

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

AVALIAÇÃO DAS LESÕES ENCEFÁLICAS E
FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS
DENDRÍTICAS EM LINFONODOS DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL

José Eduardo dos Santos Silva
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2013

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

**AVALIAÇÃO DAS LESÕES ENCEFÁLICAS E
FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS
DENDRÍTICAS EM LINFONODOS DE CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

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

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

ARAÇATUBA – SP
2013

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

Silva, José Eduardo dos Santos

S586a

Avaliação das lesões encefálicas e fenotipagem de linfócitos T e células dendríticas em linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral/
José Eduardo dos Santos Silva.

Araçatuba: [s.n], 2013
58f. il.; + CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2013
Orientador: Prof^a Adjunto. Gisele Fabrino Machado.

1. Animais - imunologia 2. Citometria de fluxo 3. Leishmania 4.
Sistema nervoso central 5. Linfócitos T CD8 positivos

CDD 571.961



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



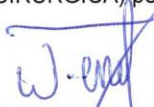
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Avaliação das lesões encefálicas e
fenotipagem de linfócitos T e células dendríticas
em linfonodos de cães com lesão medular
crônica.

AUTOR: JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS SILVA

ORIENTADORA: Dra. GISELE FABRINO MACHADO

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


Dr. WAGNER LUIS FERREIRA


Dr. ANTONIO CARLOS ALESSI


Dra. GISELE FABRINO MACHADO

DATA DA REALIZAÇÃO: 23 de agosto de 2013.


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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOSÉ EDUARDO DOS SANTOS SILVA – Araçatuba – SP, 23 de outubro de 1985. Graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias de Andradina, São Paulo em dezembro de 2010. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC de 2008 a 2009. Aluno do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, Câmpus de Araçatuba, São Paulo e bolsista CAPES até agosto de 2011 e FAPESP desde setembro de 2011. Estágio de pesquisa no Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, cidade de Lisboa, Portugal, entre março e maio de 2013.

“Eu temo pela minha espécie quando lembro que Deus é justo “

Thomas Jefferson

Dedico

Aos meus pais Traci e José (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

À Professora Adjunto Gisele Fabrino Machado, pela orientação, pela paciência e conhecimentos a mim transmitidos, com os quais pude vislumbrar novos horizontes e principalmente pela confiança depositada.

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

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

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa (#2012/01540-0) que originou a presente dissertação, bem como pela concessão da bolsa de mestrado (#2011/15523-3), e bolsa de estágio no exterior (#2012/25249-9), que foram essenciais para a conclusão dessa pesquisa.

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, em especial à Professora Doutora Gabriela Santos-Gomes e sua equipe: Ana Bolas, Maria Pereira, Armanda Rodrigues, Mariana Fernandes, David Matheus, Mafalda Claro, pelo apoio durante a realização do estágio de pesquisa na Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

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

À minha namorada Thaís Oliveira pelo apoio, incentivo, compreensão e amor demonstrados durante os períodos que estive distante.

Aos amigos, ou melhor, irmãos adquiridos durante o mestrado (Fernanda, Guilherme e Milena) pela imensa colaboração no desenvolvimento desse projeto, como também por muitos momentos de alegria e companheirismo, apoio científico e confiança.

Aos colegas pós-graduandos, Augusto, Janete, Camila, Kathlenn e Juliana pelo apoio, conselhos e troca de experiências durante o café.

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

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

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

A Deus pela oportunidade de concretizar meus sonhos.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	13
SUMMARY.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Leishmaniose Visceral.....	16
2.2 Sistema Imune.....	17
2.3 Leishmaniose Visceral Canina e a Sistema Imunológico	19
2.4 Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio.. ..	20
3 OBJETIVOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Animais.....	24
4.2 Diagnóstico de leishmaniose visceral	24
4.3 Colheita de material.....	25
4.3.1 Colheita de material e Análise histológica do Sistema Nervoso Central.....	25
4.3.2 Colheita dos linfonodos e Imunofenotipagem de Linfócitos T e Células Dendríticas	26
4.4 Análise estatística.....	29
5 RESULTADOS.....	30
5.1 Avaliação do Infiltrado inflamatório no encéfalo dos cães com LV	30
5.2 Fenotipagem da subpopulação de linfócitos T e células dendríticas.	35
6 DISCUSSÃO.....	42
7 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	grau Celsius
BHE	barreira hematoencefálica
BHL	barreira hematoliquórica
DP	duplo positivo
DN	duplo negativo
FITC	fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
IFN- γ	interferon gama
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
LC	leishmaniose cutânea
LV	leishmaniose visceral
MHC	antígeno principal de histocompatibilidade
p	probabilidade
RPE	fluorocromo de R-ficoeritrina
SNC	sistema nervoso central
TGF- β	fator de crescimento transformador beta
TCR	receptor de células T
Th1	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 1
Th2	linfócito T auxiliar (<i>helper</i>) tipo 2
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 – Imagens ilustrativas de encéfalo mostrando as áreas avaliadas demarcadas em amarelo. **(A)** Corte coronal passando por corpo mamilar, lobos temporal e piriforme. **(B)** Cerebelo. (M)= Meninges, (SE) = Subepêndima, (PC)= Plexo coroide, (H)= Hipocampo, (T)= Tálamo.**28**

Figura 2 – Fotomicrografias representativas da intensidade do infiltrado inflamatório em leptomeninges de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (setas). **(C)** Infiltrado inflamatório intenso. (*) Hematoxilina e Eosina. Barra = 50µm.....**31**

Figura 3 – Fotomicrografias representativas do infiltrado inflamatório no plexo coroide de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (seta). **(C)** Infiltrado inflamatório intenso. (*) Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 µm..... **32**

Figura 4 – Fotomicrografias representativas da intensidade do infiltrado inflamatório no subepêndima de cães com leishmaniose visceral. **(a)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(b)** Infiltrado inflamatório moderado (seta). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 µm.....**33**

Figura 5 – Porcentagem de cães com infiltrado inflamatório classificado de acordo com a intensidade em leptomeninges, subepêndima e plexo coróide, sendo mais frequente em leptomeninges. (-) Ausência de infiltrado inflamatório, **(+)** Infiltrado inflamatório discreto, **(++)** Infiltrado inflamatório moderado, **(+++)** Infiltrado inflamatório intenso, (*) Representa área com maior infiltrado inflamatório..... **34**

Figura 6 – Dot plot representativo da população de linfócitos T por meio de citometria de fluxo em cães com leishmaniose visceral. **(A)** CD3⁺ em linfonodos da cabeça. **(B)** CD3⁺ em linfonodo poplíteo. **(C)** CD4⁺ no quadrante inferior direito, CD8⁺ no quadrante superior esquerdo, CD4⁺CD8⁺ no quadrante superior direito e CD4⁻CD8⁻ em linfonodos da cabeça. **(D)** CD4⁺ no quadrante inferior direito, CD8⁺ no quadrante superior esquerdo, CD4⁺CD8⁺ no quadrante superior direito e CD4⁻CD8⁻ em linfonodo poplíteo.**36**

Figura 7 – Dot plot representativo da população de TCR por meio de citometria de fluxo em cães com leishmaniose visceral. **(A)** TCR $\alpha\beta^+$ em linfonodos da cabeça. **(B)** TCR $\alpha\beta^+$ em linfonodo poplíteo. **(C)** TCR $\gamma\delta^+$ em linfonodos da cabeça. **(D)** TCR $\gamma\delta^+$ em linfonodo poplíteo. **37**

Figura 8 – Dot plot representativo de células dendríticas por meio de citometria de fluxo em cães com leishmaniose visceral. **(A)** CD11c⁺ MHCII⁺ em linfonodos da cabeça. **(B)** cd11c⁺ MHCII⁺ em linfonodo poplíteo por meio de citometria de fluxo em cães com leishmaniose visceral **38**

Figura 9 – Subpopulações de linfócitos T e células dendríticas de linfonodos da cabeça e poplíteo de cães com LV. Referência da literatura representa pela linha pontilhada. **(A)** linfócitos T CD3⁺ CD4⁺. **(B)** linfócitos T CD3⁺ CD8⁺. **(C)** linfócitos T DP. **(D)** linfócitos DN **(E)** linfócitos TCR $\alpha\beta^+$ **(F)** linfócitos TCR $\gamma\delta^+$ **(G)** células dendríticas CD11c MHC II ($p>0,05$)..... **40**

Figura 10 – Comparação entre a subpopulação de linfócitos T dentro de cada tipo de linfonodo; maior prevalência de CD4⁺ e DN em relação ao CD8⁺ e DP tanto no pool de linfonodos da cabeça quanto do poplíteo **(A)**. Maior prevalência de TCR $\alpha\beta^+$ em comparação ao TCR $\gamma\delta^+$ **(B)**. ^{ab}Médias do percentual com letras distintas diferem entre si ($p<0,05$). * estatisticamente houve diferença significativa ($p>0,05$)..... **41**

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Valores das subpopulações de linfócitos T e células dendríticas nos linfonodos de cães com leishmaniose visceral. Dados expressos como mediana (intervalo interquartil).	39
--	-----------

AVALIAÇÃO DAS LESÕES ENCEFÁLICAS E FENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS T E CÉLULAS DENDRÍTICAS EM LINFONODOS DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO – A leishmaniose visceral é uma doença imunomediada que pode causar alterações na população de linfócitos T em diferentes órgãos e tecidos, e também aumento de células inflamatórias no encéfalo de cães infectados. O objetivo deste estudo foi avaliar e caracterizar as lesões encefálicas por meio de análise de cortes histológicos do encéfalo e as subpopulações de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, duplo-positivos (DP), duplo-negativos (DN), TCRs αβ e δγ e células dendríticas (cd11c⁺/MHC-II⁺) provenientes de linfonodos regionais da cabeça e do linfonodo poplíteo de cães com leishmaniose visceral utilizando citometria de fluxo. Os resultados mostram que encéfalos de cães com LV podem apresentar infiltrados inflamatórios em região de leptomeninges, plexo coroide e região subependimária. Entre os linfonodos, não houve diferença entre as subpopulações de linfócitos T, porém, observamos redução dos linfócitos T CD8⁺ e aumento dos T DN e TCR δγ enquanto que os CD4⁺ e DP e TCR αβ mantiveram-se próximos a valores de cães saudáveis, sugerindo assim que os linfócitos DN e TCR δγ podem estar relacionados com a resposta imunológica de cães sintomáticos com LV. Todos esses achados descartam a hipótese de que os linfonodos regionais da cabeça poderiam apresentar um padrão de resposta imune específica relacionada com as lesões encefálicas dos cães.

