

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO – UFOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – CiPharma
Escola de Farmácia - Laboratório de Pesquisas Clínicas – LPC

**Estudo da maturação e das alterações
eritrocitárias e leucocitárias em cães
naturalmente infectados por
*Leishmania (Leishmania) infantum***

RONEY LUIZ DE CARVALHO NICOLATO

Ouro Preto - MG
Fevereiro de 2014

RONEY LUIZ DE CARVALHO NICOLATO

**Estudo da maturação e das alterações
eritrocitárias e leucocitárias em cães
naturalmente infectados por
*Leishmania (Leishmania) infantum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Ouro Preto, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: *Dr. Alexandre Barbosa Reis*

Co-orientador: *Dra. Cláudia Martins Carneiro*
Laboratório de Pesquisas Clínicas, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Ouro Preto.

**Ouro Preto – MG
Fevereiro de 2013**

N638e Nicolato, Roney Luiz de Carvalho.
Estudo da maturação e das alterações eritrocitárias e leucocitárias em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* [manuscrito]
Roney Luiz de Carvalho Nicolato. – 2014.
64 f.: il. color., grafôs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia.

Área de concentração: Fârmacos, Medicamentos e Vacinas.

I. Leishmaniose Visceral - Teses. 2. Eritropoese - Teses. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Carneiro, Cláudia Martins. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



UFOP
Universidade Federal
de Ouro Preto



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia



Sessão de defesa da 1ª tese do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, que conferiu o grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas a RONEY LUIZ DE CARVALHO NICOLATO com a defesa da tese intitulada: “Estudo da maturação e das alterações eritrocitárias e leucocitárias em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*”, avaliada e aprovada pela banca examinadora abaixo:

Ouro Preto, 24 de fevereiro de 2014.

Prof.ª. Dr.ª. Angélica Alves Lima
UFOP

Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado
UFOP

Dr.ª. Andréa Teixeira de Carvalho
FIOCRUZ

Prof. Dr. Lauro Melo Vieira
UFMG

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis
UFOP

Colaboradores:

Dra. Maria das Graças Carvalho (UFMG/MG)

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti (UFMG/MG)

Dra. Denise Silveira Lemos (UFMG/MG)

Dr. Wendel Coura-Vital (UFMG/MG)

Dra. Leoneide Erica Maduro Bouillet (UFOP/MG)

Dr. Laser Antônio Machado de Oliveira (UFOP/MG)

Dr. Bruno Mendes Roatt (UFOP/MG)

Ms. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar-Soares (UFOP/MG)

Ms. Levi Eduardo Soares Reis (UFOP/MG)

Ms. Raquel Trópia de Abreu (UFOP/MG)

Instituições Parcerias:

Universidade Federal de Minas Gerais

Suporte Financeiro:

CNPq - Ed. Universal (472554/2007-7)

FAPEMIG - Ed. Universal (CBB - APQ-3073-4.01/07)

DECIT/MS/CNPq/BR/ - (576062/2008-1)

PPSUS/MS/CNPq/FAPEMIG/SES-MG

Dedico este trabalho à minha querida esposa Maria Isabel e aos meus filhos André, Maria Fernanda, Bruno e Thiago (saudades), sem os quais não teria alcançado este êxito. E aos meus pais José Nicolato e Guiomar de Carvalho Nicolato (com saudades), aos meus irmãos, sobrinhos, à nora Aline e à sogra Elza.

À proteção divina, sem a qual não teria alcançado esta vitória na execução deste trabalho.

Ao Dr. Alexandre Barbosa Reis, meu ex-aluno, colega e orientador, pelo acolhimento, respeito e dedicação (verdadeiro orientador). Sou grato eternamente.

À Dra. Claudia Martins Carneiro, ex-aluna, colega e co-orientadora, que sempre me acompanhou em todas as jornadas, meu obrigado.

Ao Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC), minha segunda casa, onde vi fortalecer e consolidar todos os sonhos.

À Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, onde tudo começou, obrigado.

À Universidade Federal de Ouro Preto, obrigado.

Aos colaboradores neste trabalho, em especial Levi Eduardo Soares Reis, Wendel Coura-Vital e Bruno Mendes Roatt, também ex-alunos e colegas, pelo apoio, dedicação e atenção especial.

Aos alunos, colegas e amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC).

Aos funcionários do LAPAC, sem distinção.

Ao farmacêutico Cássio Zumerle Masioli, pelo compromisso, zelo e lealdade.

Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas, pelo companheirismo e respeito, em especial aos professores Dra. Marta de Lana, Dr. Luiz Fernando Teixeira de Medeiros e Dra. Maria Ruth Gonçalves Gaede Carrillo por saberem ouvir e lutar pela profissão, e Dra. Carmen Aparecida de Paula pela oportunidade.

Ao Dr. George Lins Machado Coelho pelo respeito, amizade e por acreditar em mim com seus vários projetos.

Aos professores Dra. Cláudia Aparecida Marlière de Lima, Dra. Olívia Maria de Paula Alves Bezerra e Dr. Camilo Adalton Mariano da Silva da Escola de Nutrição, UFOP, companheiros parceiros de longa data.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (CiPharma) pela paciência, compreensão e acolhimento, em especial aos professores Dr. Rômulo Leite e Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.

A todas as secretárias da Escola de Farmácia, com quem permeei os percalços de um serviço público, sempre atentas aos meus anseios.

Ao José Coppoli Sobrinho, meu amigo e parceiro. Sempre presente na minha caminhada.

Ao meu amigo Vicente Gomes Pinto Coelho pela seriedade, pontualidade e coleguismo nos estudos.

Ao casal de amigos José Geraldo e Zilda Barros.

Ao casal Genival e Alice Alves Ramalho, e seus filhos, pela alegria que pude compartilhar.

Ao amigo Rui de Almeida, em Bom Jesus do Itabapuana, onde começamos nossa empreitada.

Ao Péricles e a esposa Micheline Nogueira pela confiança.

Ao Emanuel Breyner e Irmãos pela dignidade, correção que sempre me inspiraram.

Ao Dr. Jarbas Lima Dias a sua esposa Luiza e filhas Marília e Anastácia, pela recepção em seu apartamento no Rio de Janeiro.

Aos amigos do Bairro Esplanada de Ponte Nova.

Ao casal Ivo e Dalva Lima e seus filhos pela distinção.

A todos os ex-alunos da Escola de Farmácia pelo convívio, grande amizade e homenagens ao longo destes anos.

À minha infância vivida em “Bituruna” com plena liberdade e à minha primeira professora Belmira de Souza (Miroca).

À minha juventude na Rua Talco (hoje Rua Juiz Costa Val), ao colégio Anchieta e ao cursinho CB2 em Belo Horizonte.

À minha turma de graduação na Escola de Farmácia, UFOP, pela união (desde 1973) demonstrada até hoje.

À cidade de Ponte Nova, onde vivi parte da minha vida profissional, e ao Dr. Salvador Real Neto e ao Vereador José Mauro Raimundi, meus conselheiros, dos quais não esqueço. Ao José Carlos Dias meu primeiro Contador.

À cidade de Ouro Preto pela cidadania da qual me orgulho e o convívio nessa grande temporada aqui passada.

“Amigo é aquele que sabe tudo a seu respeito, e, mesmo assim, ainda gosta de você.”

Kin Hubbard

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
2 OBJETIVOS	11
2.1 - <i>Objetivo Geral</i>	12
2.2 - <i>Objetivos Específicos</i>	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 – <i>Desenho experimental</i>	14
3.2 - <i>Animais - seleção e caracterização clínica</i>	14
3.3 - <i>Coleta de sangue</i>	15
3.4 - <i>Aspiração da medula óssea</i>	15
3.5 - <i>Análise do mielograma</i>	16
3.6 - <i>Avaliação da carga parasitária</i>	16
3.7 - <i>Análises estatísticas</i>	16
4 RESULTADOS	18
4.1- <i>Alterações nos parâmetros hematológicos de cães infectados por L. infantum nos diferentes grupos clínicos</i>	19
4.2 - <i>Alterações na celularidade da série eritropoética em cães infectados por L. infantum nos diferentes grupos clínicos</i>	20
4.2.1 - <i>Alterações eritropoéticas na medula óssea</i>	20
4.2.2 - <i>Avaliação entre o perfil de células da série eritróide e alterações no sangue periférico de cães infectados por L. infantum</i>	21
4.3 - <i>Alterações na celularidade da série leucopoética em cães infectados por L. infantum nos diferentes grupos clínicos</i>	22
4.3.1 - <i>Alterações leucopoéticas na medula óssea</i>	22
4.3.2 - <i>Avaliação entre o perfil de células da série granulocítica e alterações no sangue periférico</i>	23
4.3.3 - <i>Avaliação entre o perfil de células da série agranulocítica e alterações no sangue periférico</i>	24
4.4 - <i>Achados citológicos na medula óssea</i>	25
4.5 – <i>Avaliação da carga parasitária na medula óssea de cães naturalmente infectados por L. infantum</i>	27
4.5.1 - <i>Alterações na celularidade da medula óssea de cães infectados por L. infantum nas diferentes densidades parasitárias</i>	27
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÃO	39

6.1 – <i>Conclusão</i>	40
7 PERSPECTIVAS	41
7.1 - <i>Perspectivas</i>	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

