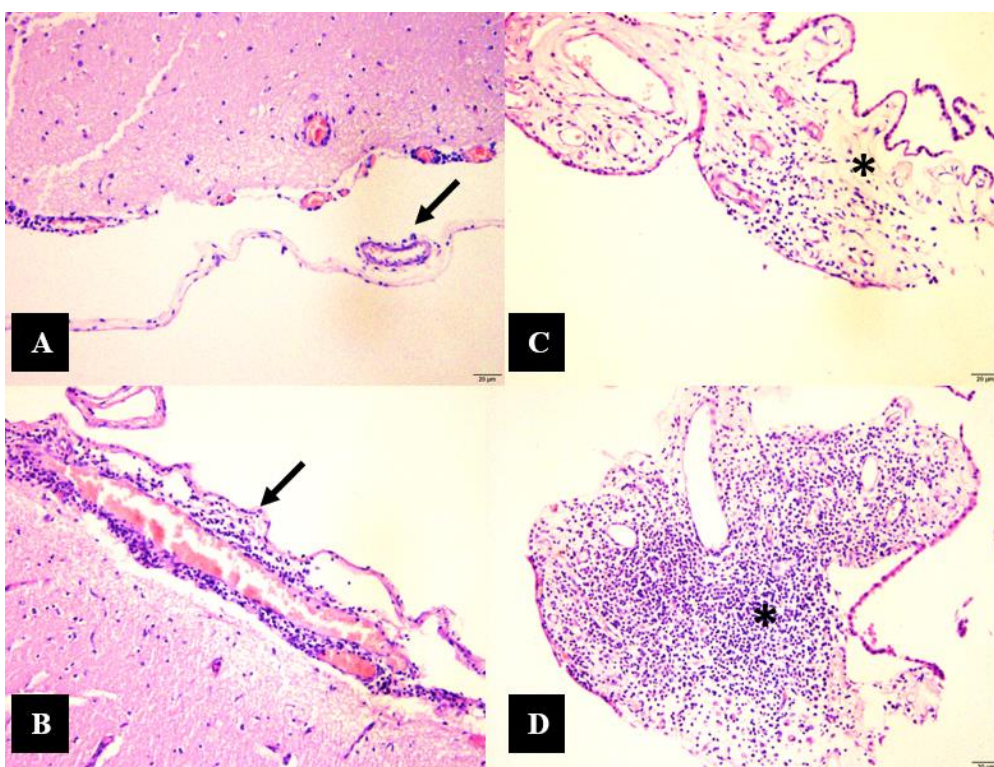
Figura 2. A e B) Representação anatômica das áreas do encéfalo avaliadas no presente estudo.



A) Diencefalo, incluindo o hipocampo (H), tálamo (T) e o plexo coroide do ventrículo lateral (seta amarela). B) Tronco cerebral (TC) e cerebelo (C), incluindo o plexo coroide do 4º ventrículo (seta amarela).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 3 - Fotomicrografias de cortes histológicos das regiões encefálicas dos cães com LV, demonstrando a distribuição e intensidade da inflamação.



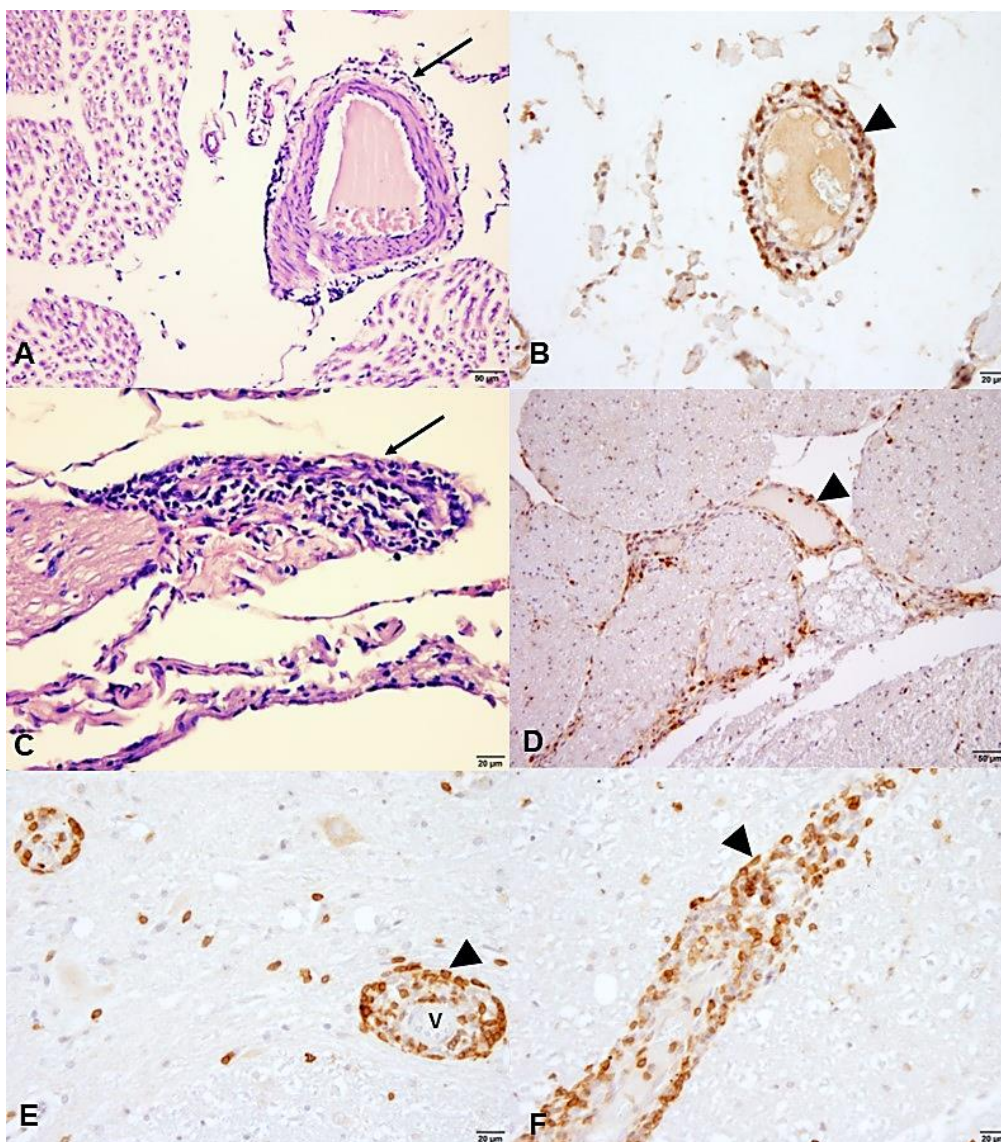
A e B) Meninge do hipocampo. A) Nota-se meningite discreta caracterizada por infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular (seta). B) Meningite moderada (seta). C e D) Plexo coroide do ventrículo lateral. C) Coroidite mononuclear discreta (*) D) coroidite mononuclear acentuada (*). (barra=20µm). HE.