Palavras-chave: citometria de fluxo, *Leishmania*, linfócitos T CD8-positivo, receptor de células T, sistema nervoso central, subpopulações de linfócitos T

BRAIN LESIONS EVALUATION AND LYMPH NODAL T LYMPHOCYTES AND DENDRITIC CELLS PHENOTYPING IN DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

SUMMARY – Visceral leishmaniasis (VL) is an immune-mediated disease which may cause changes in T lymphocytes population in different organs and tissues, and also an increase in the inflammatory cells population in the brain of infected dogs. The aim of this study was to evaluate the encephalic lesions in brain sections, and to characterize the T lymphocytes subsets CD4+, CD8+, double-positive (DP), double-negative (DN), the TCRs $\alpha\beta$ and $\delta\gamma$, and the dendritic cells (CD11c+/MHC-II+) from the regional lymph nodes of the head and the popliteal lymph node using flow cytometry. The results evidenced that the brain of dogs with VL may present inflammatory infiltrates in leptomeninges, choroid plexus and subependymal area. Between the lymph nodes, there was no difference among the T cell subsets, nevertheless, there was noticed a reduction in the CD8+ lymphocytes and an increase in the DN subset as well as the TCR $\delta\gamma$, while CD4+, DP and TCR $\alpha\beta$ were detected in amounts closely related to described reference ranges, which suggests that the DN and TCR $\delta\gamma$ lymphocytes may be related to the immune response in symptomatic dogs. Altogether, these findings discard the hypothesis that the regional lymph nodes of the head may present a specific pattern of immune response related to the brain lesions in dogs with VL.

Keywords: central nervous system, flow cytometry, *Leishmania*, CD8-Positive T-Lymphocytes, T- cell receptor, T- lymphocyte subsets

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é uma zoonose potencialmente fatal para seres humanos, sendo o cão o principal reservatório da doença. A LV é transmitida pela fêmea do flebotomíneo *Lutzomya longipalpis* no momento do respasto sanguíneo (SOLANO-GALLEGO et al., 2010).

Vários estudos são focados principalmente na resposta imune nos órgãos linfóides e na pele de cães com LV, principais estruturas afetadas. Contudo, a resposta imune contra a LV parece ser órgão-específica (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

O sistema nervoso central (SNC) é considerado imunoprivilegiado, pois possui algumas características morfológicas e funcionais que o diferem quando comparado aos mecanismos desencadeados na resposta imune periférica (GALEA et al., 2007), entretanto, existe comunicação entre a resposta imune periférica e resposta imune do SNC (PAVLOV; TRACEY, 2006; TIAN et al., 2012). podendo ocorrer passagem de linfócitos T ativados para o encéfalo, e passagem de células dendríticas existentes nas meninges no caminho inverso para os linfonodos cervicais (GALEA et al., 2007).

A passagem de células inflamatórias para o SNC depende de perda da função das barreiras existentes no endotélio dos vasos encontrados no parênquima do encéfalo, e entre as células epiteliais do plexo coroide (REZAI-ZADEH et al., 2009).

A produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias poderia estimular a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais facilitando a passagem de linfócitos ativados. Por outro lado, as citocinas produzidas pela resposta imune periférica podem induzir ativação da glia resultando na síntese de outras citocinas e quimiocinas no SNC, que podem causar ou potencializar lesões no encéfalo (TIAN et al., 2012).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral (LV), é uma zoonose, causada pelo protozoário e *Leishmania chagasi* (= *infantum*), (MAURICIO et al., 2000). Os principais hospedeiros são os cães e o homem, mas o parasita já foi detectado em canídeos silvestres (LUPPI et al., 2008), gatos (VIDES et al., 2011), marsupiais (SANTIAGO et al., 2007) e roedores (OLIVEIRA et al., 2005).

A espécie de *Leishmania* possuem duas formas ao longo de seu ciclo de vida. A forma promastigota, flagelada, encontrada no trato intestinal dos vetores, é transmitida ao hospedeiro pela fêmea do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* durante o repasto sanguíneo, e a forma amastigota, aflagelada, parasita intracelular de células do sistema fagocitário mononuclear de hospedeiro vertebrado (BATES, 2007).

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

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica cujo os sinais clínicos mais frequentemente observados são alterações dermatológicas, onicogribose, alterações renais, alterações hepáticas, pneumonia, miocardite, distúrbios locomotores, alterações neurológicas, diáteses hemorrágicas e alterações oculares (FEITOSA et al., 2000; BANETH et al., 2008; PALTRINIERI et al., 2010) além de linfadenopatia. A linfadenomegalia é um dos sinais mais comuns e decorre da hipertrofia nas regiões cortical e medular dos linfonodos

(LIMA et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2008) e presença de muitos macrófagos infectados pelo protozoário (SARIDOMICHELAKIS, 2009).

Além dos linfonodos, o parasita pode replicar-se em diferentes órgãos como medula óssea, fígado e baço e cada um destes órgãos apresenta um padrão de resposta imune específica (SANCHEZ, 2004; REIS et al., 2009; GIUNCHETTI et al., 2008).

2.2 Sistema Imune

O sistema imunológico nos mamíferos apresenta dois tipos de resposta: a inata ou inespecífica e a adaptativa ou específica. A imunidade inata é a primeira linha de defesa a ser ativada. Ela envolve uma resposta antígeno-inespecífica constituída principalmente pelas barreiras físicas e bioquímicas dos epitélios e das mucosas, pelas células fagocitárias, pelas células “natural killer” e pelos constituintes proteicos sanguíneos (ABBAS et al., 2008).

A resposta imune adaptativa específica é ativada se a resposta inata não for eficiente. Esta resposta produz, portanto, uma reação antígeno-específica, capaz de reconhecer e montar uma resposta imunológica contra os antígenos proporcionando padrões de resposta celular, mediada por linfócitos T, ou resposta humoral, mediada por linfócitos B e responsável pela produção de anticorpos (ABBAS et al., 2008).

Os linfócitos expressam várias moléculas em sua superfície, que podem ser utilizadas para distinguir uma população celular de outra. O termo CD (*cluster of differentiation*, ou grupo de diferenciação), é utilizado para designar um marcador celular (ABBAS et al., 2008; ROITT, 2003), sendo a expressão de CD4 (T auxiliar) e CD8 (T citotóxico) as principais subpopulações de linfócitos T, e possuem papel importante como moléculas de diferenciação. (ABBAS et al., 2008; MARRACK et al., 1983; ROITT, 2003). Existem também os linfócitos T que expressam os CD4 e CD8 denominados duplo positivo (DP), e uma

pequena população de linfócitos T os quais não expressam nenhum dos dois correceptores, sendo denominados como linfócitos T duplo negativo (DN) (HAAS, et al., 2003).

Os linfócitos T DP têm sido descritos em humanos, suínos, ratos, frangos e macacos (AKARI et al., 1997; KENNY et al., 2000; ZUCKERMANN; HUSMANN, 1996). Embora suas atividades não estejam elucidadas essas células parecem ter funções tanto de linfócitos T auxiliar como a de T citotóxica (NAM et al., 2000; ZUCKERMANN, 1999). O aumento dos DP no sangue já foram relatadas em doenças autoimune, como a tireoidite auto-imune (IWATANI et al., 1993), dermatite atópica (BANG et al., 2001), infecções virais (NASCIMBENI et al., 2004; SUNI et al., 2001; WEISS et al., 1998) e câncer (DESFRAŇÇOIS et al., 2009, SARRABAYROUSE et al., 2011).

A origem dos linfócitos T DP não está totalmente esclarecida. Bonomo et al. (1994) sugeriram que timócitos DP são liberados prematuramente do timo, o que foi confirmado por Berrih et al. (1981) em humanos, pois a timectomia eliminou totalmente as células T DP da circulação. Por outro lado, em ratos, a timectomia não alterou o número dessas células (GODDEN et al., 1985), e em suínos resultou no aumento de células DP (MASON; WILLIAMS, 1980).

Os linfócitos DN em seres humanos possuem função regulatória e também efeitos pró-inflamatórios associados a doenças autoimune, tais como lúpus e artrite reumatóide (FISHER et al., 2005; TOMSON et al., 2006). Além disso, variação nas proporções desta subpopulação em humanos também tem sido demonstrada em outras doenças causadas por protozoários como a doença de Chagas (VILLANI et al., 2010).

Os linfócitos possuem ainda em sua superfície, estruturas importantes denominadas receptores antigênicos (TCR) (ABBAS, et al., 2008), que reconhecem antígenos apresentados por células apresentadoras de antígeno ligados a moléculas de MHC-II, importante para ativação dos linfócitos T auxiliar e T citotóxico (CHEN, 2004). Além disso, os TCRs são codificados por quatro tipos distintos de genes: α , β , γ e δ . Aproximadamente 90 a 95% dos

linfócitos T expressam o TCR $\alpha\beta$ e o restante (5 a 10%) são linfócitos T que expressam TCR $\gamma\delta$ (GAY et al., 1986; ROITT, 2003).

As células dendríticas (DCs) são apresentadoras de antígeno e expressam as moléculas de histocompatibilidade, o MHC classe II. As DCs de cães podem ser diferenciadas de outras células apresentadoras de antígeno por meio de marcadores, entre esses o Cd11c e MHC-II (GUTZWILLER et al., 2010).

As DCs imaturas, estão presentes nos tecidos e possuem alta capacidade de capturar antígenos. Entretanto essas células não possuem capacidade de estimular uma resposta de linfócitos T. Quando entram em contato com derivados de antígenos ou sinais inflamatórios, as DCs sofrem maturação diminuindo assim sua capacidade de capturar antígenos. Durante esse processo ocorre a estabilização de moléculas de superfície do MHC da classe I e de classe II, e essas células migram para órgãos linfóides secundários iniciando a resposta imune específica, podendo direcionar as polaridades de linfócitos T para a diferenciação de células Th1 de células Th2 (GUERMONPREZ et al., 2002; ZOZULYA et al., 2010).

2.3 Leishmaniose Visceral Canina e o Sistema Imunológico

A leishmaniose canina pode ser considerada como uma doença imunomediada, pois o parasita possui a capacidade de modificar o sistema imunológico do hospedeiro (BARBIÉRI, 2006). A resposta imune na leishmaniose pode ser ocasionada por panantígenos, compostos por antígenos de superfície do parasita ou substâncias produzidas pelo protozoário (SANTARÉM, et al., 2010). Durante a doença, as células do sistema fagocítico mononuclear infectadas por parasitas atuam como células apresentadoras de antígenos, estimulando linfócitos T auxiliares CD4⁺ tipo 1 e 2 (Th1 e Th2).

Quando ativados, os linfócitos tipo 1 produzem citocinas como IFN- γ , a IL-2 e o TNF, que ativam os macrófagos. Os macrófagos ativados, por sua vez, estimulam a imunidade celular pela ativação de outras células ou por sua proliferação. Quando há o predomínio da ativação de linfócitos tipo 2, ocorre aumento da sobrevivência do parasita e no aparecimento das lesões pelas ações supressivas de suas citocinas nos macrófagos (ABBAS et al., 2008; BARBIÉRI, 2006), e também ativação de linfócitos B (BARBIÉRI, 2006).