BFU-E – Unidade formadora de progenitores eritróides
BFU-MK - Unidade formadora de progenitores megacariócitos
CA-I - Cães assintomáticos soronegativo/PCR⁺
CA- II - Cães assintomáticos soropositivo/PCR⁺
CD14 - Marcador de superfície celular de monócitos e granulócitos
CD5⁺ - Marcador de superfície celular de linfócitos T
CFU - Eo - Unidade formadora de colônia de eosinófilos
CFU- G - Unidade formadora de colônia de granulócitos
CFU-B - Unidade formadora de colônia de linfócitos B
CFU-Ba - Unidade formadora de colônia de basófilos
CFU-E - Unidade formadora de colônia eritróide
CFU-GEMM - Unidade formadora de colônia de granulócitos-eritrócitos-monócitos-macrófagos
CFU-GM - Unidade formadora de colônia de granulócitos-macrófagos
CFU-L - Unidade formadora de colônia de linfócitos
CFU-M - Unidade formadora de colônia de monócitos
CFU-MK - Unidade formadora de colônia de megacariócitos
CFU-S - Unidade formadora de colônia - baço
CFU-T - Unidade formadora de colônia de linfócitos T
CNI – Cães não infectados
CO – Cães oligossintomáticos
CS - Cães sintomáticos
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
ELISA - Ensaio imunoenzimático
FLT3L - Fator ligante
G-CSF – Fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF - Fator estimulante de colônias de granulócitos-monócitos
IL - Interleucina
LDU - *Leishman Donovan Units*
LPC – Laboratório de Pesquisas Clínicas
LV – Leishmaniose Visceral
LVC – Leishmaniose Visceral Canina
OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*

qPCR - PCR em tempo real

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

SDF-1- fator derivado do estroma

SRD – Sem raça definida

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

Figura 1: Esquema de diferenciação das células hematopoéticas.	7
Figura 2: Perfil das células da série eritróide em cães naturalmente infectados com <i>L. infantum</i>	20
Figura 3: Correlação entre as células da série eritróide e os parâmetros hematológicos (eritrócitos-RBC, hemoglobina-Hb e hematócrito-Ht) considerando todos os grupos de cães infectados com <i>L. infantum</i>	21
Figura 4: Perfis dos precursores de células da linhagem granulocítica em cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> categorizados de acordo com as formas clínicas.....	22
Figura 5: Correlação entre parâmetros celulares na medula óssea (células precursoras da linhagem granulocítica) e sangue periférico (com células).....	23
Figura 6: Perfil celular da série agranulocítica na medula óssea de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i>	24
Figura 7: Análise citológica de medula óssea canina.....	26
Figura 8: Contagem celular da série eritroblástica nas diferentes densidades parasitárias.	28
Figura 9: Contagem celular da série granulocítica nas diferentes densidades parasitárias.	29
Figura 11: Contagem celular da série granulocítica eosinofílica nas diferentes densidades parasitárias.	30
Figura 12: Contagem celular da série agranulocítica nas diferentes densidades parasitárias.....	31

Tabela 1: Avaliação de parâmetros hematológicos em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e em cães não infectados. 19

Análises hematológicas apresentam aplicações limitadas para o diagnóstico da doença em cães infectados com *L. infantum*, mas podem ser importantes para a avaliação das formas clínicas da doença e para a compreensão da evolução da patogênese leishmaniose visceral canina (LVC). Recentemente, foi demonstrado que alterações na leucopoese e eritropoese estão relacionadas com o estado clínico e densidade parasitária da medula óssea em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Para melhor caracterizar estas alterações, no presente estudo foi avaliada a associação entre os parâmetros hematológicos na medula óssea e alterações do sangue periférico em grupos de cães infectados por *L. infantum*: Cães assintomáticos I (CA-I: soro negativo/PCR+; n=6), assintomáticos II (CA- II: soro/PCR+; n=7), oligossintomáticos (CO; n=8), e cães sintomáticos (CS; n=12) e cães não infectados (CNI; n=7). A densidade parasitária foi avaliada na medula óssea e os resultados expressos como “*Leishman Donovan Units*” (LDU), e classificados em tercís como baixo (BP, n=7) ou alto (AP, n=7) parasitismo. No grupo CS foi encontrado uma diminuição na linhagem eritropoética com reduções concomitantes em eritrócitos circulantes, bem como nos parâmetros de hemoglobina e hematócrito, resultando em anemia. Neste mesmo grupo CS também observou-se aumento de precursores de neutrófilos e eosinófilos porém com diminuição de bastonetes neutrófilos e eosinófilos circulantes, levando a leucopenia no sangue periférico. No grupo CA-II, foi detectada uma linfocitose que ocorreu tanto no sangue periférico como no compartimento da medula óssea. O grupo CS exibiu linfocitose na medula óssea, com linfopenia no sangue periférico. Em contraste, o grupo CA- I, não apresentaram alterações significativas sugestivas de LVC, apresentando contagens normais tanto na medula óssea como no sangue periférico. A avaliação do impacto do parasitismo na medula óssea mostrou resultados similares quando se avaliou os cães classificados em diferentes formas clínicas, tais como, hipoplasia eritróide, hipoplasia eosinofílica e proliferação de células precursoras neutrofílica no grupo de cães com alto parasitismo. Os nossos resultados mostram pela primeira vez que importantes alterações na hematopoiese e parâmetros hematológicos (hemograma) podem ocorrer durante o curso de LVC em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, principalmente na doença sintomática. Tomados em conjunto, os nossos resultados com base nos parâmetros do mielograma e hemograma permitem uma melhor compreensão da patogênese da anemia, linfocitose e linfopenia, bem como a leucopenia (eosinopenia e monocitopenia), que contribuem para o prognóstico e monitoração da LVC.

Palavras chave: Leishmaniose Visceral Canina, mielograma, hemograma, eritropoese e leucopoese.

Hematological analysis has limited applications for disease diagnosis in *Leishmania infantum*-infected dogs, but it can be very important in evaluating the clinical forms of the disease and in understanding the evolution of canine visceral leishmaniasis (CVL) pathogenesis. Recently, we demonstrated that alterations in leucopoiesis and erythropoiesis are related to clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *L. infantum*. To further characterize these alterations, we evaluated the association between the hematological parameters in bone marrow and peripheral blood alterations in groups of *L. infantum*-infected dogs: asymptomatic I (AD-I: serum negative/PCR+), asymptomatic II (AD-II: serum/PCR+), oligosymptomatic (OD), and symptomatic (SD). Results were compared with those from noninfected dogs (NID). The parasite density was assessed in the bone marrow and the results expressed as "Leishman Donovan Units" (LDU), and classified into tertiles as low (LP, n = 7) or high (HP, n = 7) parasitism. The SD group was found to present a decrease in erythropoietic lineage with concomitant reductions in erythrocytes, hemoglobin, and hematocrit parameters, resulting in anemia. The SD group also had increased neutrophils and precursors and decreased band eosinophils and eosinophils, leading to peripheral blood leucopenia. In the AD-II group, lymphocytosis occurred in both the peripheral blood and the bone marrow compartments. The SD group exhibited lymphocytosis in the bone marrow, with lymphopenia in the peripheral blood. In contrast, the AD-I group, showed no significant changes suggestive of CVL, presenting normal counts in bone marrow and peripheral blood. The evaluation of the impact of parasitism in the bone marrow showed similar results when assessing dogs classified in different clinical forms, such as erythroid hypoplasia, hypoplasia eosinophilic and neutrophilic proliferation of precursor cells in the group of dogs with high parasitism. Our results showed for the first time that important changes in hematopoiesis and hematological parameters occur during ongoing CVL in naturally infected dogs, mainly in symptomatic disease. Taken together, our results based on myelogram and hemogram parameters enable better understanding of the pathogenesis of the anemia, lymphocytosis, and lymphopenia, as well as the leucopenia (eosinopenia and monocytopenia), that contribute to CVL prognosis.

Key Words: Canine visceral leishmaniasis, myelogram, hemogram, erythropoiesis and leucopoiesis.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 - Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral Canina

As leishmanioses são doenças negligenciadas que, segundo a Organização Mundial de Saúde, possuem uma incidência de aproximadamente 1,6 milhões de casos por ano em todo o mundo. Com relação a LV, sabe-se que 59.000 pessoas morrem anualmente da doença e sua incidência é cerca de 500.000 casos/ano (Desjeux 2004; WHO 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) agrupa as leishmanioses nas seguintes formas clínicas: (i) leishmaniose cutânea, que provoca o aparecimento de ulcerações na pele; (ii) leishmaniose cutâneo-mucosa, caracterizada como uma doença mutiladora que causa deformidades irreversíveis, principalmente na face dos pacientes; (iii) leishmaniose cutâneo-difusa, responsável por lesões nodulares não ulcerativas disseminadas em todo o corpo e (iv) leishmaniose visceral (LV), a forma mais grave, que pode evoluir para o óbito quando não tratada (Reithinger *et al.*, 2007; WHO 2010).

A Leishmaniose Visceral é uma doença infecto-parasitária, causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani*, transmitida por dípteros da família Phychodidae, subfamília Phlebotominae, especialmente os do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. (Killick-Kendrick 1999).

A importância do cão no contexto de LV tem sido estudada a mais de um século, desde 1908, quando Nicolle & Comte, na Tunísia, observaram a presença de formas amastigotas do parasito na medula destes animais, sugerindo que os mesmos participariam da cadeia de transmissão do parasito como reservatórios (Alves 2006). Atualmente, o cão doméstico (*Canis familiares*) é considerado o principal reservatório do parasito no ciclo urbano por apresentar alta prevalência da doença (Coura-Vital *et al.*, 2011) bem como elevada carga parasitária na pele, tornando-o uma considerável fonte de infecção para o vetor (Molina *et al.*, 1994). Neste contexto, o cão tem um papel essencial para disseminação e amplificação dos focos endêmicos, geralmente antecedendo, o aparecimento de casos humanos (Falqueto *et al.*, 1986; Nunes *et al.*, 2010).

A leishmaniose visceral canina (LVC), assim como a LV humana (LVH) apresenta-se como uma doença complexa, caracterizada por amplo espectro de manifestações clínicas e variados graus de gravidade. Esta complexidade faz com que, ainda hoje, mais de cem anos após sua descoberta, não haja completo consenso

científico sobre o seu manejo (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011). Diversos fatores estão associados ao perfil de resistência e susceptibilidade destes animais para desenvolver ou não a doença em suas distintas formas clínicas (assintomática e sintomática), respectivamente. A idade, sexo, nutrição, genética, comorbidades, carga parasitária, virulência da cepa de *L. infantum* e infecções anteriores e concomitantes, certamente contribuem para o aparecimento e expressão das manifestações clínicas da forma ativa da LVC (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009).

No cão, a LVC produz um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas, como consequência do parasitismo das células do sistema mononuclear fagocitário. A presença da *Leishmania* nos órgãos e tecidos, associada à resposta imune do cão, determina reações inflamatórias que produzem as lesões e sinais clínicos característicos da doença (Alvar *et al.*, 2004; Reis *et al.*, 2006a). Neste contexto, a doença no cão pode permanecer assintomática por um longo período, evoluindo inclusive para a autocura em um percentual estimado de 30% dos cães assintomáticos (Grimaldi *et al.*, 2012) ou evoluir para a forma grave, podendo levar o animal a óbito (Mancianti *et al.*, 1988; Garg *et al.*, 2006).