Fonte: Elaborado pela autora.

Não foram observadas formas amastigotas na coloração de HE no encéfalo ou medula espinhal dos animais avaliados. Tais resultados encontram-se na tabela 1. Detalhes da caracterização da reação inflamatória medular do grupo 1 estão descritos na tabela 2. Nos segmentos de medula espinhal, no grupo 1, a intensidade da inflamação variou de grau I, grau III e grau IV em 7 animais. O restante dos animais não possuía inflamação (grau 0). Na figura 4A, 4C e 4E são representadas fotomicrografias dos cortes corados por HE de diferentes intensidades de reação inflamatória medular e, nas figuras 4B, 4D e 4F, fotomicrografias da distribuição e intensidade de linfócitos TCD3+ em diferentes localizações e segmentos medulares.

Com relação aos linfócitos T, o grupo 1 apresentou maior quantidade de células TCD3+ em todos os segmentos quando comparado com grupos 2 e 3, havendo diferença significativa ($p < 0,0001$). Não houve diferença significativa entre os grupos 2 e 3 ($p > 0,05$). O maior valor médio de células contadas foi maior no segmento cervical do grupo 1 (Figura 5).

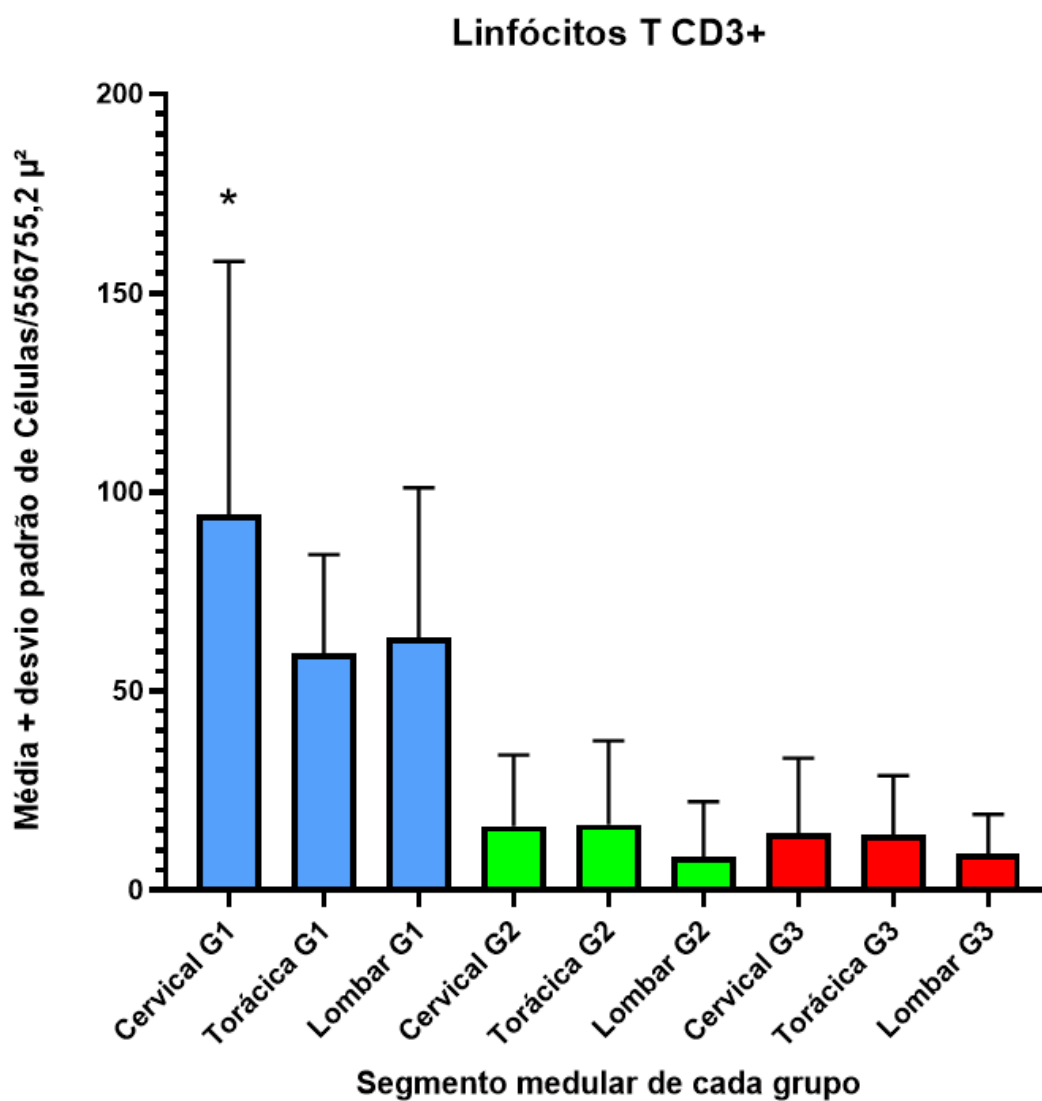
Figura 4 - Fotomicrografias de cortes histológicos da medula espinhal de cães com LV, demonstrando diferentes intensidades de inflamação observadas em cortes corados por Hematoxilina-Eosina (HE), e a imunomarcação para linfócitos TCD3+ revelada por DAB.



A) Observar o infiltrado inflamatório perivascular discreto na meninge, caracterizando a inflamação grau I. B) Observar discreta quantidade de linfócitos T CD3+ (ponta da seta) ao redor de vasos na meninge, também com inflamação de grau I. C) Observar o infiltrado inflamatório perineural moderado na medula cervical, caracterizando uma inflamação de grau II. D) Observar a moderada quantidade de linfócitos T CD3+ (ponta da seta) no perineuro da medula lombar, na inflamação grau II. E e F) Observar a acentuada quantidade de linfócitos T CD3+ (ponta da seta) na substância cinzenta (E) e substância branca (F) da medula cervical, caracterizando a inflamação de grau IV. (A, barra = 50 μ m; B, C, D, E, F, barra = 20 μ m).

Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 5 - Gráfico de colunas demonstrando o valor médio e desvio padrão de linfócitos T CD3⁺ contados por 556755,2 μ^2 nos diferentes segmentos medulares (cervical, torácico e lombar) de cada grupo.



Observar que o grupo 1 obteve maior quantidade de células TCD3⁺ em todos os segmentos medulares, ao passo que não houve diferença entre os grupos 2 e 3. ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 1 - Intensidade da inflamação observada na medula espinhal e encéfalo dos cães de cada grupo nas análises realizadas em cortes corados por HE.