Alguns trabalhos comprovam uma falha de resposta celular específica em cães sintomáticos com leishmaniose visceral, caracterizada por redução na resposta linfoproliferativa aos antígenos de *Leishmania* e uma redução no número de células CD4⁺ (PINELLI et al., 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2000). Outros trabalhos comprovam que, particularmente os linfócitos T CD8⁺, são importantes na proteção imune em casos de leishmaniose cutânea e visceral (GIUNCHETTI et al., 2008) devido à ação citotóxica, levando à lise de macrófagos infectados e produção de IFN- α , responsável por uma resposta imune do tipo 1. (PINELLI et al., 1994).

2.4 Sistema Nervoso Central e o Imunoprivilégio

O SNC em condições normais é considerado um local imunologicamente privilegiado devido à reduzida expressão de antígenos de histocompatibilidade, ao baixo número de células apresentadoras de antígeno e à eficiência da barreira hematoencefálica (BHE). Esta barreira localiza-se entre a luz de vasos sanguíneos e o parênquima nervoso (PERSIDSKY et al., 2006), e é composta por uma camada de células endoteliais, com junções intercelulares do tipo oclusivas (*"tight junctions"*). A BHE é envolvida por pericitos, envolvidos por uma membrana basal, macrófagos perivasculares e pés terminais de astrócitos (BALLABH et al., 2004; GALEA et al., 2007).

A BHE limita a saída de substâncias do sangue e o tráfego de leucócitos dentro do SNC, mas estudos indicam que leucócitos ativados são capazes de cruzar a mesma e realizar a vigilância imunológica do SNC (KIVISÄKK et al., 2009; MAN et al., 2007).

A BHE está presente em todo o SNC, exceto no plexo coroide e nos órgãos circunventriculares. No plexo coroide encontra-se a barreira hematoliquórica (BHL), a qual é constituída por uma camada de células epiteliais que participam da formação líquido cefalorraquidiano (LCR) (VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003).

Os órgãos circunventriculares são áreas adjacentes aos ventrículos cerebrais. Os vasos sanguíneos que constituem o plexo coroide são fenestrados e o epitélio ependimário não apresenta seletividade de passagem de moléculas entre o LCR e o tecido nervoso, atribuindo à BHL grande importância funcional, limitando a passagem entre o sangue e o líquido cefalorraquidiano (VORBRODT; DOBROGOWSKA, 2003).

O SNC possui um mecanismo de resposta imune específica que conta com a participação de células residentes, principalmente os astrócitos e micróglia, para regulação do processo inflamatório (BAILEY et al., 2006). Existe também uma comunicação ativa entre a vigilância imunológica do SNC e o sistema imune periférico, podendo as células gliais detectar citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6), produzidas por células imunes periféricas resultando em síntese de citocinas e quimiocinas no SNC que podem causar ou potencializar lesões no encéfalo (PAVLOV; TRACEY, 2006; TIAN et al., 2012). As citocinas secretadas por células imunes na periferia não podem difundir-se através da BHE intacta (BANKS, 2005). Além disso, o plexo coroide e o LCR podem atuar como portas de entrada para patógenos ou antígenos circulantes e essas estruturas podem ser as primeiras a responder a um estímulo inflamatório periférico (MELO; MACHADO, 2009; 2011).

As DCs são raramente encontrados no parênquima saudável do SNC. Entretanto, essas células podem ser encontradas em compartimentos

vascularizados tais como as meninges e do plexo coroide sob condições normais. Além disso, as DCs podem ser encontradas no SNC em resposta a inflamação local induzida por autoimunidade, infecção ou trauma (ZOZULYA, et al., 2010).

Embora existam muitos relatos sobre lesões sistêmicas, poucos são os relatos de ocorrência de lesões no SNC durante a LV. Em cães, há descrições sobre a migração de parasitas, deposição de antígenos e imunoglobulinas levando a meningite e coroidite (GARCIA-ALONSO et al., 1996; MELO; MACHADO, 2009; MELO et al., 2009; NIETO et al., 1996; VIÑUELAS et al., 2001). Em camundongos inoculados experimentalmente com *L. amazonensis*, foram detectadas lesões inflamatórias no SNC (ABREU-SILVA et al., 2003). Estudos anteriores sugerem que a infecção por *L. chagasi* pode promover desregulação da permeabilidade seletiva da BHE, com infiltração de leucócitos (MELO et al. 2013).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar e caracterizar as lesões encefálicas por meio de análise de cortes histológicos do encéfalo e as subpopulações de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$, duplo-positivos (DP), duplo-negativos (DN), TCRs $\alpha\beta$ e $\delta\gamma$ e células dendríticas ($cd11c^+/MHC-II^+$) provenientes de linfonodos regionais da cabeça e do linfonodo poplíteo de cães com leishmaniose visceral utilizando citometria de fluxo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 17 cães naturalmente infectados por *L. infantum*, machos e fêmeas, sintomáticos com pelo menos três sinais clínicos da doença (emagrecimento, onicogribose, aumento de volume de linfonodos e baço, lesões cutâneas), sem sinais de alterações neurológicas.

Os cães foram provenientes do atendimento realizado no Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba – SP, cuja eutanásia foi autorizada pelos proprietários seguindo-se a recomendação do Ministério da Saúde. Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol® 3%) e posteriormente receberam cloreto de potássio (19,1%) por via intravenosa.

4.2 Diagnóstico de Leishmaniose Visceral

O diagnóstico de LV foi realizado por meio de exame parasitológico de punção biópsia aspirativa de linfonodos (PBA), bem como avaliação sorológica, por meio do teste ELISA realizado segundo o protocolo descrito por Lima et al. (2003).

4.3 Colheita de material

4.3.1 Colheita de material e Análise histológica do Sistema Nervoso Central

O encéfalo foi colhido imediatamente após a eutanásia sendo o tecido fixado em formalina 10% tamponada. Após o tempo de manutenção no fixador (máximo 12 horas), cortes coronais de regiões corticais (lobos temporal e piriforme), hipocampo, tálamo e cerebelo foram obtidos, tomando-se o cuidado de se obter os plexos coroides dos ventrículos laterais. A presença de infiltrado inflamatório foi investigada próximo a vasos do neurópilo, mas principalmente em leptomeninges, camada subependimária dos ventrículos laterais e plexo coroide. As áreas colhidas e avaliadas estão representadas na Figura 1. Os fragmentos foram incluídos em parafina (cortes de 5 μ m) para coloração pela hematoxilina-eosina.

A presença de células inflamatórias no plexo coroide, epêndima e leptomeninges foi determinada semi quantitativamente usando-se escala de 0-3; onde 0 representou a ausência de células inflamatória; 1 presença discreta (acúmulo focal de raras células); 2 presença moderada (acúmulo difuso ou multifocal de poucas células) e 3 intensa presença de células inflamatórias (acúmulo intenso e difuso de grande quantidade de células).

4.3.2 Colheita dos linfonodos e Imunofenotipagem de Linfócitos T e Células Dendríticas

Foram colhidos fragmentos dos linfonodos retrofaríngeos, submandibulares e os linfonodos poplíteos sendo colocados em tubos contendo meio RPMI 1640. Os linfonodos retro-faríngeos e submandibulares foram processados juntos de modo a formar um “pool” de linfonodos da cabeça. O tecido foi dissociado mecanicamente em PBS pH 7,2-7,4 e molaridade 0,01 seguido pela retirada de debris celulares. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 800 x g por 10 minutos a 20°C e incubadas com tampão de lise de hemácias. Após a lavagem com solução de PBS, a contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer. Cerca de 1×10^5 células foram utilizadas para marcação dos antígenos CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, MHCII⁺, CD11c⁺, TCR $\alpha\beta$ ⁺ e TCR $\gamma\delta$ ⁺. Inicialmente foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos com soro autólogo canino a 10%. As Suspensões celulares foram incubadas com os seguintes anticorpos monoclonais para cão: anti-CD3 conjugado a FITC (clone CA17.2A12), anti-CD4 conjugado a RPE (clone YKIX302.9), anti-CD8 conjugado a Alexa Fluor® (clone YCATE55.9); anti-TCR $\alpha\beta$ (clone CA15.8G7); anti-TCR $\gamma\delta$ (clone CA20.8H1), com respectivos isotipos controles. Para os TCRs, foram necessários anticorpos secundários anti-IgG1 para $\alpha\beta$ e IgG2a $\gamma\delta$ conjugados a fluoróforos RPE e FITC.

As análises da subpopulação de linfócitos T e das células dendríticas nos linfonodos da cabeça e poplíteo foram obtidas dentro do total de 10.000 eventos. Primeiro foi determinada a porcentagem total de linfócitos T CD3⁺. Em seguida, dentro dessa população, as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ foram detectadas bem como os linfócitos duplo positivo (DP) e duplo negativo (DN). Para determinação dos TCRs, as células foram isolados em um "gate" e dentro dessa população foram determinadas as porcentagens de $\alpha\beta$ ⁺ e $\gamma\delta$ ⁺. As DCs foram determinadas com marcação para CD11c e MHCII. As marcações dos TCRs e das células dendríticas foram realizadas separadamente.

Todos os anticorpos foram adquiridos da Serotec (USA). As amostras foram avaliadas no citômetro EasyCyte mini® (Guava, Hayward, CA), usando-se o *software* Express Plus® Guava.

Foram utilizados padrões de referências descritos na literatura de cães saudáveis para comparação dos valores obtidos.