As formas clínicas clássicas da LVC são: (i) assintomática, caracterizada pela ausência de sinais clínicos, (ii) oligossintomática, na qual os animais apresentam até três sinais clínicos não debilitantes da doença e (iii) sintomática, onde os cães apresentam mais de três sinais clínicos sugestivos da doença (Mancianti *et al.*, 1988; Reis *et al.*, 2006a; Reis *et al.*, 2009). Recentemente Coura-Vital *et al.* (2011) propôs uma reclassificação da forma clínica assintomática, dividindo esta forma clínica em dois subgrupos, de acordo com os resultados sorológicos (ELISA) e moleculares (PCR) em: cães assintomáticos-I (CA-I) correspondente aos cães soronegativos e PCR positiva e cães assintomático-II (CA-II) animais com resultados de sorologia e PCR positivo.

Os sinais clínicos iniciais e mais frequentemente encontrados na LVC são: hipertrofia de linfonodos periféricos (Linfonodos poplíteo e submandibulares), dermatite periorbital e nasal, pelagem opaca, onicogribose e edema das patas. Outros sinais, como febre, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, perda de peso, hepatoesplenomegalia, ulceração cutânea (nariz, orelhas e cauda) e conjuntivite são frequentes, embora não necessariamente presentes em todos os animais. Além disto, animais com doença ativa e grave ainda podem apresentar: paresia das patas posteriores,

emagrecimento acentuado e caquexia, hemorragias graves, infecções intestinais, pulmonares e insuficiência renal completando os quadros mais graves que geralmente evoluem ao óbito (Almeida *et al.*, 2005; Baneth *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2009).

No contexto das alterações laboratoriais no âmbito do quadro bioquímico e hematológico, observadas em cães naturalmente infectados com *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas, principalmente da forma sintomática incluem: anemia normocítica e normocrômica, leucopenia, trombocitopenia, elevação das proteínas totais com hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia e alterações nas enzimas hepatocelulares (alanina amino transferase e aspartato amino transferase) (Abranches *et al.*, 1991; Genaro, 1993; Reis *et al.*, 2006).

Alguns autores buscam explicações da origem destas alterações hematológicas. Desta forma, uma parte deles afirma que estas alterações estão muitas vezes associadas às disfunções medulares tais como a displasia e aplasia (Diebold *et al.*, 2000; Weiss, 2006). Sabe-se que a medula óssea é considerada um dos maiores órgãos do corpo, sendo o principal órgão hematopoético (Lund, 2000) e durante a infecção por *Leishmania*, torna-se um órgão-alvo, devido à dinâmica do parasito, tornando-a um importante local de replicação e conseqüentemente armazenamento de parasitos (amastigotas) em cães infectados.

Apesar de pouco abordado, hematologistas e parasitologistas relataram a ocorrência de hiperplasia de determinados precursores como, granulócitos neutrófilos proporcionando um aumento da relação mielóide:eritróide (M:E) durante o curso da leishmaniose visceral. Outras alterações descritas como aumento na população de monócitos e macrófagos e a elevação no número de plasmócitos e células de Mott, parecem indicar uma estimulação antigênica associada à infecção medular (Anosa & Idowu, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1983).

Alterações patológicas da medula óssea na LVC foram descritas como sendo associadas tanto a série vermelha (eritrofagocitose, hipoplasia e displasia eritróide), quanto a série branca (hiperplasia mieloide, neutrofílica e eosinofílica) (Foglia *et al.*, 2006).

1.2 – Hematopoese: A formação do sangue em vertebrados mamíferos

Em vertebrados, a produção no sangue das células-tronco é realizada pela alocação e especiação de distintas células embrionárias em variedade de sítios que mudam durante o desenvolvimento (Galloway e Zon, 2003). Nos mamíferos, o local sequencial da hematopoese inclui o saco vitelino, uma área ao redor da aorta dorsal denominada de região aorta-gônada mesonefros (AGM), o fígado fetal e finalmente a medula óssea. Recentemente a placenta tem sido reconhecida também como local que participa durante a AGM para o período de fígado fetal.

A fase inicial de produção de sangue em mamíferos no saco vitelino é denominada fase primitiva, tendo como principal função hematopoética a produção de eritrócitos, que facilita a oxigenação do tecido embrionário que rapidamente se desenvolve. O marcador de expressão de células eritróides no embrião é a globina proteica. O sistema primitivo da hematopoese é transitório, sendo rapidamente substituído pela hematopoese tipo-adulto, que é denominada fase definitiva onde a medula óssea passa a assumir o papel fundamental da hematopoese.

Segundo Gasper *et al.* (2000), no sistema hematopoético existem as células tronco hematopoéticas, células precursoras, as células maduras e o microambiente, que se localizam nas cavidades medulares dos ossos chatos e longos, baço, fígado, linfonodo e timo. Sendo que, é o microambiente que reconhece e retêm as células-tronco e fornece, além disto, fatores e mediadores celulares, como as citocinas, que são necessárias para a proliferação, diferenciação e maturação das células-tronco (Travlos *et al.*, 2006b). Assim, estes fatores ou mediadores de proliferação, diferenciação e maturação celulares são responsáveis em orquestrar toda hematopoese até o fim do processo de maturação celular seja da linhagem eritróide ou mielocítica.

Assim, a hematopoese inicia-se com uma célula - tronco pluripotente, que além de auto renovar, dá origem a outras linhagens celulares. As células-tronco são escassas, pois se encontram em uma proporção na ordem de 1 para 20 milhões de células nucleadas da medula óssea. Ao exame imunológico e imunofenotípico são determinadas pela marcação de $CD34^+/CD38^-$, residem em nichos especializados e possuem aparência de um linfócito pequeno ou médio embora tenha o fenótipo exato ainda desconhecido. Posteriormente, as células-tronco passam por uma etapa de progenitores hematopoéticos comprometidos, para uma linhagem mielóide ou para a linhagem

linfóide. O termo “progenitores hematopoéticos comprometidos” ou “comprometimento celular” significa que a célula progenitora iniciou o processo de diferenciação (Hoffbrand *et al.*, 2013).

O fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF) é responsável pela mobilização das células da medula em atravessar o endotélio vascular, já o processo de volta parece depender de um determinado gradiente quimiocinético, no qual o fator derivado do estroma (SDF-1) tem papel crítico (Hoffbrand *et al.*, 2013).

Segundo Hoffbrand *et al.* (2013), os fatores de crescimento compartilham várias propriedades e agem em diferentes etapas da hematopoese como: em glicoproteínas que agem em concentrações mínimas, geralmente são produzidas por muitos tipos de células, e que em geral afetam mais de uma linhagem. Além disto, estes fatores possuem interações sinérgicas ou aditivas com outros fatores de crescimento, em muitas das vezes agem no equivalente neoplásico da célula normal, possuem ações múltiplas na proliferação, diferenciação, maturação, ativação funcional e prevenção da apoptose de células progenitoras. Dentre os fatores destacam-se SCF (fator estimulante de colônias), FLT3L (fator ligante) e o VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) que agem nas células-tronco pluripotentes. Além disso, os fatores IL-3, GM-CSF (fator estimulante de colônias granulocíticas e macrofágicas), IL-6, G-CSF (fator estimulador de colônias granulocíticas) e trombopoetina agem nas células progenitoras multipotentes. Já os fatores G-CSF (fator estimulador de colônias granulocítica), M-CSF (fator estimulador de colônias macrofágicas), IL-5 (CSF-eosinófilo), eritropoetina e trombopoetina agem nas células progenitoras comprometidas (Hammond *et al.*, 1990; Nash *et al.*, 1994).

De acordo com Gasper (2000), as células pluripotentes ou “*stem cells*” (CFU-S) são comuns aos elementos hemopoéticos presentes na medula óssea. Pelo fato de originarem os precursores de todas as células sanguíneas, através da formação de células progenitoras específicas, tem-se um precursor da série granulocítica/ eritróide/ monocítica/megacariocítica (CFU-GEMM) além de um precursor para a série linfóide (CFUL).

A célula progenitora CFU-GEMM originará os precursores para cada uma das séries hematopoéticas como mostrado na Figura 1, a saber:

- Formação de BFU-E e CFU-E que originará células precursoras da eritropoese e finalmente os eritrócitos;

- Formação de BFU-MK e CFU-MK que originará megacarioblasto, megacariócitos e plaquetas;
- Formação de CFU-GM e CFU-M que originará monoblastos e monócitos;
- Formação de CFU-GM e CFU- G (neutrófilo), CFU - Eo (eosinófilo) e CFUBa (basófilo) que originará mieloblastos, promielócitos, células precursoras dos granulócitos e finalmente os granulócitos;
- A célula progenitora CFU-L originará os precusores CFU-T e CFU-B, prólinfócito T e B e, posteriormente, linfócitos T e B.

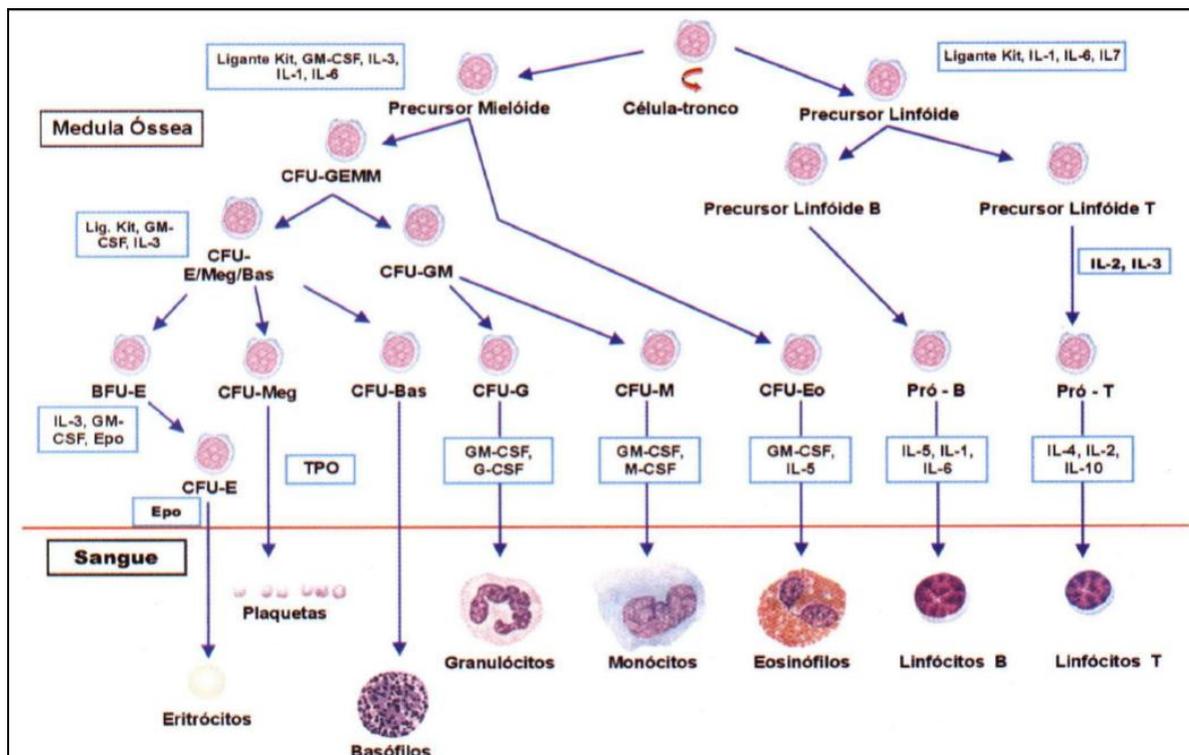


Figura 1: Esquema de diferenciação das células hematopoiéticas.