Grupo	Grau da Inflamação	Número de cães	
		Medula Espinhal	Encéfalo
G1	Grau I	1/7	5/7
	Grau II	0	2/7
	Grau III	4/7	0
	Grau IV	2/7	0
G2	Grau I	0	7/8
	Grau II	0	1/8
	Grau III	0	0
	Grau IV	0	0
G3	Grau 0	6/6	6/6

Legenda: G1: cães com inflamação medular e encefálica; G2: cães sem inflamação medular e com inflamação encefálica; G3: cães sem inflamação medular ou encefálica.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 - Distribuição e intensidade da reação inflamatória por área da medula espinhal avaliada do grupo 1.

Animal	Grau	Meningite	Perineurite	Neurite	Mielite
1	1	+	0	0	0
3	4	+	0	0	+++
8	4	0	+	+	+++
18	3	++	+	+	0
19	3	+	+	+	0
24	3	++	++	0	0
27	3	++	++	0	0

Legenda: 0: ausente; +: discreta; ++: moderada; +++: acentuada

Fonte: Elaborado pela autora.

2.6 Discussão

Todos os cães utilizados neste experimento apresentavam diagnóstico parasitológico positivo para *Leishmania spp.*, no entanto, não foram observadas formas amastigotas de *Leishmania spp.* nos cortes corados por HE do encéfalo ou medula dos animais. A pesquisa de amastigotas por imuno-histoquímica na medula também foi negativa. A observação do parasito na coloração HE ou com auxílio de imuno-histoquímica é reportada em alguns casos, mas não é frequente [20,21, 5];

A principal alteração inflamatória observada no encéfalo dos cães neste estudo foi a coroidite observada no plexo coroide do ventrículo lateral de 11 cães (51%) e no plexo coroide do 4º ventrículo de 8 cães (38%). Além da coroidite, foi observada meningite localizada na região do hipocampo (n=9; 43%), tálamo (n=9; 43%) e cerebelo (n=9; 43%); e meningoencefalite em dois animais, um pertencente ao grupo 1, e o outro pertencente ao grupo 2. Todas as lesões inflamatórias no encéfalo eram compostas por células com morfologia compatível com linfócitos e plasmócitos, com padrão perivascular, e corroboram com as descrições de Melo e colaboradores (2009) e Melo e Machado (2011), que relataram a ocorrência de leptomeningite e coroidite em cães naturalmente infectados por *L.infantum*. Em nosso estudo, inflamação com presença de manguitos perivasculares foi observada na medula espinhal de dois animais (28% = grau IV). Este tipo de lesão sugere a disfunções nas barreiras presentes no encéfalo, a BHE e a BHL, uma vez que há passagem exacerbada de leucócitos através das mesmas.

Nossos resultados também foram semelhantes aos relatados por [5] que observaram alterações inflamatórias no tecido nervoso de 15 cães naturalmente infectados com *L. infantum*, incluindo meningite em 80% dos animais, coroidite em 27%, e encefalite (7%). Os autores avaliaram amostras de medula espinhal cervical, torácica e lombar de 48 cães, e em 15 cães (31%) com inflamação no SNC, um animal apresentou mielite, com formação de manguitos perivasculares. A mielite foi observada em dois cães do presente estudo, os quais apresentavam também inflamação nas regiões do encéfalo avaliadas. Mesmo sem a detecção do parasito, a presença de inflamação no plexo coroide fornece evidências de que a infecção sistêmica por *L. infantum* promove alterações na barreira hemato-liquorica [9] , o que pode facilitar a passagem de mediadores inflamatórios e células para o SNC.

Não foi observado nenhum caso de cão com LV com alterações inflamatórias

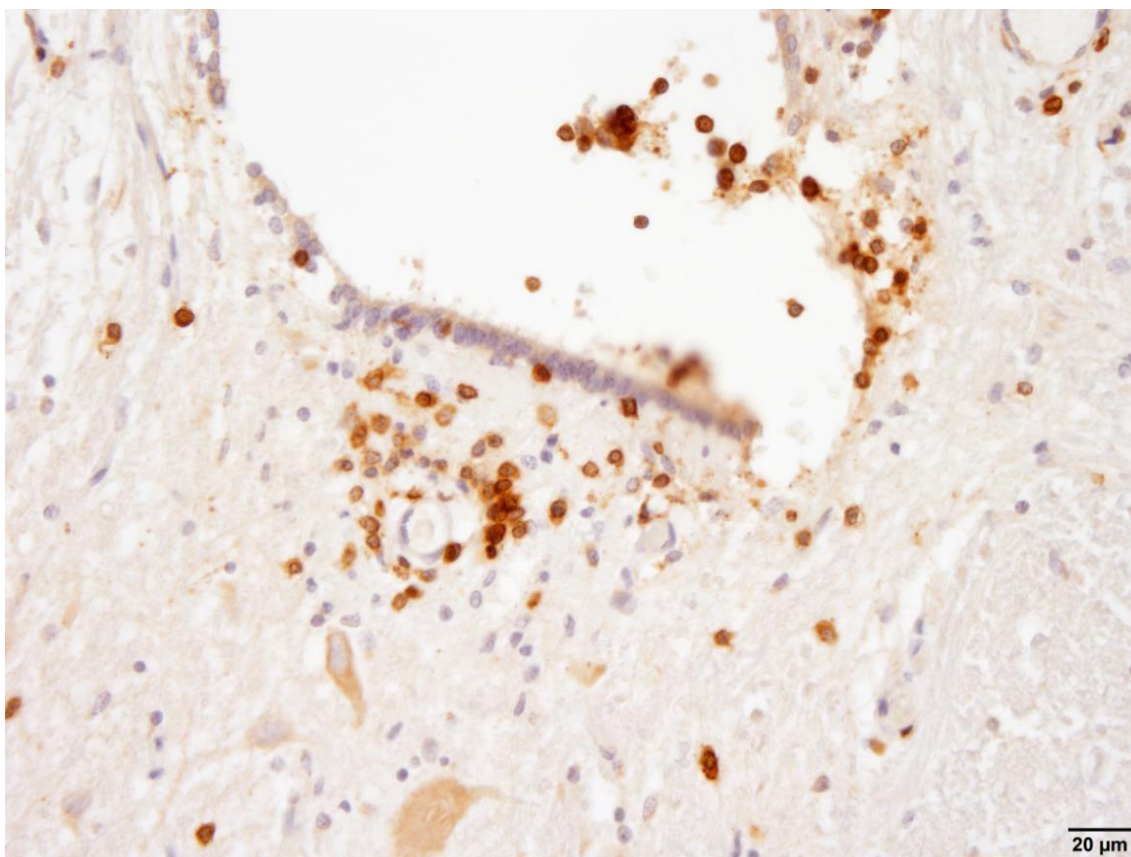
na medula, sem que houvesse também algum grau de inflamação no encéfalo. Esta informação indica que a reação inflamatória pode ter se iniciado no encéfalo dos cães e mais tardiamente acometeu a medula espinhal.