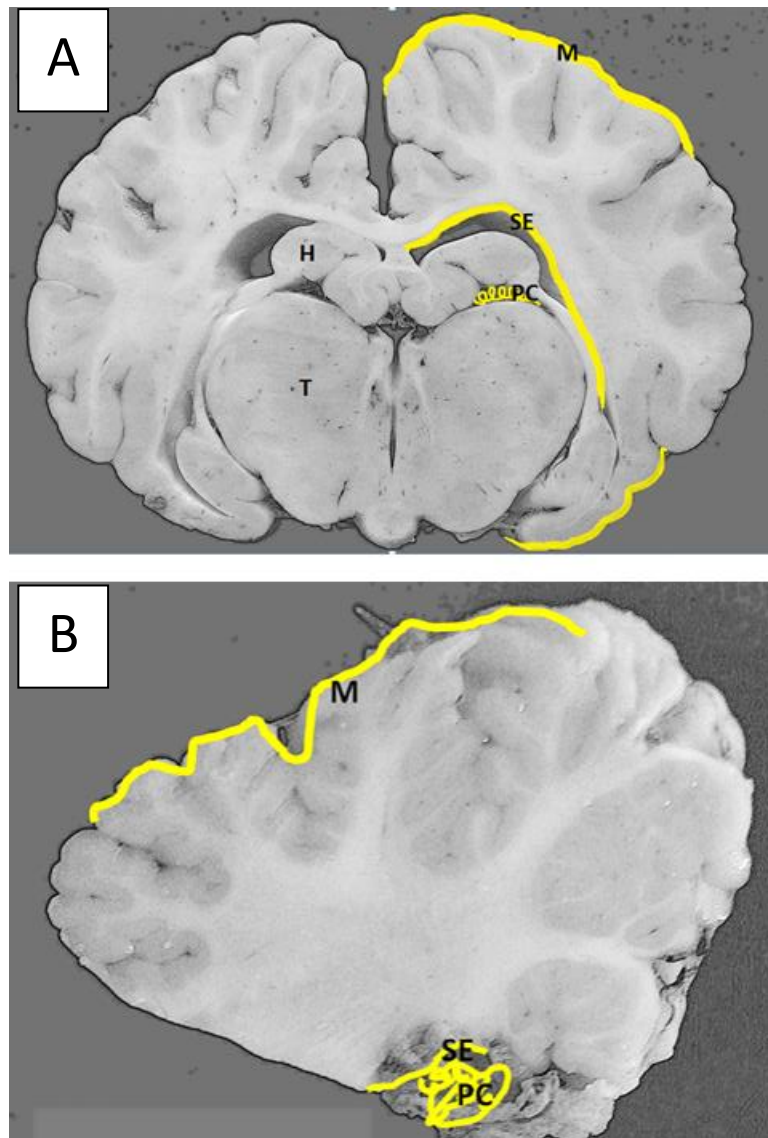


FIGURA 1- Imagens ilustrativas de encéfalo mostrando as áreas avaliadas demarcadas em amarelo. **(A)** Corte coronal passando por corpo mamilar, lobos temporal e piriforme. **(B)** Corte sagital do vermis cerebelar, (M) = meninges, (SE) = Subepêndima, (PC) = Plexo corioide, (H) = Hipocampo, (T) = Tálamo.

4.4 Análise estatística

Para avaliação da intensidade da inflamação foi utilizado teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Para avaliação da imunofenotipagem dos linfócitos T e células dendríticas o teste de Wilcoxon. Para a verificação entre as populações em cada linfonodos foi utilizado o teste Friedman seguido pelo teste de Dunn. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. Os dados foram expressos como mediana (intervalo interquartil). Todas as análises foram realizadas usando-se o software Prism 6 (GraphPad, San Diego, Estados Unidos da América).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do Infiltrado inflamatório no encéfalo dos cães com LV

Na análise histopatológica do encéfalo dos cães com LV não foram encontradas alterações compatíveis com outras doenças como a cinomose. A análise revelou predominância de alterações inflamatórias em áreas das regiões corticais, hipocampo, tálamo e subependimária, plexo coroide e cerebelo. Foi detectada infiltração de células linfoplasmocitárias, com intensidades variando de discreta a intensa, em áreas perivasculares, sobretudo em leptomeninges (Figura 2), plexo coroide (Figura 3), subepêndima (Figura 4). Nas leptomeninges, 58,8% dos animais apresentavam inflamação moderada, 35,3% discreta e 5,9% intensa. No subepêndima 64,7% dos animais apresentaram discreta, 11,8% moderada e 23,5% não apresentaram infiltrado inflamatório. No plexo coroide, 35,3% dos animais apresentaram intensidade discreta, 17,6% moderada, 5,9% intensa e 41,2 não apresentaram evidência de células inflamatórias (Figura 5). Não foram encontradas formas amastigotas da *Leishmania chagasi* nos cortes corados por HE.

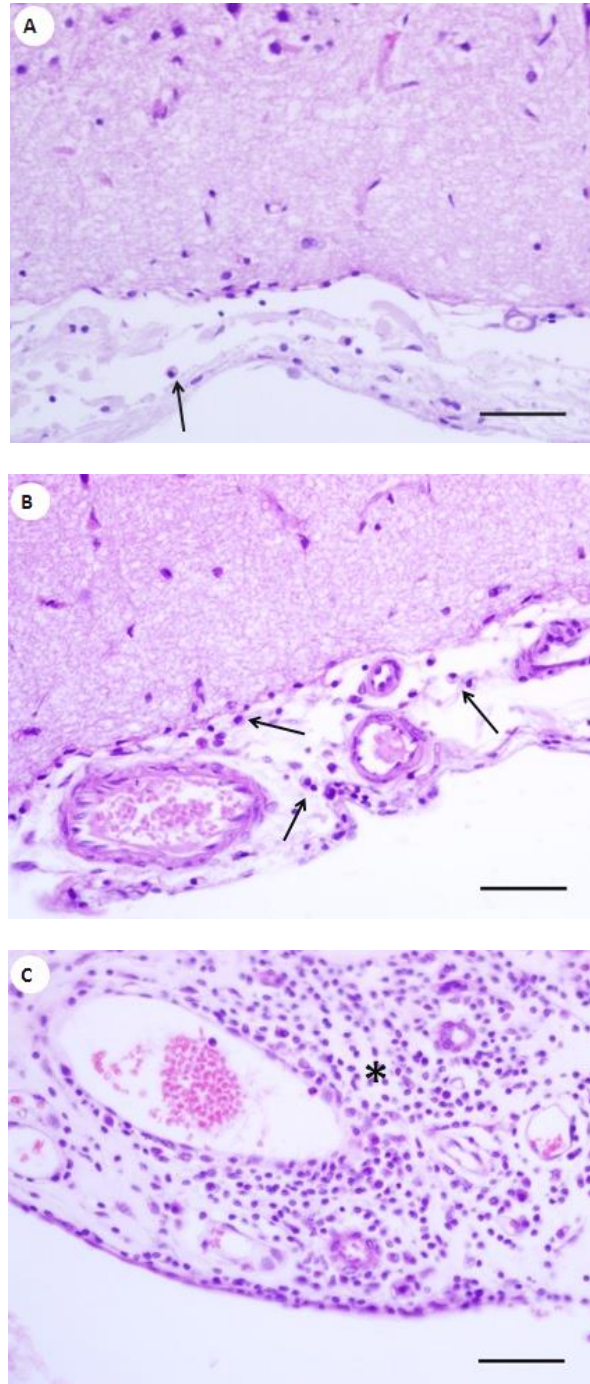


FIGURA 2 - Fotomicrografias representativas da intensidade do infiltrado inflamatório em leptomeninges de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (setas). **(C)** Infiltrado inflamatório intenso (*). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50µm.

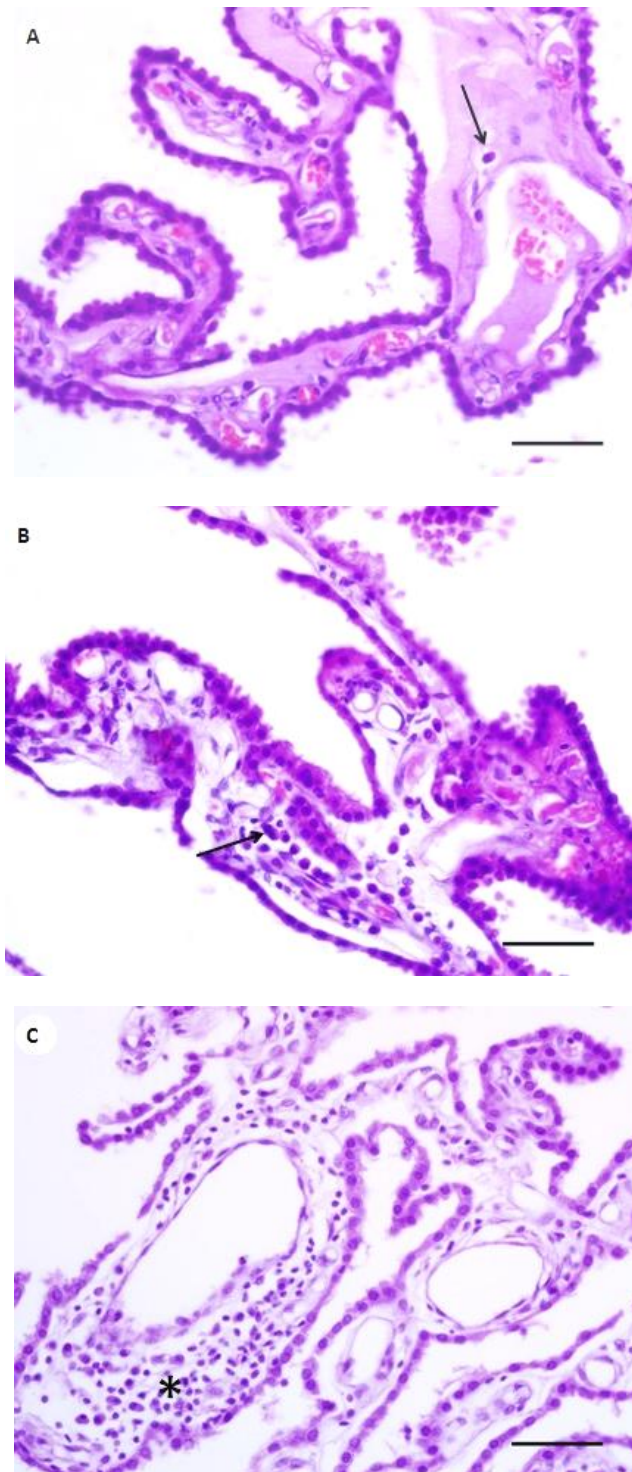


FIGURA 3 - Fotomicrografias representativas da intensidade do infiltrado inflamatório no plexo coroide de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (seta). **(C)** Infiltrado inflamatório intenso. (*) Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 µm.