Desta forma, sabe-se que cada etapa da mielopoese pode ser influenciada por fatores estimulatórios, tais como, citocinas, por exemplo: IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 e o GM-CSF (fator estimulante de colônias granulocíticas e macrófágicas), que são significativos para a maturação dos polimorfonucleares, macrófagos, basófilos e eosinófilos. A IL-7 exerce um papel importante para o amadurecimento dos linfócitos B e T. Similarmente, G-CSF atua nos estágios iniciais e tardios da granulopoese (Hammond *et al.*, 1990).

Já é estabelecido que alguns determinantes como: restrição alimentar, desnutrição, inflamação crônica, ações tóxicas, distúrbios neoplásicos e proliferativos, influem diretamente no sistema hematopoético (Reagan *et al.*, 1993; Weiss 2000).

1.3 – Hematopoese e seus reflexos na LVC

Há pouquíssima informação na literatura sobre a celularidade da medula óssea em determinadas doenças infecciosas de acometimento sistêmico e medular como é o caso da leishmaniose visceral seja humana ou canina. Até o presente momento, as alterações mielopoéticas em cães naturalmente infectados por *L. infantum* ainda não estão totalmente esclarecidas e certamente este conhecimento auxiliará para uma melhor compreensão da patogênese da anemia e leucopenia observada durante o agravamento seja da doença canina ou humana. Mais recentemente, alguns poucos trabalhos disponíveis surgiram na literatura que buscaram avaliar as alterações patológicas nesse órgão durante a evolução da LVC em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Porém pouco se conhece ainda as repercussões e consequências das alterações medulares *versus* as alterações hematológicas periféricas na leishmaniose visceral canina pela infecção natural por *L. infantum*.

Recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a avaliação da medula óssea pode se tornar um método útil para a elaboração de um prognóstico e/ou monitoramento na LVC, bem como para o diagnóstico de casos que envolvam uma forte suspeita de LVC, porém que não foi possível ser confirmada por testes sorológicos (Trópia de Abreu *et al.*, 2011). Neste trabalho, Trópia de Abreu *et al.*, (2011) demonstraram o impacto do estado clínico e da densidade parasitária sobre a atividade hematopoiética durante a LVC em animais soropositivos.

Dentre os principais resultados demonstrados no estudo acima destacam-se em relação à eritropoese queda de: proeritroblastos, eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos resultando em hipoplasia eritróide principalmente nos grupos CA e CS. A leucopoese apresentou algumas alterações em cães infectados. Por exemplo, células da linhagem eosinofílica mostraram uma diminuição significativa nos diferentes grupos clínicos comparado com o grupo CNI. Entretanto, células da linhagem neutrofílica mostraram alterações nos diferentes grupos clínicos, tais como um aumento significativo nos diferentes grupos clínicos. Já em relação às células mononucleares, os

autores mostram que houve aumento de linfócitos nos grupos CO e CS quando comparado com o grupo CNI. Resultados similares foram encontrados em plasmócitos mostrando clara tendência ao aumento gradual de acordo com a gravidade da infecção.. A contagem diferencial de células da medula óssea demonstrou um aumento na razão mielóide: eritróide (M:E) devido ao aumento de células granulocíticas nos diferentes grupos clínicos comparado com o grupo CNI. A avaliação parasitológica mostrou maiores índices de “*Leishmania Donovan Units - LDU*” em CS comparado com CA. Além disso, os dados demonstraram uma correlação positiva entre status clínico (CA, CO, CS) e densidade parasitária nos grupos com baixo, médio e alto parasitismo medular. Os autores mostraram que ao avaliar o impacto do parasitismo na medula óssea os resultados foram similares aos obtidos quando os cães eram classificados em diferentes formas clínicas, tais como: hipoplasia eritróide, hipoplasia eosinofílica, proliferação de células precursoras neutrofilicas, um significativo aumento no número de linfócitos e plasmócitos, destacando o grupo de cães com alto parasitismo cujos os resultados foram significativos e expressivos (Trópia de Abreu, 2010). Assim a progressão da LVC da forma clínica assintomática para sintomática foi acompanhada de parasitismo intenso na medula óssea. Além disto, os autores acreditam que a avaliação desses parâmetros constitui uma ferramenta adicional bastante útil no prognóstico da leishmaniose visceral canina, bem como no diagnóstico em duas situações específicas, a saber: a) esclarecer casos com forte suspeita de LVC, porém não confirmados por sorologia, utilizando-se do mielograma; e b) orientar exames complementares para elucidar suspeita de LVC, a partir de dados clínicos e do hemograma.

Nos últimos anos, o nosso grupo tem investigado marcadores de resistência e de susceptibilidade, especialmente em cães assintomáticos, que estão infectados porém não detectados por métodos serológicos convencionais, mas são detectados pela positividade na PCR. Estes cães apresentam uma alta prevalência em áreas urbanas (Coura-Vital *et al.*, 2011) e, apesar de não serem detectados pela sorologia convencional, são mais propensos à soroconversão (Coura-Vital *et al.*, 2013). Estes animais, aparentemente, tem um perfil de resposta imune semelhante a cães não infectados, mas a sua resposta celular é caracterizada por aumento de monócitos (CD14⁺) e de linfócitos T (CD5⁺), particularmente na subpopulação de células T CD4⁺ em relação aos cães sintomáticos (Coura-Vital *et al.*, 2011).

Diante do exposto acreditamos que a análise detalhada das alterações observadas no perfil celular de medula óssea e sua repercussão no sangue periférico resultante da infecção por *L. infantum* em diferentes formas clínicas da LVC, incluindo cães assintomáticos soronegativos/ PCR⁺ permitirá entender melhor a patogênese das alterações medulares e sanguíneas na leishmaniose visceral. Considerando o importante papel do cão no contexto mais amplo da LV e principalmente seu emprego como modelo experimental, torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos que busquem associar alterações entre o mielograma e o hemograma e que possam oferecer ferramentas de prognóstico adicional para entender a progressão clínica na LVC. Assim, o presente estudo se empenhou nesta investigação que certamente irá fornecer novos conhecimentos a luz da ciência que permitirá mergulhar e interagir com a patogênese da leishmaniose visceral canina e humana.

2 OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar o perfil da maturação celular e a celularidade das séries eritróide e leucocitóide na medula óssea e sangue periférico em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, portadores de diferentes formas clínicas.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil da celularidade da série eritróide nas diferentes formas clínicas (assintomáticos CA-I e CA-II; oligossintomáticos; sintomáticos);
- Avaliar o perfil da celularidade da série leucocitóide;
- Quantificar a densidade parasitária na medula óssea;
- Correlacionar as alterações do mielograma e hemograma com as diferentes formas clínicas e cargas parasitárias da LVC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 –Desenho experimental

No presente estudo foram utilizados quarenta cães (*Canis familiaris*), fêmeas e machos, sem raça definida (SRD), com idade variando entre 2-6 anos provenientes da área endêmica de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Os animais foram selecionados com base na positividade nos testes sorológicos (RIFI e ELISA, Biomanguinhos/Fiocruz) para *Leishmania* spp. Sete cães com resultado de titulação menores que 1:40 nos testes de ELISA e RIFI, e com resultados de PCR negativo foram consideradas cães não infectados (CNI). Um total de vinte e sete cães com um título de ELISA e RIFI maior ou igual a 1:40 foram considerados como animais soropositivos e infectados com *Leishmania* spp. Seis cães com ELISA negativo, RIFI com titulação menor que 1:40 e PCR positivo foram considerados infectados. A infecção positiva foi confirmada por PCR em amostras de pele (Degraive *et al.*, , 1994), e a identificação das espécies de *Leishmania infantum* foi determinada pela técnica de PCR-RFLP (Volpini *et al.*, 2004).

O estudo foi conduzido no período de junho de 2008 a agosto de 2009. Este trabalho, antes de ser iniciado, teve sua aprovação nos comitês de ética para o uso de animais de laboratório da Universidade Federal de Ouro Preto (CETEA / UFOP 032/2007), da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA / UFMG 020/2007) e do Comitê de Ética da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, Brasil (CEP-SMSA/PBH 001/2008).

3.2 - Animais - seleção e caracterização clínica

Vinte e sete cães sem raça definida, soro e PCR positivos, foram clinicamente classificados de acordo com Coura-Vital *et al.* (2011), considerando a presença/ausência de sinais clínicos agrupando os animais em três categorias distintas: cães sem sinais clínicos foram classificados como cães assintomáticos II (CA-II, n = 7); cães com no máximo três sinais clínicos, incluindo pelo opaco e/ou alopecia localizada, e/ou perda moderada de peso, foram classificados como cães oligossintomáticos (CO, n = 8) e cães com sinais clínicos característicos da LVC, como pelo opaco, acentuada perda de peso, onicogribose, lesões cutâneas, apatia e ceratoconjuntivite, foram classificados como cães sintomáticos (CS, n = 12). Os cães soronegativos com ausência de sinais clínicos, mas

com resultados moleculares positivos para *L. infantum* foram classificados como cães assintomáticos I (CA-I, n = 6). Animais com ausência de sinais clínicos e com os resultados sorológicos e moleculares negativos foram incluídos no grupo de cães não infectados (CNI, n = 7).

3.3 - Coleta de sangue

Um volume total de 5 mL de sangue periférico foram coletados a partir da veia braquiocefálica dos animais e transferidos para tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) para uma concentração final de 1 mg/mL. As hemácias e os leucócitos foram quantificados utilizando um contador de células automático (modelo 2800 Vet, Mindray). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por análise de pelo menos 200 leucócitos em esfregaços de sangue corados com panótico rápido por microscopia de luz.