Há relatos de que a migração de linfócitos ocorre através da barreira hemato-liquórica, no plexo coroide de cães com LV [9]. Foram observados em alguns cães, a presença de linfócitos TCD3+ no interior do canal medular e distribuídos difusamente na região subependimária, o que reforça a teoria de que linfócitos presentes no líquido cefaloraquidiano possam migrar para o tecido nervoso medular adjacente. Assim é muito provável que alterações na permeabilidade da BHL contribua para a migração de linfócitos T também observada na medula espinhal. (Figura 6). Este fato não era esperado, uma vez que a BHM e BHN são mais permeáveis a mediadores pró-inflamatórios em comparação a BHE [13]

Vale ressaltar que a migração de linfócitos T para o tecido nervoso depende do tempo de evolução da doença, e nos cães naturalmente infectados não é possível fazer esta estimativa.

O segmento cervical e lombar foram os que apresentaram maior reação inflamatória no grupo 1 (com inflamação medular e encefálica, corroborando com os achados de [14] os quais destacam uma maior permeabilidade à mediadores pró-inflamatórios da barreira hemato-medular nos mesmos segmentos. Entretanto, há de se considerar a possibilidade da migração celular através de lesões de nervos periféricos e a disfunção da barreira hemato-neural, atingindo a medula espinhal, pelo fato de que em nossa pesquisa a perineurite e neurite foram achados frequentes nos cães do grupo 1. Além disso, fibras nervosas desprovidas da barreira de mielina são mais suscetíveis à entrada de leucócitos, o que pode agravar a reação inflamatória em gânglios e terminações nervosas, podendo atingir o parênquima medular posteriormente.

Figura 6 - Fotomicrografia do canal medular de cão com LV.



Observar a presença de linfócitos TCD3+ no interior do canal medular e maior concentração dos mesmos na região perivascular subependimária, além de raros linfócitos difusamente distribuídos pelo parênquima na mesma região. (IHQ revelada por DAB, barra=20µm).

Fonte: Elaborado pela autora.

Em nosso estudo, sete animais apresentaram alterações inflamatórias medulares, com distribuição e intensidade variadas, tanto no parênquima quanto na meninge e nervos periféricos, concomitantemente à inflamação encefálica, corroborando com os achados da literatura e enfatizando o envolvimento do SNC em conjunto com o sistema nervoso periférico (SNP) na LV. A mielopatia induzida por inflamação secundária a infecção por *Leishmania spp.* tem sido relatada esporadicamente na literatura acometendo diferentes segmentos da medula espinhal [22] relatam a presença de um granuloma extramedular na região lombar de um cão,[23] relatou o caso de um cão com leishmaniose e lesões medulares na região cervical (entre a 5ª e 6ª vértebra), também [15] descreveram um caso em que se observaram tanto o envolvimento do sistema nervoso central como do sistema nervoso periférico em um cão com Leishmaniose. Tais relatos reforçam o possível envolvimento também da barreira hemato-neural na patogenia das lesões

observadas na medula espinhal de animais infectados. No presente estudo a presença de linfócitos TCD3⁺ na medula espinhal foi significativamente maior nos animais que possuíam inflamação medular e encefálica (grupo 1). Entretanto, na avaliação por área marcada não foi observada diferença entre o grupo 1 e os grupos 2 (sem inflamação medular e com inflamação encefálica) e 3 (sem inflamação medular ou encefálica) ($p > 0,05$).

A inflamação sistêmica de baixo grau pode ser iniciada in vivo após lesão traumática ou em doenças como doenças neurodegenerativas, metabólicas e autoimunes. Indutores de a inflamação desencadeiam a produção de mediadores inflamatórios, que alteram a funcionalidade do tecidos e órgãos e levam à indução prejudicial de diferentes sistemas de barreira no corpo, onde a barreira hemato-encefálica, a barreira hemato-retiniana, a barreira hemato-nervosa, a barreira hemato-linfática barreira e a barreira sangue-líquido cefalorraquidiano desempenham papéis importantes. As diferentes barreiras são únicas, mas estruturadas de maneira semelhante. Eles são equipados com sofisticadas junções complexas onde diferentes conexinas, subunidades de proteínas de canais de junções comunicantes e hemi-canais, constituem parceiros importantes. As células envolvidas nas várias barreiras são acopladas em redes, são excitáveis, mas não expressam potenciais de ação e podem ser alvos para a inflamação levando a alterações em vários parâmetros celulares bioquímicos, que resultam em disfunção ou destruição das barreiras [24].

Neste contexto, por ser uma doença parasitária de evolução crônica, a leishmaniose visceral pode contribuir para a disfunção de várias barreiras em diferentes tecidos do paciente, uma vez que, durante o curso da doença, são produzidas citocinas pró-inflamatórias periféricas, as quais podem adentrar o SNC diretamente através de órgãos circunventriculares desprovidos de junções oclusivas, e ativam as células da glia; através de proteínas de transporte endoteliais; induzindo o aumento de mediadores pró-inflamatórios pelas células endoteliais e macrófagos na vasculatura cerebral ou por ativação e diapedese de monócitos/macrófagos e linfócitos T no parênquima cerebral [25].

No caso do tecido nervoso, é possível que as barreiras hemato-encefálica, hemato-liquórica e hemato-neural estejam comprometidas, mas aparentemente a BHL seja a principal via de entrada de linfócitos TCD3⁺, haja visto que a coroidite foi a lesão mais frequente nos cães com LV. A figura S3 demonstra esquematicamente

as vias de migração celular propostas no presente estudo.

A diversidade da distribuição de linfócitos TCD3+ no tecido e estruturas do encéfalo e medula espinhal observadas tanto no HE como na imuno-histoquímica podem ser decorrentes de diferentes tempos de infecção pelo parasito, uma vez que os casos estudados são de infecção natural. Contudo, mais estudos são necessários para caracterizar as vias de migração leucocitária que resultam na ocorrência de mielite, neurite e perineurite nos cães infectados.

2.7 Conclusão

Neste estudo observamos que lesões inflamatórias são frequentes no sistema nervoso central e periférico de cães com leishmaniose. Os linfócitos TCD3+ são observados compondo o infiltrado inflamatório em nervos periféricos, leptomeninges e parênquima da medula espinhal, mesmo na ausência do parasito. Mais estudos são necessários para analisar a relação entre as barreiras centrais e periféricas e suas alterações durante a leishmaniose visceral canina.