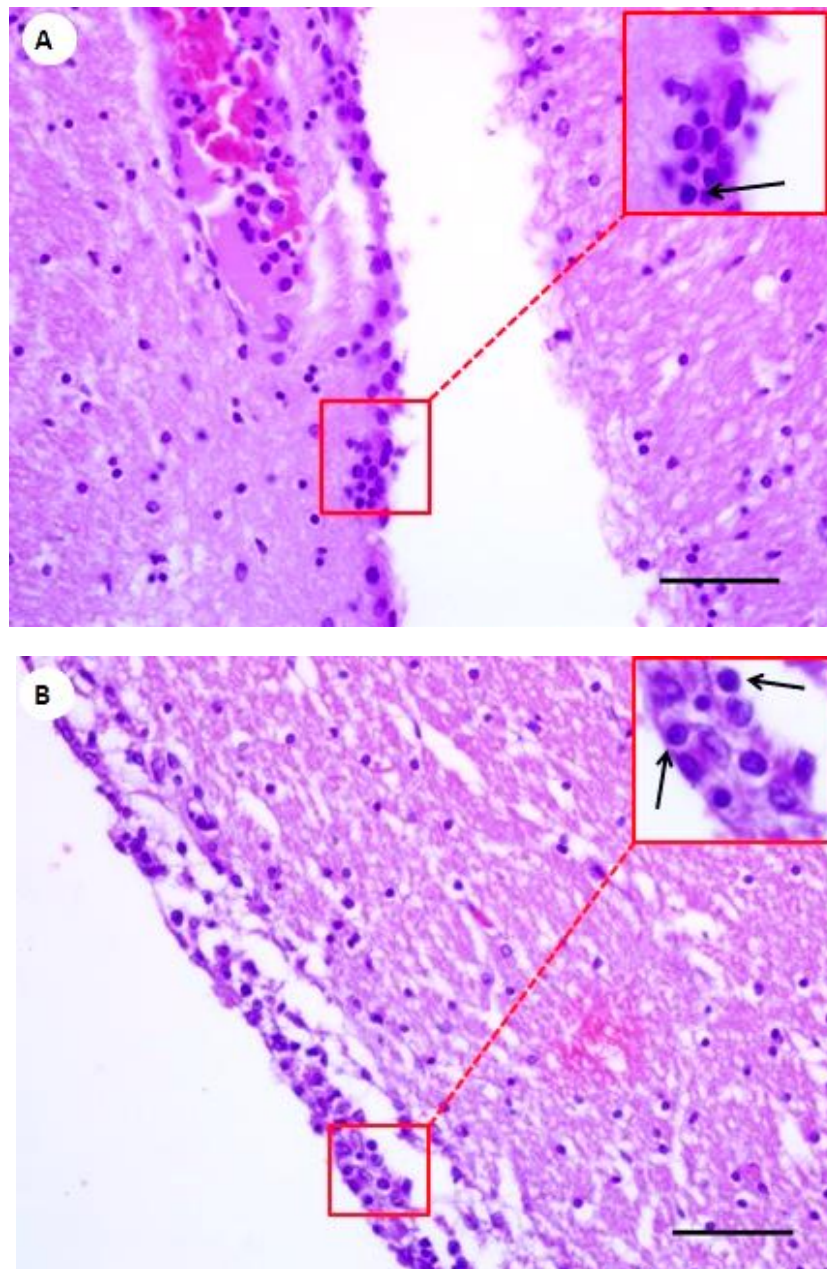


FIGURA 4 - Fotomicrografias representativas da intensidade do infiltrados inflamatório no subepêndima de cães com leishmaniose visceral. **(A)** Infiltrado inflamatório discreto (seta). **(B)** Infiltrado inflamatório moderado (seta). Hematoxilina e Eosina. Barra = 50 μ m.

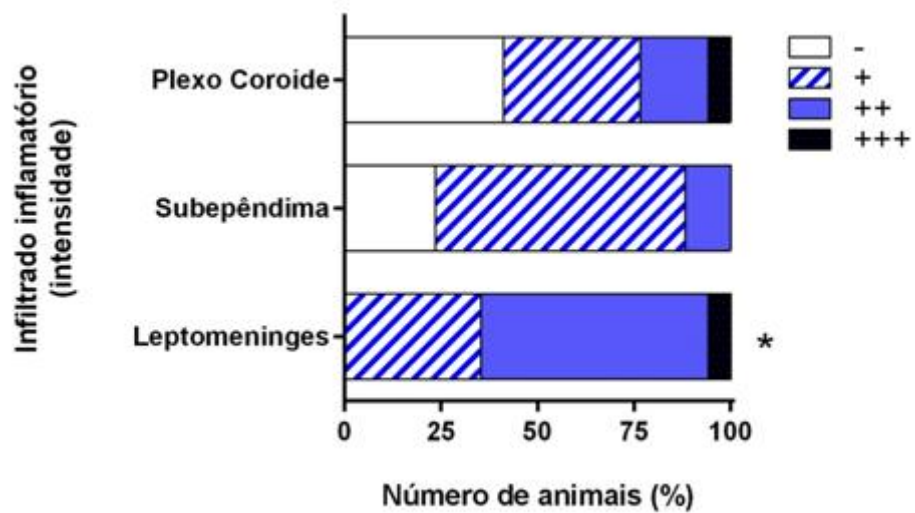


FIGURA 5 – Porcentagem de cães com infiltrado infamatório classificado de acordo com a intensidade em leptomeninges, subepêndima e plexo coroide, sendo mais frequente em leptomeninges. (-) Ausência de infiltrado inflamatório, (+) Infiltrado inflamatório discreto, (++) Infiltrado inflamatório moderada, (+++) Infiltrado inflamatório intenso. (*) Representa área com maior infiltrado inflamatório.

5.2 Fenotipagem da subpopulação de linfócitos T e células dendríticas

Houve diminuição na subpopulação de linfócitos T $CD8^+$ e aumento de DN nos linfonodos dos cães com LV quando comparados aos valores de cães saudáveis referidos na literatura. Entretanto não foram observados diferenças significativas entre esses valores percentuais dos linfócitos, assim como o $CD4^+$, DP, DN (Figura 6C e D) e os TCRs quando comparados os linfonodos da cabeça e o linfonodo poplíteo entre os cães com leishmaniose visceral ($p>0,05$) (Tabela 1). Observou-se variação individual das populações de linfócitos T nos animais avaliados.

Quando comparadas as subpopulações de linfócitos T dentro do mesmo tipo de linfonodo (tanto os linfonodos da cabeça quanto os linfonodos poplíteos) (Figura 7) observou-se maior prevalência de linfócitos $CD4^+$ em relação ao $CD8^+$ e do DN em relação ao DP ($p<0,05$) (Figura 9, Figura 10A e B). Em comparação entre os tipos de TCRs, foi observado predomínio do $TCR\alpha\beta^+$ sobre o $TCR\gamma\delta^+$ ($p<0,05$) (Figura 10 C e D). Não foram encontradas diferenças significativas entre a porcentagem de células dendríticas no linfonodo da cabeça e no poplíteo.

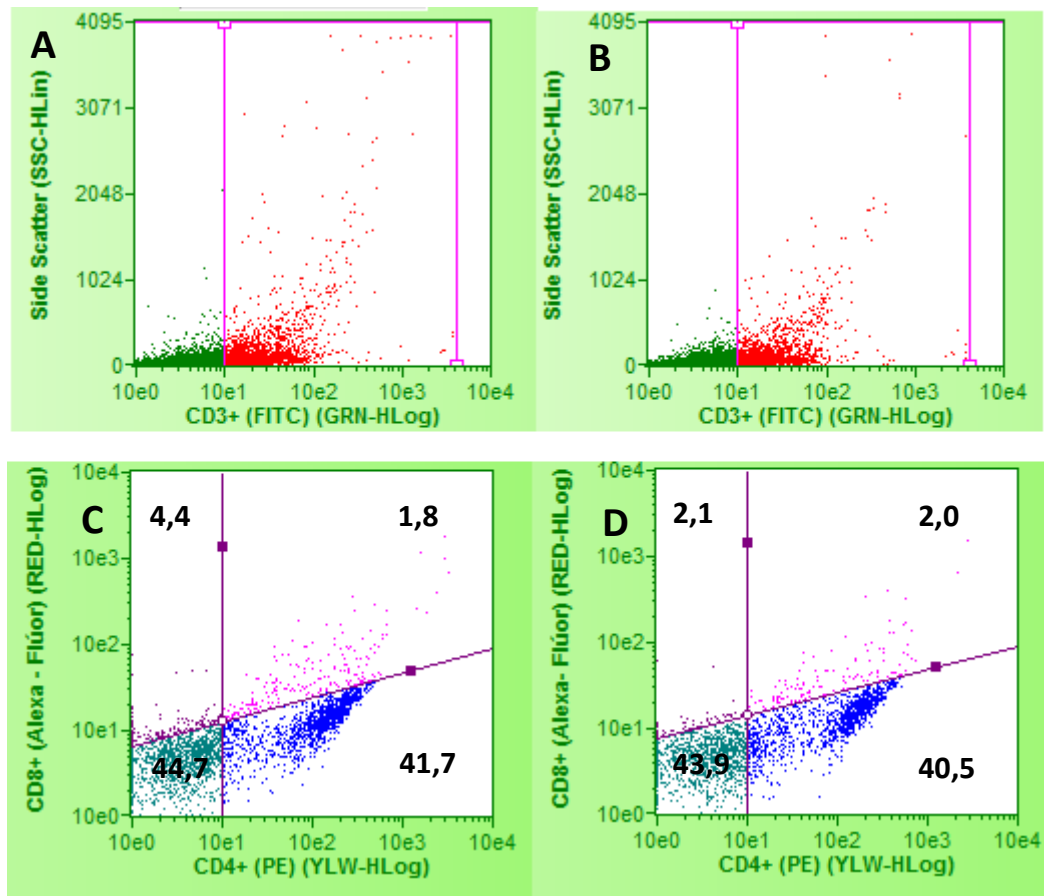


FIGURA 6 – Dot plot representativo da população de linfócitos T por meio de citometria de fluxo em cães com leishmaniose visceral. **(A)** $CD3^+$ em linfonodos da cabeça. **(B)** $CD3^+$ em linfonodo poplíteo. **(C)** $CD4^+$ no quadrante inferior direito, $CD8^+$ no quadrante superior esquerdo, $CD4^+CD8^+$ no quadrante superior direito e $CD4^-CD8^-$ em linfonodos da cabeça. **(D)** $CD4^+$ no quadrante inferior direito, $CD8^+$ no quadrante superior esquerdo, $CD4^+CD8^+$ no quadrante superior direito e $CD4^-CD8^-$ em linfonodo poplíteo.