3.4 - Aspiração da medula óssea

A coleta de medula óssea foi realizada como descrita por Penny *et al.*, (1970). Para realização deste procedimento, os animais foram tranquilizados com Cloridrato de Xilazina 2% na dosagem de 0,1 mL/kg de peso por via intravenosa, após 10 minutos foi administrado anestésico geral, Tiopental Sódico 2,5% (Thionembutal[®]; Abbott Laboratories, São Paulo, Brazil), na dose de 8 mg/kg de peso por via intravenosa.

O cão foi posicionado sentado para coleta no esterno ou em decúbito lateral para coleta na crista da tíbia e após tricotomia e antissepsia local (Polivinil Pirrolidona Iodo 10% - PVPI Tópico), uma agulha acoplada a uma seringa descartável (BD Plastipak[®], Becton Dickinson Ltda, Brasil) de 20 mL foi posicionada verticalmente na extremidade inferior do esterno ou na crista da tíbia e, por meio de movimentos rotatórios, foi exercida uma pressão até atingir a cavidade medular e, posteriormente, procedeu-se à aspiração do material medular. Um volume máximo de 0,5 mL de medula óssea foi aspirado por coleta. Imediatamente, após a retirada da agulha, uma gota do aspirado foi colocada em lâmina de vidro previamente desengordurada com éter para realização dos esfregaços, seguindo a mesma técnica dos esfregaços sanguíneos, tendo sido confeccionadas duas lâminas por animal.

3.5 - Análise do mielograma

As alterações na Leucopoese e Eritropoese foram avaliadas por contagem diferencial de 500 células da medula óssea. Na diferenciação celular, foi utilizada a classificação segundo Penny (1974) e Jain (1986).

As avaliações de esfregaços em lâminas foram feitas no microscópio Olympus Optical Co. (Tóquio, Japão, modelo CH3RF100 microscópio óptico). Para fotodocumentação das características morfológicas e alterações celulares foi realizada a captura de imagens pela microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B (Leica Microsystems-Switzerland Ltd., Heerbrugg, Suíça) e todas as imagens foram analisadas pelo *software* Leica Application Suite (versão 2.4.0 R1). Vinte imagens aleatórias (área total percorrida = $1.5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) foram determinadas como sendo suficiente para a análise representativa de uma lâmina.

3.6 - Avaliação da carga parasitária

A avaliação da densidade parasitária foi realizada nos filmes de medula óssea confeccionados como já relatado e os resultados expressos como “*Leishman Donovan Units*” (LDU index), segundo Stauber (1955), que corresponde ao número de amastigotas por 1000 células nucleadas da série leucopoética. Os resultados foram classificados em tercis como baixo (BP) ou alto (AP) parasitismo conforme Reis *et al.*, (2006c).

3.7 - Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnoff. Considerando a natureza não paramétrica de todos os conjuntos de dados, testes de Kruskal-Wallis foram utilizados para investigar diferenças entre os quatro grupos, seguido pelo teste de Dunn para comparações pareadas. Foi calculada a Correlação de Spearman para investigar associações entre mielograma e parâmetros sanguíneos periféricos, e também entre a contagem de células e os grupos clínicos. Em

todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi < 0,05.

4 RESULTADOS

4.1- Alterações nos parâmetros hematológicos de cães infectados por *L. infantum* nos diferentes grupos clínicos

A avaliação dos parâmetros hematológicos no sangue periférico demonstrou anemia severa no grupo de animais sintomáticos (CS), com uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, quando comparado aos grupos de cães não infectados, CA-I e os grupos CA-II (Tabela 1). O número de plaquetas entre os grupos apresentou pequenas oscilações não significativas. Ao analisar as células brancas do sangue, houve uma diminuição significativa no número absoluto de eosinófilos nos grupos de cães CA-II, CO e CS quando comparados com o grupo de cães não infectados (Tabela 1). Também foi observado aumento significativo dos linfócitos nos cães do grupo CA-II em relação ao grupo controle, e diminuição deste mesmo tipo celular em cães do grupo CS em relação ao grupo CA-II. O número de monócitos dos cães do grupo CS foi significativamente menor em relação ao grupo de cães não infectados.

Tabela 1: Avaliação de parâmetros hematológicos no sangue periférico em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e em cães não infectados.

Parâmetros hematológicos	Grupos clínicos				
	CN	CA-I	CA-II	CO	CS
Eritrócitos ($10^6/\text{mm}^3$)	6,8 (6,6-7,0)	7,3 (6,6-7,5)	6,2 (6,0-6,3)	5,7 (5,1-6,1)	4,1 (3,4-5,0)^{a,b,c}
Hemoglobina (g%)	16,9 (16,8-17,1)	15 (13,0-16,2)	15,4 (14,5-15,9)	13,8 (13,6-16,4)	10,5 (7,7-10,9)^a
Hematócrito (%)	49,3 (48,5-49,9)	46,1 (40,5-49,4)	42,1 (42,0-44,2)	39,9 (37,6-44,7)	29,3 (22,6-33,4)^a
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	11,4 (11,1-16,4)	13,3 (9,3-14,1)	13,8 (9,3-16,2)	12,6 (10,6-14,6)	11,7 (7,5-13,0)
Neutrófilos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	7,4 (5,2-10,6)	5,7 (3,7-9,6)	4,9 (4,3-7,4)	7,4 (5,8-10,4)	8,7 (6,5-9,7)
Neut. Bastonete ($10^3/\text{mm}^3$)	0,8 (0,5-1,0)	0,4 (0,3-0,8)	0,7 (0,3-0,9)	1,0 (0,6-1,4)	1,4 (0,8-1,7)
Neut. Segmentado ($10^3/\text{mm}^3$)	6,3 (4,9-9,5)	5,2 (2,9-9,0)	3,9 (3,7-6,6)	6,6 (5,0-8,7)	7,2 (5,2-8,2)
Eosinófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	2,2 (1,5-2,5)	1,4 (1,1-2,1)	0,4 (0,2-1,0)^a	0,7 (0,4-1,2)^a	0,2 (0,1-0,8)^a
Linfócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	2,4 (1,4-2,7)	2,4 (1,9-4,0)	3,8 (3,3-5,5)^a	3,2 (2,2-3,9)	1,4 (0,8-2,1)^c
Monócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	1,3 (1,0-1,6)	1,0 (0,6-1,5)	1,0 (0,6-1,4)	0,6 (0,5-1,1)	0,5 (0,4-0,7)^a
Plaquetas ($10^5/\text{mm}^3$)	1,9 (1,3-2,7)	2,3 (2,0-2,7)	1,9 (1,4-2,1)	2,0 (1,9-2,1)	1,7 (1,4-2,2)

Os resultados são apresentados como a mediana e intervalos interquartis. CNI, cães não infectados; CA-I, cães assintomáticos I; CA-II, cães assintomáticos II; CO, cães oligossintomáticos; CS, cães sintomáticos. As letras a, b e c mostram diferenças significativas ($p < 0,05$) em comparação com os grupos CNI, CA-I e CA-II, respectivamente.

4.2 - Alterações na celularidade da série eritropoética em cães infectados por *L. infantum* nos diferentes grupos clínicos

4.2.1 - Alterações eritropoéticas na medula óssea

A avaliação dos parâmetros relacionados com as células da série vermelha na medula óssea demonstrou uma diminuição no número de proeritroblastos nos grupos CA-II e CS, quando comparados com o grupo de cães não infectados (Figura 2). Além disso, foram observadas diminuição nas contagens de eritroblastos basófilos no grupo CS em comparação com os grupos de cães CNI e CA-I. Também foram observadas menores contagens significativas nas fases finais da linhagem eritropoética (eritroblastos ortocromáticos) ao analisar o grupo CS, quando comparado com os grupos CNI, CA-I e CO (Figura 2).

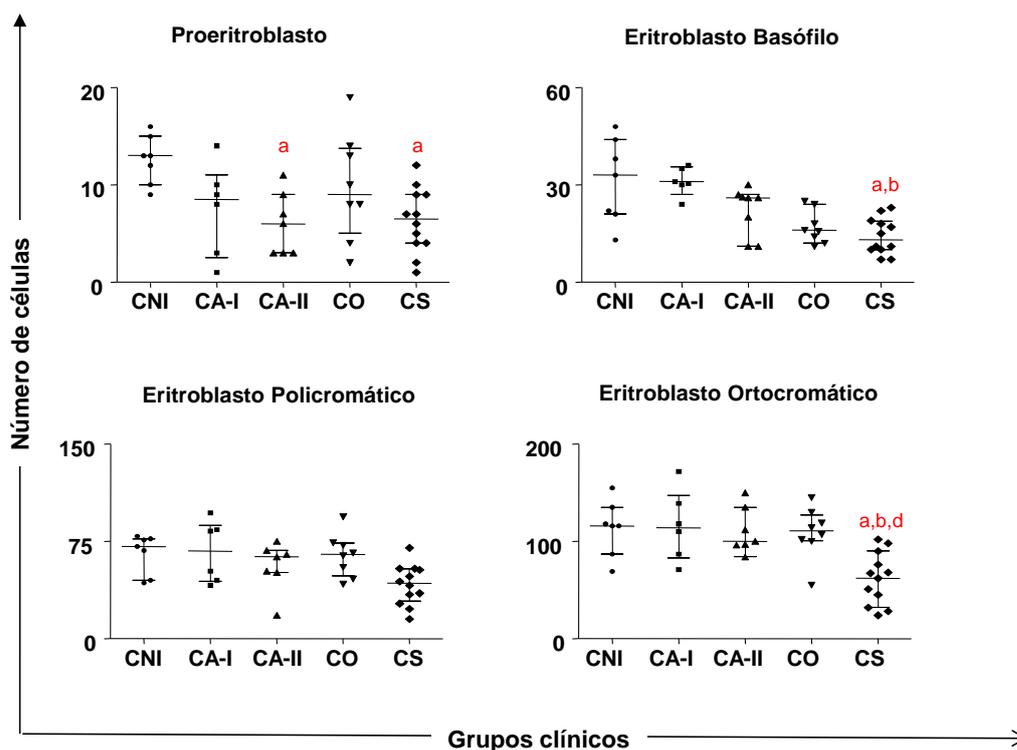


Figura 2: Perfil das células da série eritróide em cães naturalmente infectados com *L. infantum*. Os animais foram categorizados de acordo com as formas clínicas, divididos nos seguintes grupos: cães não infectados (CNI, n=7), assintomático I (CA-I, n=6), assintomático II (CA-II, n=7), oligossintomático (CO, n=8), sintomático (CS, n=12). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a, b, d” relacionadas aos grupos CNI, CA-I e CO, respectivamente. Os resultados foram expressos pela dispersão dos valores individuais e são também demonstrados os valores da mediana e intervalo interquartil.