2.8 Financiamento

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

2.9 Referências

- [1] Dantas-Torres F, Brito Mef, Brandão-Filho SP. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2006;140(1-2):54-60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.008>
- [2] Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol*. 2008;24:324–330. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>
- [3] Ikeda FA, Laurenti MD, Corbett CE, Feitosa MM, Machado GF, Perri SHV. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Brazilian J Vet Res Anim Sci*. 2007;44:5–11.

- [4] Giannuzzi AP, Ricciardi M, De Simone A, Gernone F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *J Small Anim Pract.* 2017;58(3):125-138.
- [5] Oliveira VC, Boechat VC, Mendes Junior AAV, Madeira MF, Ferreira LC, Figueiredo FB, et al. Occurrence of *Leishmania infantum* in the central nervous system of naturally infected dogs: Parasite load, viability, co-infections and histological alterations. *PloS One.* 2017;12(4):e0175588.
- [6] Zobra R, Evangelisti M, Manunta M, Aalverti A, Zucca D, Luisa M, et al. A case of canine neurological leishmaniasis. *Veterinaria Italiana.* 2017;53(4):321-326.
- [7] Hashim FA, Ahmed AE, El Hasan M, et al. Neurologic changes in visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med.* 1995;52:149-154.
- [8] Noristani HN, Sabourin JC, Boukhaddaoui H, Chan-Seng E, Gerber YN, Perrin FE. Spinal cord injury induces astroglial conversion towards neuronal lineage. *Mol Neurodegener.* 2016;11(1):59.
- [9] Melo GD, Marcondes M, Vasconcelos RO, Machado GF. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology,* 2009, 162(3-4):248–256.
- [10] Maia CSF, Monteiro MC, Gavioli EC, Oliveira FR, Oliveira GB, Romão PRT. Neurological disease in human and canine leishmaniasis - clinical features and immunopathogenesis. *Parasite Immunology.* 2015 [acesso em 2022];37(8):385–393.
- [11] Chopra N, Menounos S, Choi JP, Hansbro PM, Diwan AD, DAS A. Blood-Spinal Cord Barrier: Its Role in Spinal Disorders and Emerging Therapeutic Strategies. *NeuroSci,* 2021, 3(1):1–27.
- [12] Macau WL, Cortez De Sá J, Da Silva APC, Rocha AL, Mondêgo-Oliveira R, De Andrade FHE, Cunha CM, Calabrese KDS, Abreu-Silva AL. Main lesions in the central nervous system of dogs due to *Leishmania infantum* infection. *BMC Veterinary Research,* 2017,13(1).
- [13] BARTANUSZ V, JEZOVA D, ALAJAJIAN B, DIGICAYLIOGLU M. The blood-spinal cord barrier: Morphology and Clinical Implications. *Annals of Neurology,* 2011 [acesso em 2022];70(2):194–206.
- [14] PAN W, BANKS WA, KASTIN AJ. Permeability of the blood–brain and blood–spinal cord barriers to interferons. *Journal of Neuroimmunology [Internet].* 1997;76(1-2):105–111.
- [15] SAÚDE, M. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, 2006.
- [16] Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) 2012. Resolução no 1000, 11 Maio 2012 - Dispõe sobre procedimentos e métodos eutanásia em outras Provid.
- [17] Grano FG, Silva JES, Melo GD, Perosso J, Lima VMF, Machado GFT.

Lymphocyte immunophenotypes in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2016;232:12–20.

[18] Pinto AJ, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalick MS, Tafuri WL. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand*. 2011;13:53-67. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22166041/>. Acesso em: 2022.

[19] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*. 2012;9(7):671–5.

[20] Font A, Mascort J, Altimira J, Closa JM, Vilafranca M. Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis. *The Journal of Small Animal Practice*. 2004;45(4):199-201.

[21] Cauduro A, Favole P, Lorenzo V, Simonetto L, Barda B, Cantile C, Asperio RM. Paraparesis caused by vertebral canal leishmaniotic granuloma in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011;25(2):398-399.

[22] José-López R, De La Fuente C, Pumarola M, Añor S. Intramedullary spinal cord mass presumptively associated with leishmaniasis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*. 2014;244(2):200-204.

[23] Márquez M, Pedregosa JR, 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*. 2013;25(1):142-146.

[24] Rönnbäck C, Hansson E. The Importance and Control of Low-Grade Inflammation Due to Damage of Cellular Barrier Systems That May Lead to Systemic Inflammation. *Front Neurol*. 2019;10:Article 308.

[25] Sun Y, Koyama Y, Shimada S. Inflammation From Peripheral Organs to the Brain: How Does Systemic Inflammation Cause Neuroinflammation? *Front Aging Neurosci*. 2022;14:Article 714509.

APÊNDICE A - REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 15, n. 28, p. 36-44, 2000.

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

GIANNUZZI, A. P.; RICCIARDI, M.; DE SIMONE, A.; GERNONE, F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 125-138, 2017. DOI: 10.1111/jsap.12650. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jsap.12602>. Acesso em: 2 mar. 2022.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MAIA, C. S. F.; MONTEIRO, M. C.; GAVIOLI, E. C.; OLIVEIRA, F. R.; OLIVEIRA, G. B.; ROMÃO, P. R. T. Neurological disease in human and canine leishmaniasis - clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 37, n. 8, p. 385-393, ago. 2015. DOI: 10.1111/pim.12203.

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

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

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

MELO, G.; SERAGUCI, T. F.; SCHWEIGERT, A.; SILVA, J. E. S.; GRANO, F. G.; PEIRÓ, J. R.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 192, n. 1-3, p. 57-66, 2013. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.11.002. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/74605>>. Acesso em: 15 jan. 2023.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA



JOURNAL OF COMPARATIVE PATHOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.1
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0021-9975

DESCRIPTION

The *Journal of Comparative Pathology* is an International, English language, peer-reviewed journal which publishes full length articles, short papers and review articles of high scientific quality on all aspects of the **pathology** of the **diseases** of domesticated and other **vertebrate animals**.

Articles on human diseases are also included if they present features of special interest when viewed against the general background of **vertebrate pathology**.

AUDIENCE

Research Workers in Veterinary Pathology and all those interested in the pathology of diseases of domesticated and other vertebrate animals.