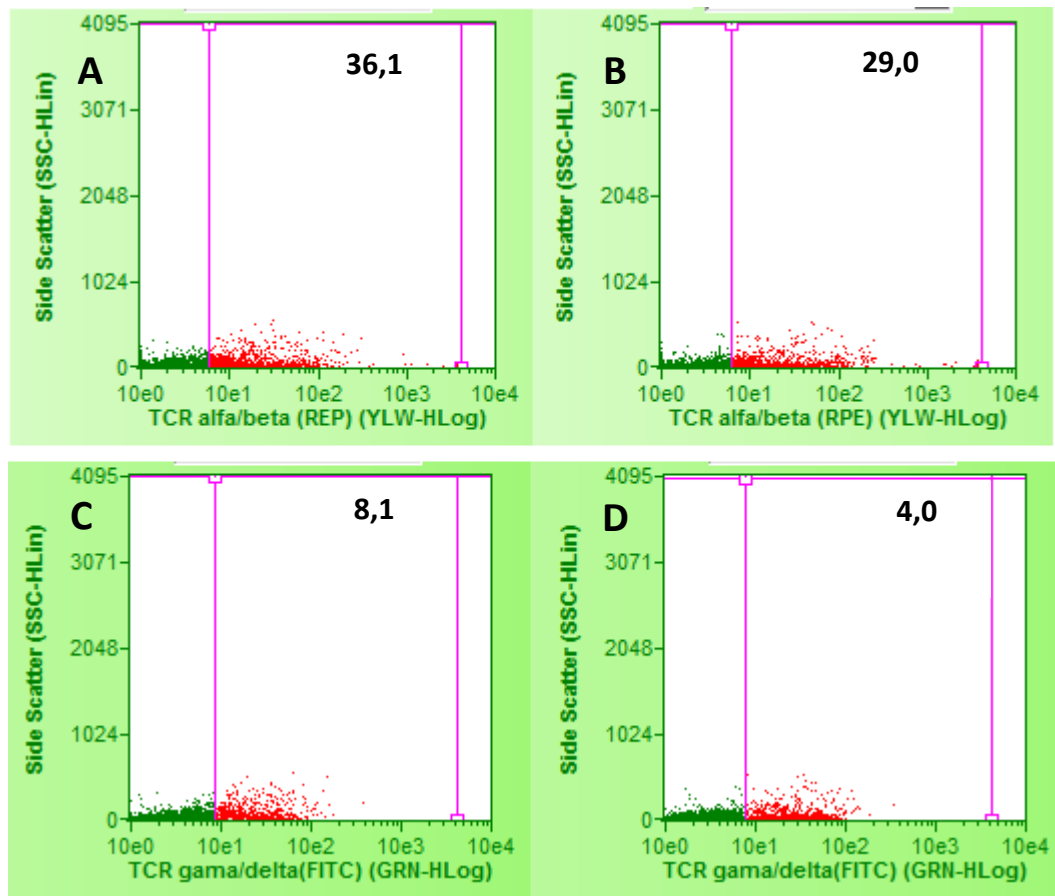


FIGURA 7 – Dot plot representativo da população de TCR por meio de citometria de fluxo em cães com leishmaniose visceral. **(A)** TCR $\alpha\beta^+$ em linfonodos da cabeça. **(B)** TCR $\alpha\beta^+$ em linfonodo poplíteo. **(C)** TCR $\gamma\delta^+$ em linfonodos da cabeça. **(D)** TCR $\gamma\delta^+$ em linfonodo poplíteo.

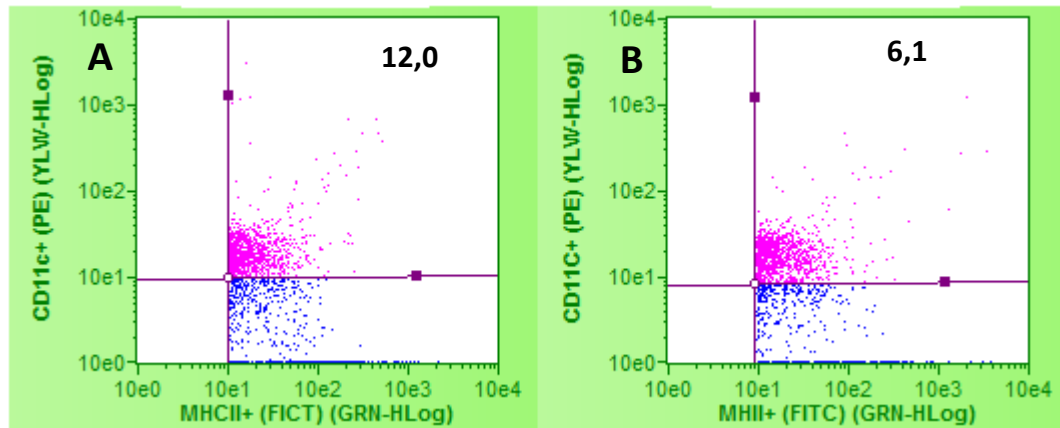


FIGURA 8 – Dot plot representativo de células dendríticas por meio de citometria de fluxo em cães com leishmaniose visceral. **(A)** CD11c⁺/MHCII⁺ em linfonodos da cabeça. **(B)** CD11c⁺/MHCII⁺ em linfonodo poplíteo por meio de citometria de fluxo em cães com leishmaniose visceral.

Tabela 1 – Valores das subpopulações de linfócitos T e células dendríticas nos linfonodos de cães com leishmaniose visceral. Dados expressos como mediana (intervalo interquartil).

Populações	Mediana Cabeça	Mediana Poplíteo	P
CD4⁺	41,7 (53,9)	40,5 (38,3)	0,9265
CD8⁺	4,4 (7,0)	2,1 (8,0)	0,8904
DP	1,8 (10,1)	2,0 (14,3)	0,9780
DN	44,7 (25,9)	43,9 (33,8)	0,8900
TCR $\alpha\beta$⁺	36,1 (51,7)	29,0 (41,8)	0,3484
TCR $\gamma\delta$⁺	8,1 (13,1)	4,0 (13,7)	0,591
CD11c/MHC-II	12,0 (18,2)	6,1 (14,0)	0,4307

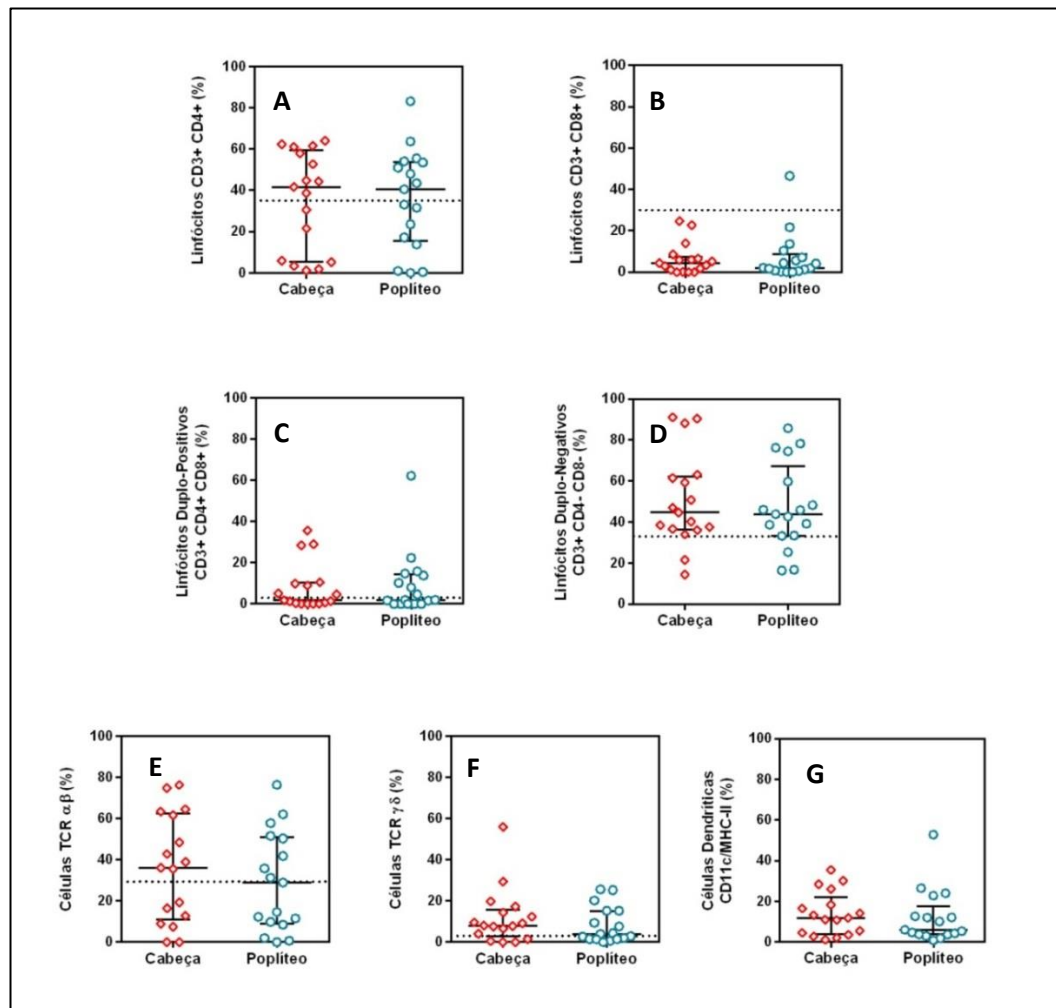


FIGURA 9 – Subpopulações de linfócitos T e células dendríticas de linfonodos da cabeça e poplíteo de cães com LV. A linha pontilhada representa os valores normais de referência. **(A)** linfócitos T $CD3^{+} CD4^{+}$. **(B)** Linfócitos T $CD3^{+} CD8^{+}$. **(C)** Linfócitos T DP. **(D)** Linfócitos DN. **(E)** linfócitos TCR $\alpha\beta^{+}$ **(F)** Linfócitos TCR $\gamma\delta^{+}$ **(G)** Células dendríticas $CD11c/MHC-II$ ($p > 0,05$).