4.2.2 - Avaliação entre o perfil de células da série eritróide e alterações no sangue periférico de cães infectados por *L. infantum*

Para avaliar se o distúrbio na medula óssea durante a LVC reflete em alterações das células do sangue periférico, foi realizada uma análise envolvendo a contagem total de proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos e os parâmetros hematológicos [eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) obtido no eritrograma - Figura 3]. Nossos dados demonstraram uma correlação positiva entre os eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromático com parâmetros sanguíneos periféricos (RBC, Hb e Ht) em todos os grupos de cães infectados por *L. infantum* (Figura 3). Não foi observada nenhuma correlação significativa entre proeritroblastos em relação os parâmetros hematológicos avaliados (dados não mostrados).

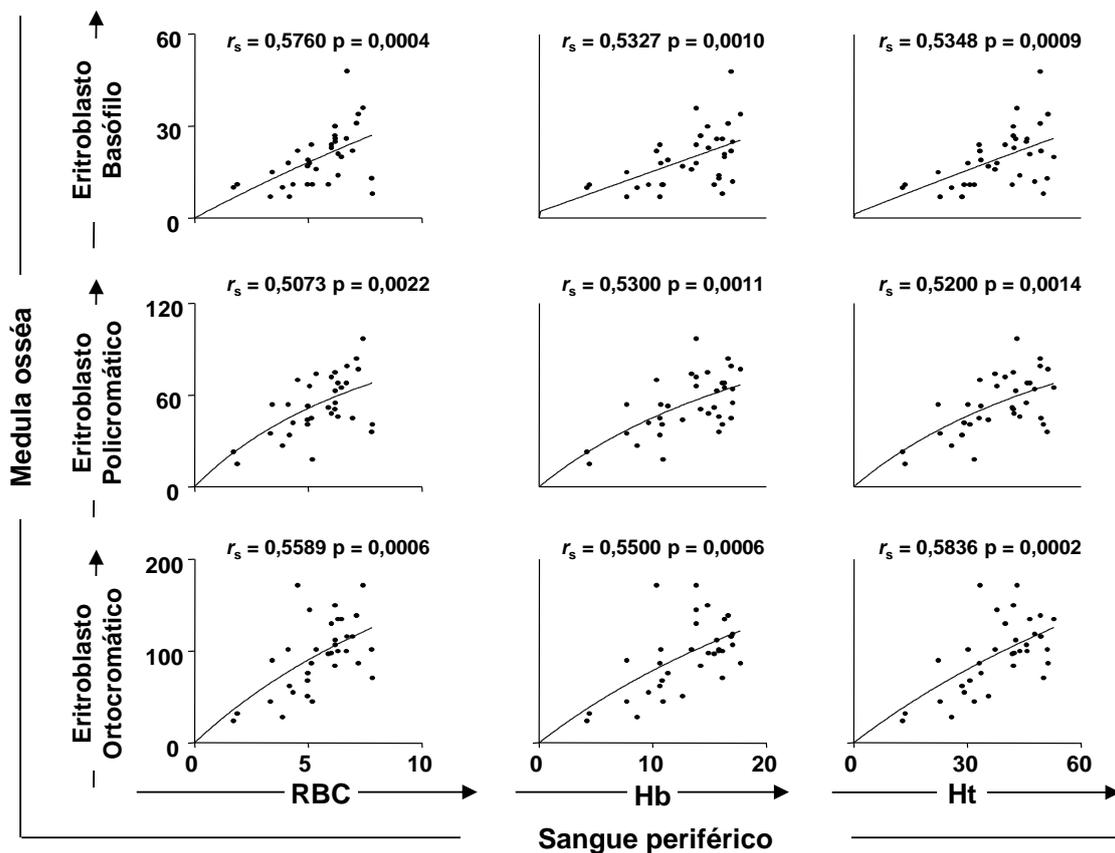


Figura 3: Correlação entre as células da série eritróide e os parâmetros hematológicos (eritrócitos-RBC, hemoglobina-Hb e hematócrito-Ht) considerando todos os grupos de cães infectados com *L. infantum*. Os resultados são expressos como valores de dispersão individuais. Índices de correlação de Pearson (r e os valores de p) são mostrados nos gráficos.

4.3 - Alterações na celularidade da série leucopoética em cães infectados por *L. infantum* nos diferentes grupos clínicos

4.3.1 - Alterações leucopoéticas na medula óssea

Foram observadas algumas alterações na série granulocítica de cães infectados por *L. infantum* (Figura 4). Neste sentido, a série neutrofílica exibiu contagens significativamente aumentadas em: (i) mielócitos neutrófilos no grupo de cães CS em comparação com os grupos CNI, CA-I e CA-II; (ii) metamielócitos neutrófilos no grupo CS em comparação com os grupo CNI e CA-I; e (iii) neutrófilos bastonetes no grupo CS quando comparados com o grupo de cães CNI (Figura 3 - painel B). Além disso, uma correlação positiva entre o curso clínico da LVC e estes precursores de neutrófilos (Figura 3 - painel B). Ao analisar a série dos precursores eosinofílicos, foram observadas reduções significativas nos metamielócitos eosinófilos no grupo de cães CS em comparação com o grupo CNI, além de uma menor contagem de eosinófilos segmentados no grupo CS em relação aos grupos CNI e CA-II (Figura 3 - painel C).

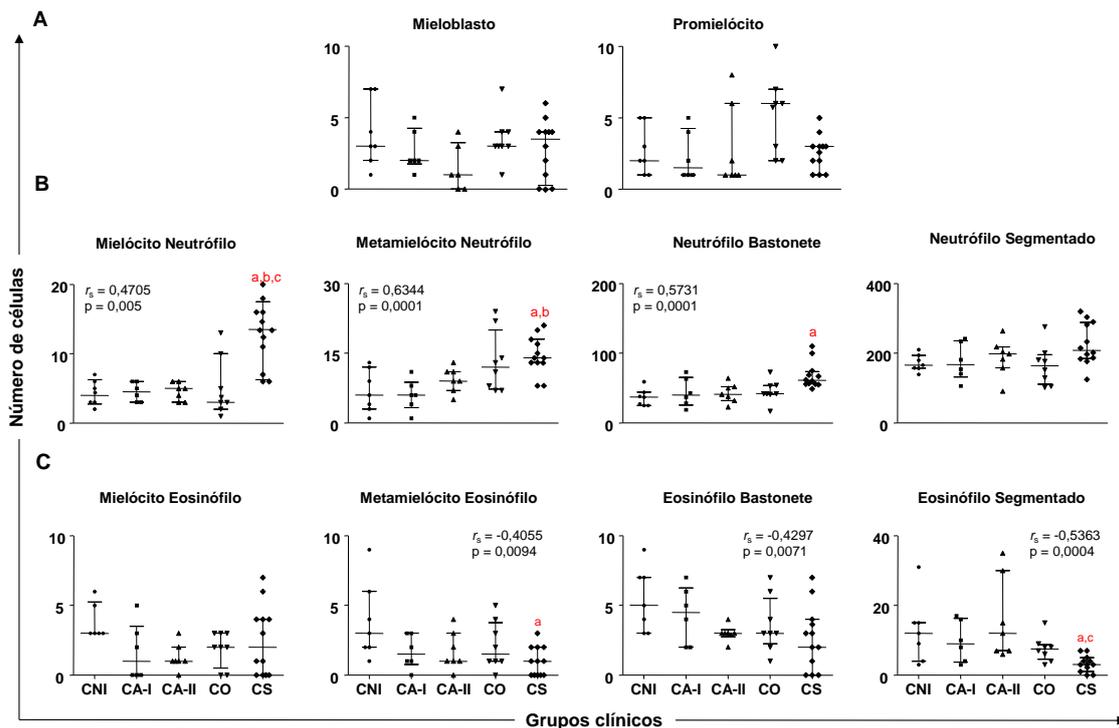


Figura 4: Perfis dos precursores de células da linhagem granulocítica em cães naturalmente infectados por *L. infantum* categorizados de acordo com as formas clínicas. Os animais foram categorizados de acordo com as formas clínicas, divididos nos seguintes grupos: cães não infectados (CNI, n=7), assintomático I (CA-I, n=6), assintomático II (CA-II, n=7), oligossintomático (CO, n=8), sintomático (CS, n=12). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a, b, d” relacionadas aos grupos CNI, CA-I e CA-II, respectivamente. Os resultados foram expressos pela dispersão dos valores individuais e são também demonstrados os valores da mediana e intervalo interquartil.

4.3.2 - Avaliação entre o perfil de células da série granulocítica e alterações no sangue periférico

Para avaliar se as alterações celulares na medula óssea durante a LVC refletem em mudanças nos leucócitos circulantes, foi realizada uma análise de correlação envolvendo mieloblastos e leucócitos totais e promielócitos e leucócitos totais (Figura 5A). Além disso, foi realizada a análise de correlação considerando precursores de neutrófilos e suas células correspondentes no sangue periférico. Também foi avaliado se houve correlação entre os precursores eosinofílicos e os eosinófilos totais no sangue periférico. Nossos dados demonstraram uma correlação positiva entre os neutrófilos bastonetes circulantes com a população de neutrófilos bastonetes no compartimento medular (Figura 5B). Quando o número de eosinófilos circulantes foi correlacionado com o número de eosinófilos na medula óssea (mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados) foi detectada uma associação significativa positiva em todas as análises (Figura 5C).