IMPACT FACTOR

2021: 1.083 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
Embase
PubMed/Medline
Science Citation Index Expanded
AGRICOLA
BIOSIS Previews
Current Contents - Life Sciences
Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

S. Kennedy, Belfast, United Kingdom

Editorial Board

C. Benazzi, Ozzano Dell Emilia, Italy
R. J. Blundell, Neston, United Kingdom
M.P. Dagleish, Edinburgh, United Kingdom
M.T. Fox, Hatfield, United Kingdom
R.P. Kitching, Victoria, BC, Canada
K. Osterrieder, Hong Kong, Hong Kong
V. Perez, Leon, Spain
K.C. Smith, Hertfordshire, United Kingdom
D. Werling, Hertfordshire, United Kingdom
J. A. Wright, Herefordshire, United Kingdom

Proof Reader

P. Beynon, Abergavenny, United Kingdom

Editorial Advisors

C. Acin, Zaragoza, Spain
J. Baily, Stirling, United Kingdom
W. Baumgärtner, Hannover, Germany
J. Benavides, Leon, Spain
P. J. Canfield, Sydney, NSW, Australia
C. Cantile, Pisa, Italy
J.P. Cassidy, Dublin, Ireland
J. Del-Pozo, Edinburgh, United Kingdom
K. Dittmer, Palmerston North, New Zealand
J. Dykstra, Saint Paul, Minnesota, United States of America
R. W. Else, Edinburgh, United Kingdom
G. Foster, Inverness, United Kingdom
M. Garcia Hartmann, Mougins, France
L. González, Huesca, Spain
R. Klopfleisch, Berlin, Germany
G.D. Kommers, SANTA MARIA, Brazil
M. Krockenberger, Sydney, New South Wales, Australia
T. Kuiken, Rotterdam, Netherlands
A. Malbon, Midlothian, United Kingdom
J. Mansell, College Station, TX, United States of America
M. Marcondes, SAO PAULO, Brazil
E. McInnes, Warfield, United Kingdom
H. Nakayama, Tokyo, Japan
M.G. O'Sullivan, Minneapolis, MN, United States of America
G.R. Pearson, Bristol, United Kingdom
A. Pospischil, Zurich, Switzerland
S.L. Priestnall, Hatfield, United Kingdom
A. R. Resendes, Lisboa, Portugal
C. Scudamore, North Mymms, United Kingdom
A. Sukura, HELSINKI, Finland
B. Ytrehus, Uppsala, Sweden

GUIDE FOR AUTHORS

Notes for Contributors

Scope

The *Journal of Comparative Pathology* exists to publish articles recording research and original scientific findings relevant to the diseases of domesticated and other vertebrate animals. Articles on diseases of man are also appropriate if they present features of special interest when viewed against the general background of vertebrate pathology.

In addition, the Journal may publish Short Papers. These are intended to include reports of small completed investigations, new techniques or case descriptions. They should not have the subdivisions of a full length paper, but should include a brief summary and essential references. They would normally not exceed a word limit of 2,000 and should include no more than four supportive figures (as individual images) or tables. Such submissions should be clearly marked 'Short Paper'. Single case reports will be accepted only if they make a significant contribution to knowledge.

The Journal publishes Review Articles on topics of broad interest from invited authors with acknowledged expertise in their field. Unsolicited Review Articles will be considered, but authors intending to prepare a review should first contact the Editor-in-Chief to discuss their proposal for a review article.

The Journal will publish 'Mini Reviews' on topical subjects that fall within the overall scope of the Journal. A Mini Review will summarize in succinct fashion the key points related to (for example) the pathogenesis and pathology of a disease process and provide a 'cutting edge' overview of current research and future research directions related to that disease or subject area. Mini Reviews will normally be commissioned by the Editor of the Journal, but unsolicited contributions will be considered and subjected to the normal peer review process.

- A Mini Review will be restricted to a 1,750 to 2,000 word limit (not including abstract and references) and key points may be made by the use of bullet points.
- A Mini Review will be supported by no more than 10 key current references. References must be cited within the text in standard Journal format.
- A Mini Review should be supported by between four to six photographic images (e.g. of gross or microscopical pathology or diagrammatic summaries of key disease mechanisms).
- A Mini Review must have a standard abstract with up to 10 suggested Key Words.
- A Mini Review should follow the general Journal format for title, authors and affiliations, reference and citation style, Acknowledgments and Conflict of Interest Statement as detailed within the Notes for Contributors.

The Journal of Comparative Pathology offers an online 'Pathology Matters' platform for the journal's international community of readers, authors, editors and editorial advisers to comment on topical issues related to veterinary pathology.

Submissions to '*Pathology Matters*' should comprise substantive, concise and focussed commentary that is clear, compelling and attractive to our international readership of scientists in the veterinary and wider life science disciplines.

Contributions that are well argued and clearly written within the 600-word limit, are more likely to be accepted.

Comment pieces should have a concise and appealing title. Up to five references, preferably as hyperlinks within the text, can be included if necessary. If URLs cannot be provided for references, they can be typed at the end of the piece in the format of the Journal of Comparative Pathology. Authors

GUIDE FOR AUTHORS

Notes for Contributors

Scope

The *Journal of Comparative Pathology* exists to publish articles recording research and original scientific findings relevant to the diseases of domesticated and other vertebrate animals. Articles on diseases of man are also appropriate if they present features of special interest when viewed against the general background of vertebrate pathology.

In addition, the Journal may publish Short Papers. These are intended to include reports of small completed investigations, new techniques or case descriptions. They should not have the subdivisions of a full length paper, but should include a brief summary and essential references. They would normally not exceed a word limit of 2,000 and should include no more than four supportive figures (as individual images) or tables. Such submissions should be clearly marked 'Short Paper'. Single case reports will be accepted only if they make a significant contribution to knowledge.

The Journal publishes Review Articles on topics of broad interest from invited authors with acknowledged expertise in their field. Unsolicited Review Articles will be considered, but authors intending to prepare a review should first contact the Editor-in-Chief to discuss their proposal for a review article.

The Journal will publish 'Mini Reviews' on topical subjects that fall within the overall scope of the Journal. A Mini Review will summarize in succinct fashion the key points related to (for example) the pathogenesis and pathology of a disease process and provide a 'cutting edge' overview of current research and future research directions related to that disease or subject area. Mini Reviews will normally be commissioned by the Editor of the Journal, but unsolicited contributions will be considered and subjected to the normal peer review process.

- A Mini Review will be restricted to a 1,750 to 2,000 word limit (not including abstract and references) and key points may be made by the use of bullet points.
- A Mini Review will be supported by no more than 10 key current references. References must be cited within the text in standard Journal format.
- A Mini Review should be supported by between four to six photographic images (e.g. of gross or microscopical pathology or diagrammatic summaries of key disease mechanisms).
- A Mini Review must have a standard abstract with up to 10 suggested Key Words.
- A Mini Review should follow the general Journal format for title, authors and affiliations, reference and citation style, Acknowledgments and Conflict of Interest Statement as detailed within the Notes for Contributors.

The Journal of Comparative Pathology offers an online 'Pathology Matters' platform for the journal's international community of readers, authors, editors and editorial advisers to comment on topical issues related to veterinary pathology.

Submissions to '*Pathology Matters*' should comprise substantive, concise and focussed commentary that is clear, compelling and attractive to our international readership of scientists in the veterinary and wider life science disciplines.

Contributions that are well argued and clearly written within the 600-word limit, are more likely to be accepted.