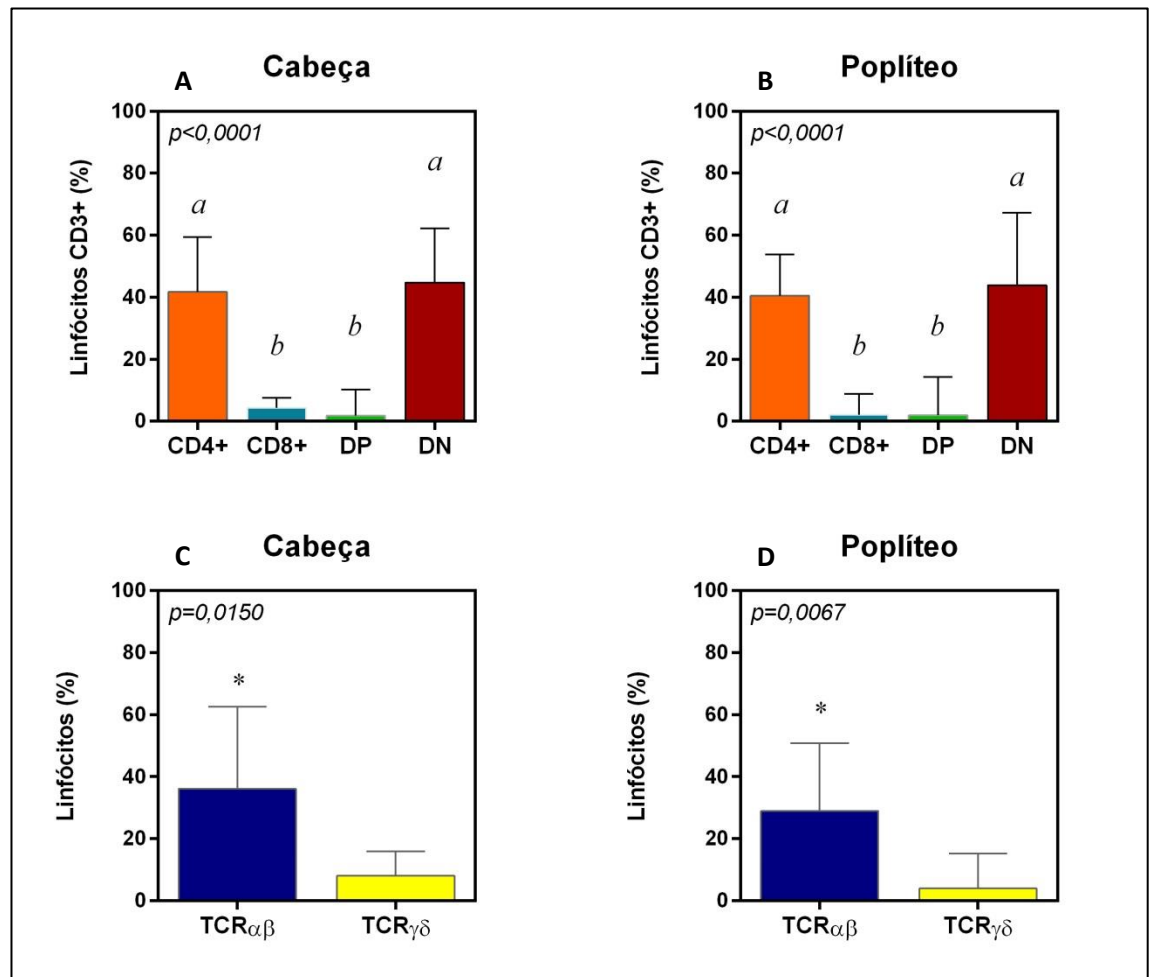


FIGURA 10 – Comparação entre a subpopulação de linfócitos T dentro de cada tipo de linfonodo; maior prevalência de CD4⁺ e DN em relação ao CD8⁺ e DP tanto no pool de linfonodos da cabeça quanto do poplíteo (**A**). Maior prevalência de TCR $\alpha\beta$ ⁺ em comparação ao TCR $\gamma\delta$ ⁺ (**B**). ^{ab}Medianas do percentual com letras distintas diferem entre si ($p < 0,05$). * indica diferença significativa ($p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Na análise histopatológica das amostras do encéfalo dos cães com LV foi observado a presença de células inflamatórias mononucleares, formando infiltrado inflamatório localizado principalmente na região subependimária, nas leptomeninges das regiões corticais, cerebrais e cerebelares, concordando com os achados de Melo et al. (2009). O SNC em condições normais possui baixo número de linfócitos (BALLABH et al., 2004), entretanto alterações inflamatórias no encéfalo de cães com leishmaniose visceral são relatadas em algumas publicações (IKEDA et al., 2007; MELO et al., 2009; MELO; MACHADO, 2011), concordando com as alterações encontradas neste estudo.

Apesar de existirem descrições sobre lesões inflamatórias no encéfalo de cães com LV, não foram observadas formas amastigotas de *L. chagasi*. De fato, são poucos os relatos da presença do parasita no SNC de cães, exceto por relatos de formas amastigotas no plexo coroide (NIETO et al., 1996), em meninges (VIÑUELAS et al., 2001), e na medula espinhal (MARQUÉZ et al., 2013). Além disso, macrófagos contendo formas amastigotas de *L. amazonensis*, causadora da leishmaniose cutânea, foram detectados no parênquima cerebral em casos de infecção experimental em camundongos (ABREU-SILVA et al., 2003).

No presente estudo, embora tenha ocorrido uma grande variação individual, a mediana da porcentagem de linfócitos T CD4⁺ apresentou valores próximos aos descritos na literatura para cães normais. Estes resultados diferem dos obtidos por Alexandre-Pires et al. (2010) que não observaram diferença entre os linfócitos T CD4⁺ em cães sintomáticos com LV e o grupo controle. Entretanto, os mesmos autores encontraram um aumento desses linfócitos em cães assintomáticos, o que pode sugerir que essas células estejam relacionadas diretamente com a progressão da doença.

Foi observada também redução de linfócitos T CD8⁺ quando comparado aos valores de referência citados na literatura, ao contrário de Alexandre-Pires

et al. (2010) que não observaram diferença entre os cães sintomáticos e o grupo controle. Em infecção experimental com *L. chagasi*, Pinelli et al. (1995) observaram aumento da população de T CD8⁺ sugerindo que essas células estão envolvidas no controle da infecção por meio de ação citotóxica.

A redução do número de linfócitos T CD3⁺ e das suas subpopulações pode ocorrer devido ao aumento de apoptose destas células e também pela redução na capacidade proliferativa dos órgãos linfoides descrita em cães infectados por *Leishmania chagasi* (HAMAD, 2001; LIMA et al., 2012; MOREIRA et al., 2013). Em particular, a diminuição de linfócitos T CD8⁺ pode estar relacionada a progressão da LV em cães doentes, uma vez que a evolução clínica da leishmaniose visceral canina é largamente determinada pela resposta imune mediada por linfócitos T, influenciando na produção de citocinas e interagindo com macrófagos (BRANDONISIO et al., 1988).

Houve aumento na porcentagem mediana de células DN nos linfonodos, diferente do que foi observado por Alexandre-Pires et al. (2010). No entanto, os linfócitos T DN apresentaram-se predominantes em relação ao DP, o que também foi observado pelos mesmos autores. Esta população de células também foi observada entre os linfócitos do sangue periférico de cães com LV por Alexandre-Pires et al. (2010), e segundo estes autores, tanto os linfócitos DP como os DN podem ter um papel importante no controle de infecção latente e na dinâmica da resposta imune em cães com LV (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010).

Melo et al. (2009) relataram a presença de linfócitos T CD3 compondo o infiltrado inflamatório no encéfalo dos cães com LV. Entretanto não existem estudos detalhados sobre as subpopulações destas células. O predomínio de linfócitos DN nos linfonodos observado neste trabalho sugere que os linfócitos T CD3⁺ no encéfalo podem apresentar o fenótipo DN. Em relação ao TCR $\alpha\beta$ ⁺, os valores foram próximos aos normais, entretanto foram observados sete animais com porcentagem maior que o normal em cães saudáveis descrito na literatura (GIBSON et al., 2004). A porcentagem dos linfócitos que exibem o TCR $\alpha\beta$ ⁺ nos linfonodos poplíteos de cães saudáveis representaram 29,4%

(GIBSON et al., 2004), de maneira similar ao observado no presente estudo (29,1%), sugerindo que a população de linfócitos T com receptores $\text{TCR}\alpha\beta^+$ não sofrem diminuição em cães com LV. Já os linfócitos $\text{TCR}\gamma\delta^+$ apresentaram aumentados em comparação em cães saudáveis em estudo dos mesmos autores.

Em cães, a presença do TRC $\gamma\delta$ já foi relatada em doenças com caráter inflamatório/imunomediado crônico como a miosite mastigatória (PUMAROLA et al., 2004), a dermatite atópica (OLIVRY et al., 2006) e também em casos de linfoma (BORSKA et al., 2009), ou seja, em doenças que se caracterizam por uma desregulação na resposta imunológica, como ocorre em cães com LV.

Em humanos, a presença elevada de linfócitos $\text{TCR}\gamma\delta$ já foi relatada em casos de leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea e visceral (RUSSO et al., 1993). Ainda, na LC, enquanto a maioria das células expressa o fenótipo DN $\alpha\beta$ com a produção de um perfil de citocinas pró-inflamatórias, uma pequena parcela relativa às células DN $\gamma\delta$ produziu um perfil de citocinas regulatórias exemplificado pela IL-10, sugerindo que o equilíbrio entre esses dois subtipos celulares pode prover uma resposta celular efetiva ou ser potencialmente patogênica (ANTONELLI et al., 2006).

Os linfócitos T DN também já foram relacionados com a produção de citocinas em humanos infectados por outros protozoários parasitas como *Trypanosoma cruzi* (VILLANI et al., 2010). Para Bottrel et al. (2001), células T DN são a segunda maior fonte de $\text{IFN-}\gamma$ do sangue periférico em pacientes com LC. Além disso, o aumento de dessa citocina também já foi relatado em células mononucleares de cães infectados experimentalmente com *Leishmania* sp. (COSTA et al., 2013). Em linfonodos com alta carga parasitária de cães com LV, foram observados maior expressão de IL-10 e $\text{TGF-}\beta$, sugerindo assim que essas citocinas estão relacionadas com a progressão da doença (ALVES et al., 2010).

Desta forma, nos cães deste estudo, os linfócitos T DN poderiam estar produzindo citocinas pró-inflamatórias como $\text{IFN-}\gamma$, semelhante ao que já foi observado na LC (BOTTREL et al., 2001), que pode estar contribuindo para o

comprometimento da função das barreiras cerebrais. Além disso, a ativação das células gliais observada em cães com LV (MELO; MACHADO, 2011) pode estar ocorrendo em resposta à produção periférica desta ou de outras citocinas, resultando em ativação da glia e estímulo para produção de mais mediadores inflamatórios. Por sua vez, esses fatores também podem causar alterações na permeabilidade e integridade da BHE, o que permitiria a migração de linfócitos para o SNC. São ainda necessários estudos que comprovem quais citocinas são produzidas por linfócitos DN oriundos dos linfonodos de cães com LV.

Quanto as células dendríticas CD11c⁺/MHCII⁺, observamos que houve variação individual entre os animais, mas não houve diferença significativa entre a população de células dendríticas nos linfonodos estudados. Células dendríticas de cão foram identificadas em sangue e linfonodos por Goodell et al. (1985). Vários trabalhos demonstraram que as células dendríticas desempenham um papel importante no desenvolvimento de inflamação no SNC de animais e humanos (BAILEY et al., 2007; GRETER et al., 2005; MCMAHON et al., 2005) e estas células também foram relatadas em casos de esclerose múltipla (PLUMB et al., 2003; SERAFINI et al., 2006).

As células dendríticas podem migrar através de células endoteliais vasculares cerebrais e acessar o SNC (KARMAN et al., 2004, 2006; ZOZULYA et al., 2007). Além disso, estas células conservam a sua capacidade de migrar para os linfonodos periféricos por meio de quimiocinas e ativar as células T virgens (ZOZULYA et al., 2007).

7 CONCLUSÃO

A semelhança observada entre a população celular dos linfonodos da região da cabeça e do poplíteo comprova o caráter sistêmico da LV e descarta a hipótese de que os linfonodos regionais da cabeça poderiam apresentar um padrão de população linfóide e de células dendríticas que tivesse alguma relação mais específica com as lesões encefálicas dos cães, como maior número de células dendríticas.

A alteração no perfil de linfócitos T caracterizado por redução dos linfócitos T CD8⁺ e o aumento de linfócitos T DN e TCRs $\gamma\delta^+$ sugerem que essas células estejam diretamente relacionadas com a progressão das lesões observadas na LV, incluindo as encontradas no encéfalo dos cães. Entretanto, serão necessários novos estudos para elucidar o papel exato dos linfócitos T DN e a correlação com os TCRs $\gamma\delta^+$ durante a progressão da leishmaniose visceral canina.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and molecular immunology**, 6.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2008.

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; TEDESCO, R.C.; MORTARA, R.A.; DA-COSTA, S.C. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, p. 661- 665, 2003.

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

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

ALVES, C.F.; AMORIM, I.F.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.M.; MELO, M.N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 128, p. 349-358, 2009.