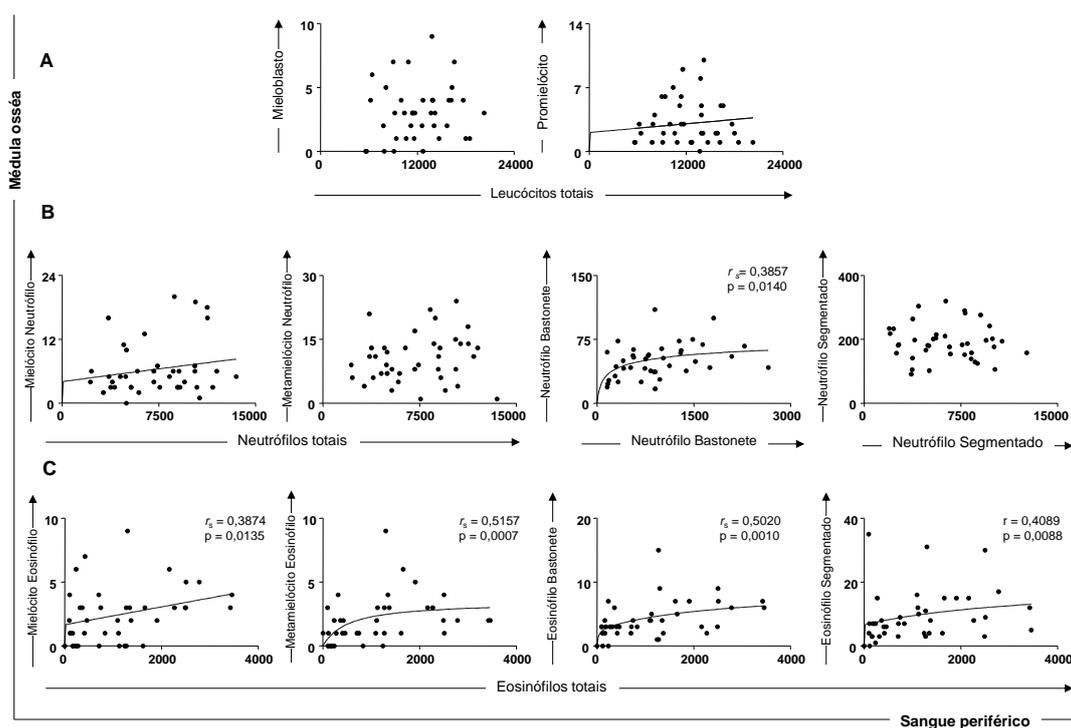


Figura 5: Correlação entre parâmetros celulares na medula óssea (células precursoras da linhagem granulocítica) e sangue periférico (com células). Painel A - mieloblastos *versus* leucócitos totais e promielócitos *versus* leucócitos totais; Painel B - mielócitos neutrófilos *versus* neutrófilos totais, metamielócitos neutrófilos *versus* neutrófilos totais, neutrófilos bastonetes *versus* neutrófilos bastonetes e neutrófilos segmentados *versus* neutrófilos segmentados; Painel C - Mielócitos Eosinófilos, eosinófilos metamielócitos, eosinófilos bastonetes e eosinófilos segmentados *versus* eosinófilos totais no sangue periférico. Correlação entre o sangue periférico e a medula óssea da série granulocítica. Os resultados são expressos como valores de dispersão individuais. Índices de correlação de Pearson (r e os valores de p) são mostradas nos gráficos.

4.3.3 - Avaliação entre o perfil de células da série agranulocítica e alterações no sangue periférico

Considerando o compartimento medular, nossos dados demonstraram um aumento na contagem de linfócitos relacionados com os grupos CA-II, CO e CS quando comparados ao grupo de cães não infectados (Figura 6A). Em contrapartida, o grupo CS apresentou contagens inferiores de plasmócitos, quando comparado com o grupo CO (Figura 6A). Com o objetivo de confirmar e expandir as nossas descobertas sobre as mudanças imunopatológicas em linfócitos, foi realizada uma análise de correlação entre as contagens de linfócitos circulantes em relação à contagem de linfócitos presentes na medula óssea (Figura 6B). Nossos dados demonstraram uma correlação positiva na contagem dos linfócitos medulares com os linfócitos do sangue periférico no grupo de animais CA-II, além de uma correlação negativa em relação a estes mesmos parâmetros, no grupo de cães sintomáticos (Figura 6B).

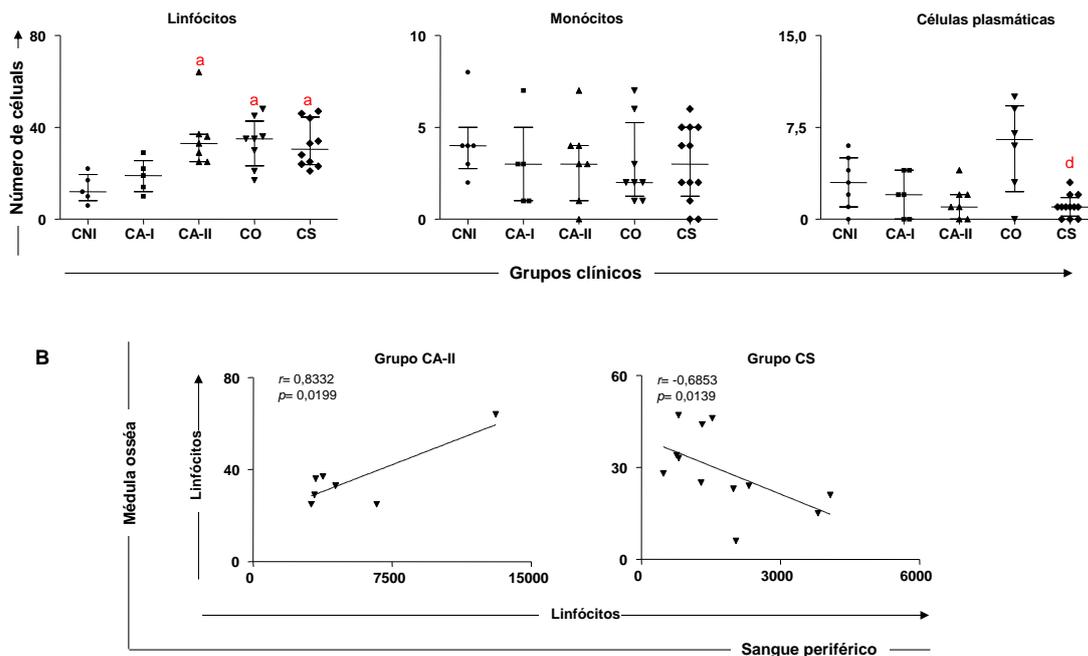


Figura 6: Perfil celular da série agranulocítica na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Painel A – Os animais foram categorizados de acordo com as formas clínicas, divididos nos seguintes grupos: cães não infectados (CNI, n=7), assintomático I (CA-I, n=6), assintomático II (CA-II, n=7), oligossintomático (CO, n=8), sintomático (CS, n=12). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a” e “d” relacionadas aos grupos CNI e CO, respectivamente. Os resultados foram expressos como a dispersão em gráficos dos valores individuais e são também demonstrados os valores da mediana e a gama interquartil. Painel B - Correlação entre os linfócitos do sangue periférico e da medula óssea nos grupos CA-II e CS. Os resultados são expressos como valores de dispersão individuais. Índices de correlação de Pearson (r e os valores de p) são mostradas nos gráficos.

4.4 - Achados citológicos na medula óssea

Durante a contagem diferencial de células em esfregaços de medula óssea foram observadas alterações morfológicas distintas em cães sintomáticos (Figura 7).

As principais conclusões citológicas observadas nos esfregaços de medula óssea derivados de cães sintomáticos são apresentados na Figura 7D-I, em comparação ao grupo de cães não infectados (Figura 7A-C). Múltiplos plasmócitos e células de Mott podem ser facilmente observadas (Figura 7D). Além disso, na figura 7E é representado a emperipoese, fenômeno no qual ocorre a penetração de células hematopoéticas para o citoplasma de megacariócitos. Os animais do grupo de cães sintomáticos apresentaram um aumento na frequência de precursores de células da linhagem leucopoética (Figura 7F) e diminuição de todas as células da linhagem eritropoética (Figura 7G) quando comparado com o grupo de cães não infectados (Figura 7B). Outras análises demonstraram que em cães sintomáticos houve aumento de células da linhagem neutrofílica (Figura 7H) e células da série eritróide em divisão mitótica da célula (Figura 7I) em relação ao grupo de cães não infectados (Figura 7C).