Comment pieces should have a concise and appealing title. Up to five references, preferably as hyperlinks within the text, can be included if necessary. If URLs cannot be provided for references, they can be typed at the end of the piece in the format of the Journal of Comparative Pathology. Authors

gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example.](#)

Article Transfer Service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access (OA)

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open Access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [access programs](#)

- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Elsevier has established agreements with funding bodies, <https://www.elsevier.com/fundingbodies>. This ensures authors can comply with funding body open access requirements, including specific user licenses, such as CC BY. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. If you need to comply with your funding body policy, you can apply for the CC BY license after your manuscript is accepted for publication.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access.

Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

Language services

The *Journal of Comparative Pathology* is published in British and not American English. Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop <https://webshop.elsevier.com/language-editing-services/language-editing/> or visit our customer support site <https://service.elsevier.com> for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/YJCPA/default.aspx>.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Reference Style

The 'Vancouver Numbered' reference style should be used in your paper:

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JA, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2000;163:51-9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 3rd ed. New York: Macmillan; 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E- Publishing Inc; 1999, p. 281?304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.'" For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927-34), see also http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html.

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

Format of Articles

Articles must be concise and unnecessary duplication of data in text, tables and graphs should be avoided. Allusions to published work must be brief and limited to what is necessary to evaluate the findings in the manuscript. Extensive reviews of the literature will not be permitted, except in Review Articles.

To avoid repetition, if a related article by the same authors, or some of them, is being offered to a different journal, a copy of that article must be provided, in confidence, for comparison.

Manuscripts should be word processed. Times New Roman font at 12 pitch should be used, with generous margins and full double spacing throughout. Each line should be numbered by using the line numbering facility within the word processing package.

Papers should normally comprise:

1. An Abstract of the findings presented in the paper and the conclusions drawn from them. Authors may, if they wish, suggest up to 8 Keywords that should follow the Abstract.
2. A brief Introduction stating the purpose of the paper.
3. A concise account of the Materials and Methods used. Authors should note that appropriate positive and negative controls should be performed for all experimental techniques and the nature of these controls should be described with the methodology.
4. A record of the Results. Systeme Internationale (S.I.) units should be used.
5. A Discussion of the significance of the results.
6. Any necessary Acknowledgments for assistance. All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgments section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance. Finally, the acknowledgments section should include a declaration concerning Funding and any Role of the Funding Source. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.
7. A Conflict of Interest statement. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Graphical Abstracts

The Journal will publish a 'graphical abstract' in the on-line version of the Table of Contents for each issue of the Journal. Graphical abstracts comprise a single image (that may or may not be one of the figures in a paper) that encapsulates the subject of the paper. The image may be accompanied by a single sentence of text (of no more than 50 words) that describes the key message of the paper. Graphical abstracts will not be published in the print or on-line versions of the actual paper. Graphical abstracts are optional, but where authors would like to include such an abstract the image and proposed sentence must be submitted with a revised manuscript. The sentence may be modified by the Editor-in-Chief.

Tabulated Material

Tables require captions and should be self-explanatory. Each column should have a heading that accurately describes all entries beneath.

Illustrative Material

All illustrative material must be of high quality. Text figures (i.e., diagrams, charts, graphs), should bear lettering, numbers and symbols large enough to be legible after sizing to the journal pages. The figures will be inserted in the text at appropriate places. Authors should submit composite images electronically. The typesetter will use them as provided. Where the author wishes to draw attention to particular features by means of arrows or lettering, these should be superimposed electronically on the photographs. **No charge will be made for a reasonable number of figures or for the use of colour for photographic illustrations if, in the Editor's opinion, it enhances the presentation of results.** The maximum page area available for blocks is 23 x 16.9 cm. Figures designed to span one or both columns on a page should be 8.2 cm or 16.9 cm wide, respectively.

Legends to all illustrations should be included at the end of the manuscript and, where appropriate, should state the stain, and magnification. The magnification, where appropriate, should be indicated by a bar placed directly on the image with the distance represented typed in sufficiently large font to be legible on the published image.

The following formats can be used to submit figures electronically: EPS; TIFF (minimum resolution of 300 dpi for colour and halftones, 1000 dpi for bitmapped line drawings and 500 dpi for combination halftone/line drawing); DOC/XLS/ (if figures are created in any Microsoft Office application please supply "as is"). For a detailed guide on electronic artwork please visit our website <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Use of Copyright Material

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via <https://www.elsevier.com/permissions>.

Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Essential Title Page Information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, the current affiliation of that author may be indicated in the Acknowledgments section of the manuscript.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher on initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to [download the free Adobe Reader](#), version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the [Adobe site](#).

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via e-mail. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author's Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use
- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on [elsevier.com](https://www.elsevier.com))
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

ANEXO B - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Caracterização histopatológica e imunohistoquímica da medula espinhal de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum***", Processo FOA nº 0144-2021, sob responsabilidade de Gisele Fabrino Machado apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 29 de Abril de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 29 de Janeiro de 2023.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Março de 2023.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Histopathological and immunohistochemical characterization of the spinal cord of dogs naturally infected by *Leishmania infantum***", Protocol FOA nº 0144-2021, under the supervision of Gisele Fabrino Machado presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 29, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 29, 2023.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 01, 2023.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