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

BAILEY, S. L.; SCHREINER, B.; MCMAHON, E. J., MILLER, S.D. CNS myeloid dendritic cells presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4⁺ T(H)-17 cells in relapsing EAE. **Nat. Immunol.**, v. 8, p.172-80, 2007.

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

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

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

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

BANKS, W. A. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. **Curr. Pharm.**, v.11, p.973–984, 2005.

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

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

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

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

BORSKA, P.; FALDYNA, M.; BLATNY, J.; LEVA, L.; VEJROSTOVA, M.; DOUBEK, J.; MOORE, P.F. Gamma/delta T-cell lymphoma in a dog. **Can. Vet. J.**, v. 50, p. 411-416, 2009.

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

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

CHEN, L. Co-inhiibitory moleculares of the B7- CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature**, v. 4, p. 336-437, 2004.

COSTA, D.J.; CARVALHO, R.M.A.; ABBEHUSEN, M.; TEIXEIRA, C.; PITOMBO, M. TRIGO, J.; NASCIMENTO, F.; AMORIM L.; ABREU-SILVA, A.L.; CRUZ, M.S.P.; MIRANDA, J.C.; FUKUTANI, K.; OLIVEIRA, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; BRODSKYN, C. Experimental Infection of Dogs with leishmania and saliva as a model to study canine visceral leishmaniasis. **Plos one**, v. 8, p. 1-11, 2013.

DESFRAŒOIS, J.; DERRÉ, L.; CORVAISIER, M.; LE MÉVEL, B.; CATROS, V.; JOTEREAU, F.; GERVOIS, N. Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 alpha beta T cells in human breast pleural effusions. **Int. J. Cancer.**, v.125, p. 374–380, 2009.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com Leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínic. Vet.**, v. 28, p. 36-44, 2000.

FISCHER, K.; VOELKL, S.; HEYMANN, J.; PRZYBYLSKI, G.K.; MONDAL, K.; LAUMER, M.; KUNZ- SCHUGHART, L.; SCHMINDT, C.A.; ANDREESSEN, R.; MACKENSEN A., 2005. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. **Blood.**, v. 105, p.2828–2835, 2005.

GALEA, I.; BECHMANN, I.; PERRY, V. H., 2007. What is immune privilege (not)? **Trends immunol.**, v. 28, p. 12-18, 2007.

GIBSON, D.; AUBERT, I.; WOODS, J. P.; ABRAMS-OGG, A.; KRUTH, S.; WOOD, R.D.; BIENZLE, D. Flow Cytometric Immunophenotype of Canine Lymph Node Aspirates. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 18, p. 710–717, 2004.

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

GODDEN, U.; HERBERT, J.; STEWART, R.D.; ROSERIES, B. A novel cell type carrying both Th and Tc/s markers in the blood of cyclosporinetreated, allografted rats. **Transplant.**, v. 39, p. 624-628, 1985.

GOODELL, E.M.; BLUMENSTOCK, D.A.; BOWERS, W.E. Canine dendritic cells from peripheral blood and lymph nodes. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 8, p. 301-10, 1985.

GRETER, M.; HEPPNER, F. L.; LEMOS, M. P.; ODERMATT, B. M.; GOEBELS, N.; LAUFER, T, NOELLE, R. J.; BECHER, B. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. **Nat. Med.**, v. 11, p. 328-334, 2005.

GUERMONPREZ, P.; SAVEANU, L.; KLEIJMEER, M.; DAVOUST, J.; VAN ENDERT, P.; AMIGORENA, S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. **Nature**, v. 425, p. 397-402, 2003.

GUTZWILLER, M.E.R.; MOULIN, H.R.; ZURBRIGGEN, A.; ROOSJE, P.; SUMMERFIELD, A., Comparative analysis of canine monocyte and bone-marrow-derived dendritic cells. **Vet. Res.**, v. 40, p. 41-52, 2010.

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

HAMAD, A.R.; SRIKRISHNAN, A.; MIRMONSEF, P.; BROEREN, C.P.; JUNE, C.H.; PARDOLL, D.; SCHNECK, J.P. Lack of coreceptor allows survival of chronically stimulated double-negative alpha/beta T cells: implications for autoimmunity. **J. Exp. Med.**, v. 193, p.1113–1121, 2001.

HATTERER, E.; DAVOUST, N.; DIDIER-BAZES, M.; VUAILLAT, C.; MALCUS, C.; BELIN, M. F.; NATAF, S. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. **Blood**, v. 107, n. 2 p. 806-812, 2006.

IKEDA, F.A.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E; FEITOSA, M.M.; MACHADO, G.F.; Perri, S.H.V. Histological and immunohistochemical study of the central nervous system of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi. **Braz. J. Vet. Res. Anin.Sci.**, v. 44, p. 5-11, 2007.

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

KARMAN, J.; LIN, G. C.; SANDOR, M.; FABRY, Z. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 173, p. 2353-61, 2004.

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

LIMA, V. M. F.; GONÇALVES, M. E.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R., FEITOSA, M. M. Anti-*Leishmania* antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 36, p.485-489, 2003.

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

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.G.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Trop.**, v. 92, p. 43–53, 2004.

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

MÁRQUEZ, M.; PEDREGOSA, J.R.; LÓPEZ, J.; MARCO-SALAZAR, P.; FONDEVILA, D.; PUMAROLA, M. *Leishmania* amastigotes in the central nervous system of a naturally infected dog. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 25, p. 142-6, 2013.

MARRACK, P.; HANNUM, C.; HARRIS, M.; HASKINS, K.; KUBO, R.; PIGEON, M.; SHIMONKEVITZ, R.; WHITE, J.; KAPPLER, J. Antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted T cell receptors. **Immunol. Rev.**, v.76, p.131–145, 1983.

MASON, D.W.; WILLIAMS, A.F. The kinetics of antibody binding to membrane antigens in solution and at the cell surface. **Biochem. J.**, v. 187, p. 1±20, 1980.

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

MCMAHON, E.J.; BAILEY, S.L.; CASTENADA, C.V.; WALDNER, H.; MILLE, R. S.D. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. **Nat. Med.**, v.11, p. 335-9, 2005.

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

MELO, G.D.; MARCONDES, M.; VASCONCELOS, R.O.; MACHADO, G.F. Leukocyte entry into the CNS of *Leishmania chagasi* naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 162, p. 248-256, 2009.

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

MOREIRA, P.R.; BANDARRA, M. DE B.; MAGALHÃES, G.M.; MUNARI D.P.; MACHADO, G.F.; PRANDINI, M.M.; ALESSI, A.C.; DE OLIVEIRA, V.R. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral_lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.**, v. 192, p.149-57, 2013.

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

NIETO, C. G.; VIÑUELAS, J.; BLANCO, A.; GARCIA-ALONSO, M.; VERDUGO, S. G.; NAVARRETE, I. Detection of *Leishmania infantum* amastigotes in canine choroid plexus. **Vet. Rec.**, v. 139, p. 346-347, 1996.

NOLI, C. Canine leishmaniasis. **Waltham Focus**, v. 9, p. 16-24, 1999.

OLIVEIRA, F.S.; PIRMEZ, C.; PIRES, M.Q.; BRAZIL, R.P.; PACHECO, R.S. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.129, n.3-4, p.219-227, 2005.

OLIVRY, T.; DEANGELO, K.B.; DUNSTON, S.M.; CLARKE, K.B.; MCCALL, C.A. Patch testing of experimentally sensitized beagle dogs: development of a model for skin lesions of atopic dermatitis. **Vet. Dermatol.**, v. 17, p. 95-102, 2006.

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

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

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG, E. J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. **Infect. Immun.**, 67, 237-243.1999.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J. P.; RUTTEN, V.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E. J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, n. 6, p. 1594-1600, 1995.

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

PLUMB, J.; ARMSTRONG, M. A.; DUDDY, M.; MIRAKHUR, M.; MCQUAID, S. CD83-positive dendritic cells are present in occasional perivascular cuffs in multiple sclerosis lesions. **Mult. Scler.**, v. 9, p. 142-7, 2003.

PUMAROLA, M.; MOORE, P.F.; SHELTON, G.D.; Canine inflammatory myopathy: Analysis of cellular infiltrates. **Muscle & Nerve**, v.29, p. 782-789, 2004.

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

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

RUSSO, D.M.; ARMITAGE, R.J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; GRABSTEIN, K.H.; REED, S.G. Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis. **J. Immunol.**, v. 151, p. 3712-3718, 1993.

SANCHEZ, M.A.; DIAS, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; J. CONVIT, J.; TAPIA F.J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 70, p. 618–624, 2004.

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

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.D.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in

Didelphis spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Vet. Parasitol.**, v.150, n.4, p.283-290, 2007.

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

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

SERAFINI, B.; ROSICARELLI, B.; MAGLIOZZI, R.; STIGLIANO, E.; CAPELLO, E.; MANCARDI, G. L.; ALOISI, F. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 65, p. 124-41, 2006.

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

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit. Vect.**, v, 2-16, 2011.

STANLEY, A.C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol. Cell. Biol.**, v.85, n.2, p.138-147, 2006.

SUNI, M.A.; GHANEKAR, S.A.; HOUCK, D.W; MAECKER, H.T.; WORMSLEY, S.B.; PICKER, L.J.; MOSS, R.B.; MAINO, V.C. CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in

response to HCMV and HIV-1 antigens. **Eur. J. Immunol.**, v. 31, p. 2512–2520, 2001.

THOMSON, C.W., LEE, B.P., ZHANG, L. Double-negative regulatory T cells: nonconventional regulators. **Immunol. Res.**, v. 35, p. 163–178, 2006.

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

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

VILLANI, F.N; ROCHA, M.O; NUNES, M.C.; ANTONELLI, L.R.; MAGALHAES, L.M.; SANTOS, J.S.C.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Trypanosoma cruzi-induced activation of functionally distinct alphabeta and gammadelta CD4- CD8- T cells in individuals with polar forms of Chagas' disease. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 4421–4430, 2010.

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

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

WEISS, L.; ROUX, A.; GARCIA, S.; DEMOUCHY, C.; HAEFFNER-CAVAILLON, N.; KAZATCHKINE, M.D.; GOUGEON, M.L. Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated

molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. **J. Infect. Dis.**, v.178, p.1158-1162, 1998.

Weller, R.O.; Galea, I.; Carare, R. O.; Minagar, A. Pathophysiology of the lymphatic drainage of the central nervous system: Implications for pathogenesis and therapy of multiple sclerosis. **Pathophysiol.**, v. 17, p. 295-306, 2010.

ZOZULYA, A.L.; BENJAMIM, D.; CLARKSON, B.D; ORTLER, S.; FABRY, Z.; WIENDL, H. The role of dendritic cells in CNS autoimmunity. **J. Mol. Med. (Berl)**, v. 88, p. 535-544, 2010.

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

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