ANEXO C – FIGURAS SUPLEMENTARES

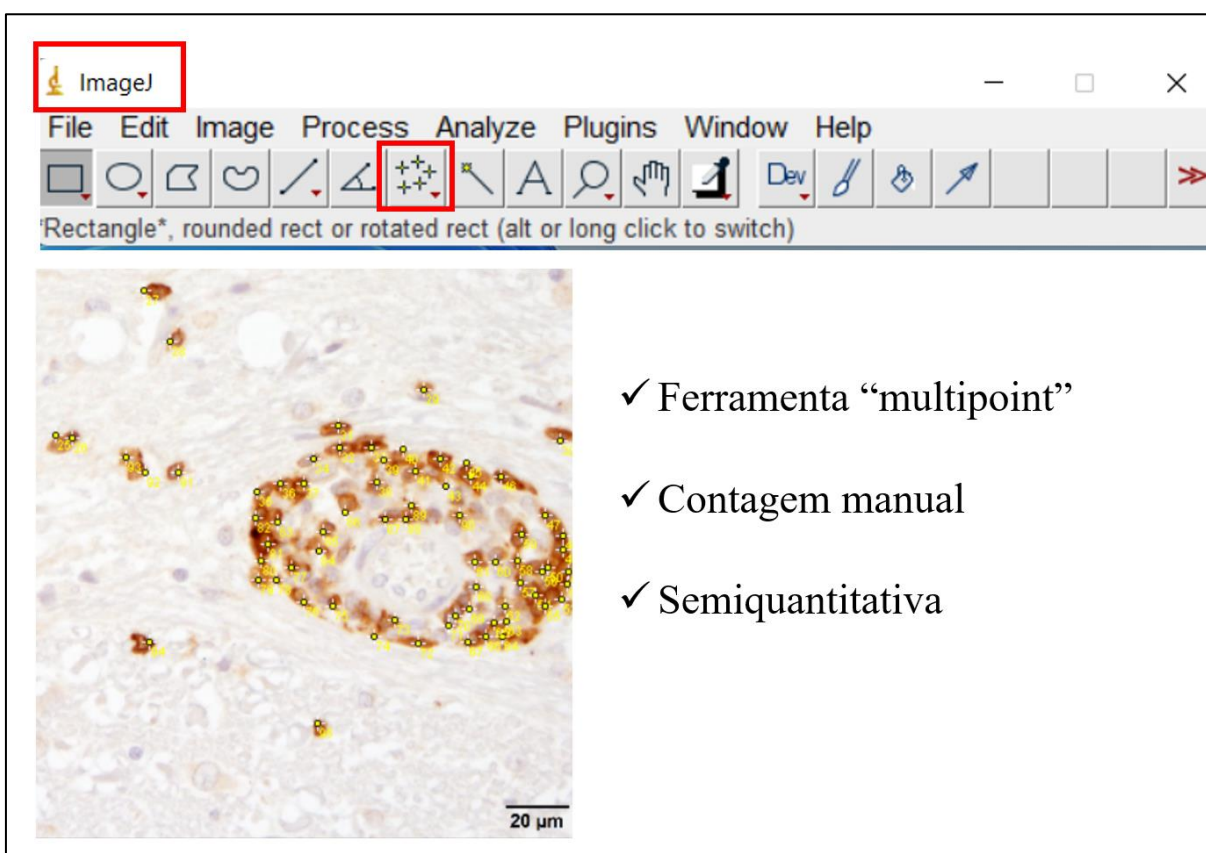
Figura S1 - Demonstração da graduação da reação inflamatória no encéfalo e medula espinhal.

Grano, et al. (2016)	Presente estudo
<ul style="list-style-type: none"> • Grau 0: ausência de inflamação • Grau I: inflamação discreta nas leptomeninges e PC • Grau II: inflamação moderada nas lepto + PC • Grau III: inflamação intensa lepto + PC + infiltrado perivascular intenso no parênquima cerebral 	<ul style="list-style-type: none"> • Grau 0: ausência • Grau I: leptomeningite discreta • Grau II: lepto + neurite/<u>perineurite</u> moderada • Grau III: lepto + neurite/ <u>perineurite</u> acentuada • Grau IV: mielite (manguito PV)

Legenda: PC: plexo coroide; PV: perivascular.

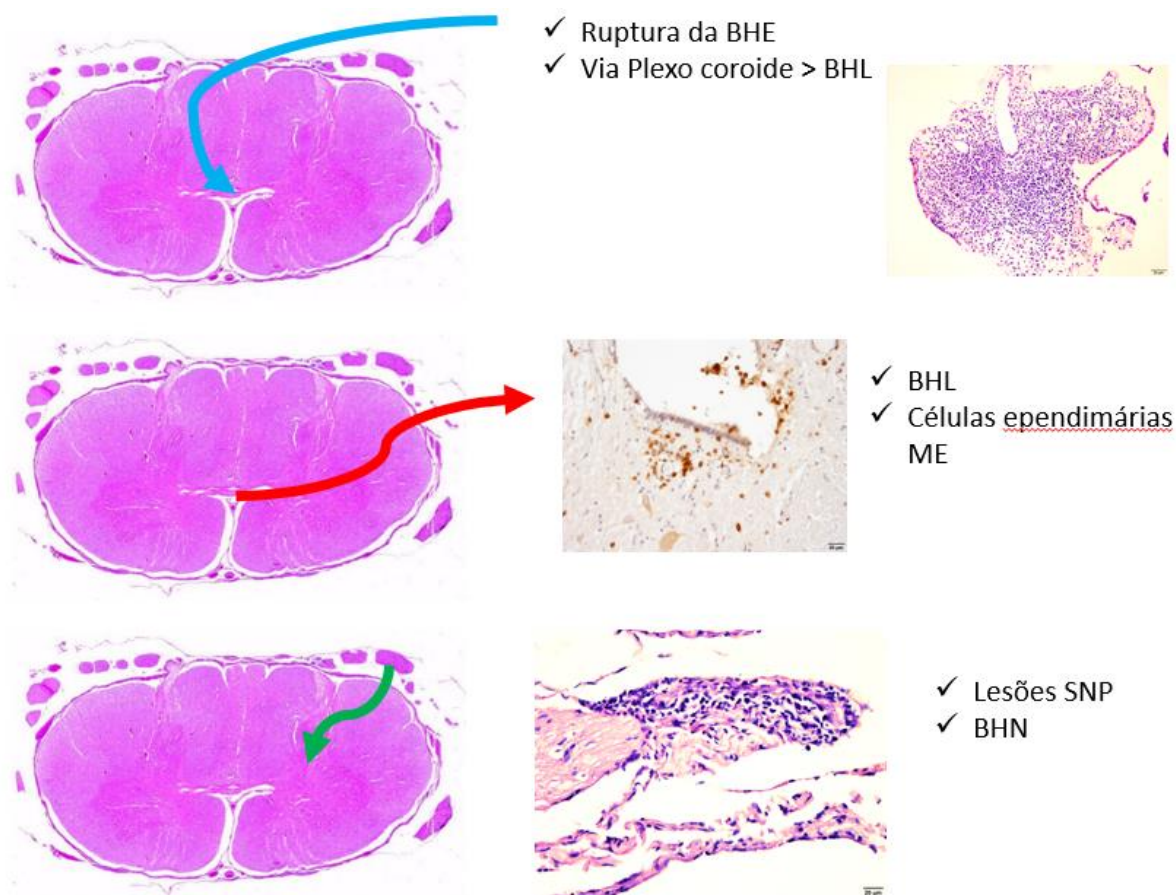
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura S2. Demonstração da contagem de linfócitos TCD3+ pelo software ImageJ (ferramenta “multipoint”).



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura S3 - Representação esquemática das possíveis vias de migração leucocitária para a medula espinhal.



A) Seta azul: observar a migração através da teoria da disfunção ou ruptura da barreira hematoencefálica (BHE) ou da BHL (evidenciada pela coroidite acentuada); B) Observar a presença de linfócitos TCD3+ no canal medular, por onde passa o líquido (disfunção da BHL) e uma possível migração direta através das células endodimárias pela observação de linfócitos TCD3+ na região subependimária; C) Observar a via de migração através da disfunção da BHN e/ou barreira de mielina, uma vez que se observa a neurite moderada (lesões no SNP).

Fonte: Elaborado pela autora.