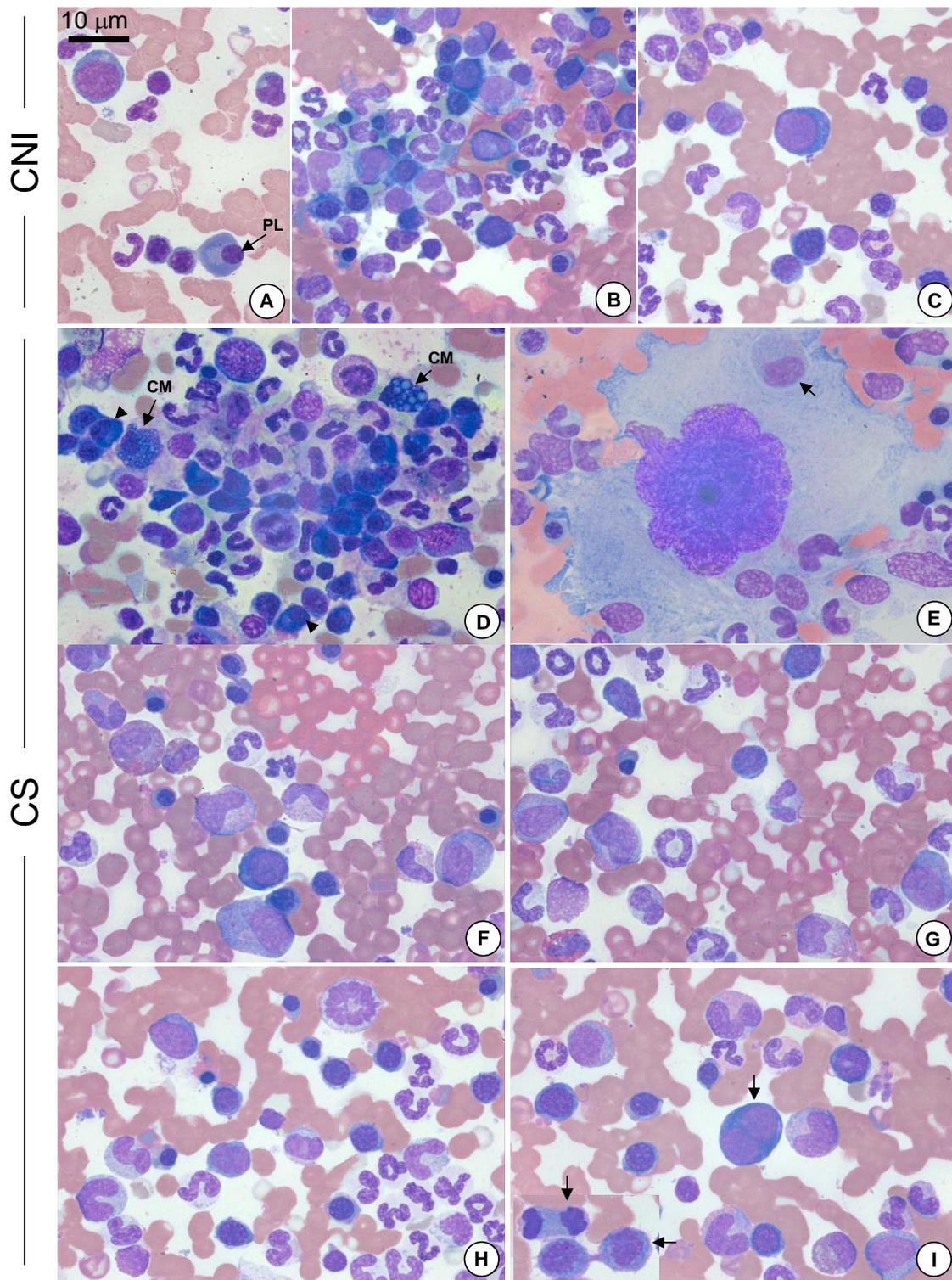


Figura 7: Análise citológica de medula óssea canina. Cães do grupo CS demonstraram células plasmáticas multiplicadas (setas) e células de Mott (D) (CM = células de Mott). Emperipolese, a penetração de células hematopoéticas para o citoplasma de megacariócitos (seta) (E). Aumento de células precursoras da linhagem leucopoiética (F) e diminuição de todas as células da linhagem eritropoética (G) no grupo CS. Cães sintomáticos apresentaram aumento das células da linhagem neutrofílica (H) e células da serie eritróide em fase de divisão mitótica (I) (seta). As lâminas foram coradas com *Giemsa*; Barra=10µm.

4.5 – Avaliação da carga parasitária na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum*

Padrões distintos de densidade parasitária (LDU) na medula óssea foram observados em cães naturalmente infectados por *L. infantum*. O parasitismo medular foi inicialmente classificado como baixo (BP) ou alto (AP) parasitismo baseado nos valores de LDU específicos categorizados estatisticamente em tercís, como segue: BP: 2-20; AP: 190–1104 amastigotas/1.000 células nucleadas da série leucopoética. Segundo este critério, foram incluídos 21 animais, sendo 7 animais do grupo de cães não infectados (CNI), 7 animais no grupo BP e 7 animais no grupo AP.

4.5.1 - Alterações na celularidade da medula óssea de cães infectados por *L. infantum* nas diferentes densidades parasitárias

4.5.1.1- Alterações eritropoéticas

Na figura 8 é apresentada a influência do parasitismo na linhagem eritropoética medular de cães infectados por *L. infantum* categorizados em baixo e alto parasitismo a partir dos índices de LDU, juntamente com os cães não infectados.

De forma muito interessante, ao comparar os resultados da contagem celular da linhagem eritropoética nas diferentes densidades parasitárias pode-se observar algumas semelhanças entre os mesmos, demonstrando que o parasitismo medular influencia nos eritrócitos e seus precursores. Cães com alto parasitismo (AP) apresentaram diminuição ($p < 0,05$) no número de todas as células da série eritroblástica (proeritroblastos, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático e eritroblasto ortocromático) em relação aos cães não infectados (CNI) e também em relação aos cães com baixo parasitismo (BP), quando avaliados os eritroblastos basófilos (Figura 8).

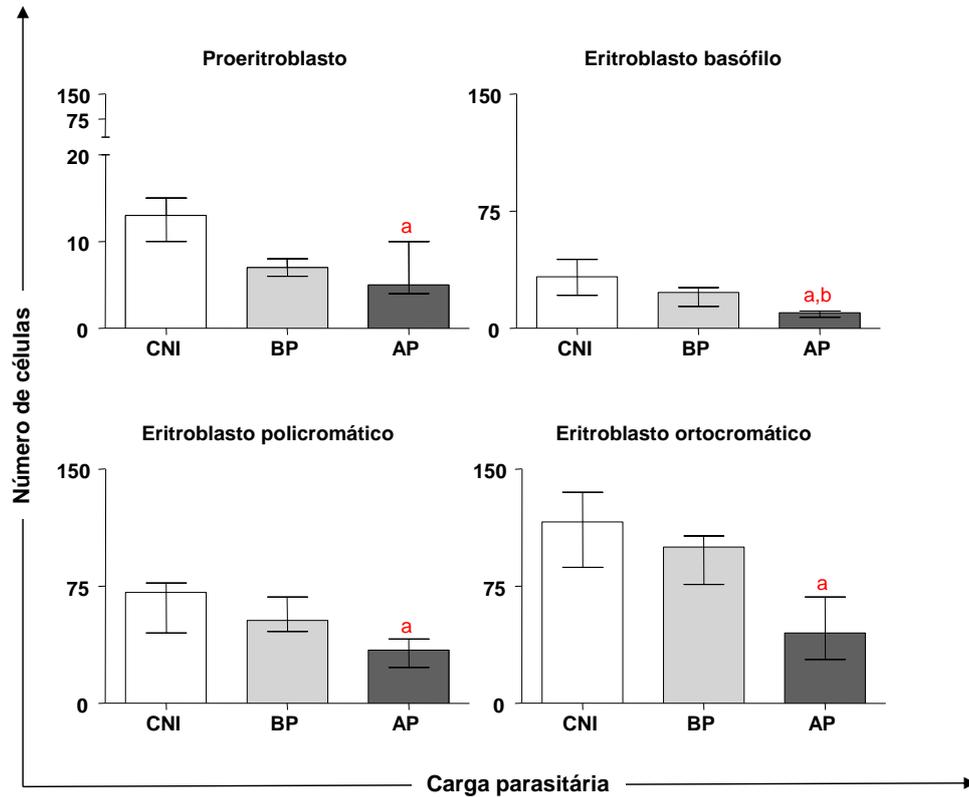


Figura 8: Contagem celular da série eritroblástica nas diferentes densidades parasitárias. Cães não infectados (CNI), Baixo parasitismo (BP) e Alto Parasitismo (AP). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a, b” relacionadas aos grupos CNI e BP, respectivamente.

4.5.1.2 - Alterações leucopoéticas

A análise da linhagem granulocítica revelou que os diferentes graus de parasitismo medular não influenciaram no número de mieloblastos e promielócitos, uma vez que, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 9).

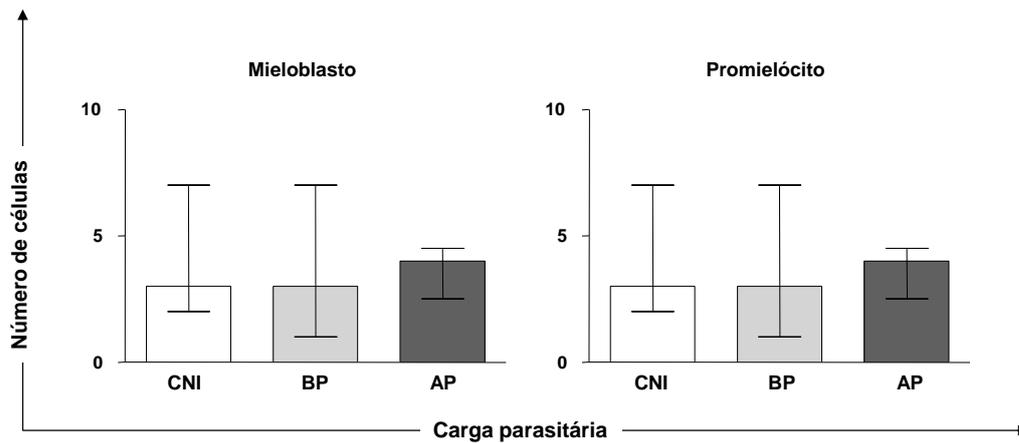


Figura 9: Contagem celular da série granulocítica nas diferentes densidades parasitárias. Cães não infectados (CNI), baixo parasitismo (BP) e alto parasitismo (AP). Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

Os resultados relacionados à linhagem neutrofílica mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) de metamielócito neutrófilo, neutrófilo bastonete e neutrófilo segmentado em cães com alto parasitismo (AP) em relação ao grupo de cães não infectados (Figura 10). Não foram observadas diferenças significativas no número de mielócito neutrófilo entre os grupos.

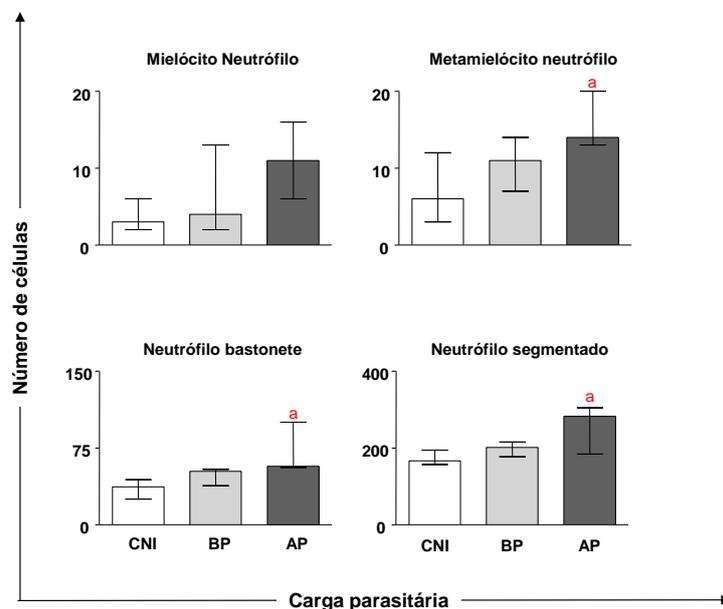


Figura 10: Contagem celular da série granulocítica neutrofílica nas diferentes densidades parasitárias. Cães não infectados (CNI), baixo parasitismo (BP) e alto parasitismo (AP). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a” relacionadas ao grupo CNI.

Ao comparar os resultados da contagem celular da linhagem eosinofílica, observou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de metamielócito eosinófilo, eosinófilo bastonete e eosinófilo segmentado em cães com alto parasitismo (AP) em relação ao grupo de cães não infectados (Figura 11). Não foram observadas diferenças significativas no número de mielócito eosinófilo entre os grupos.

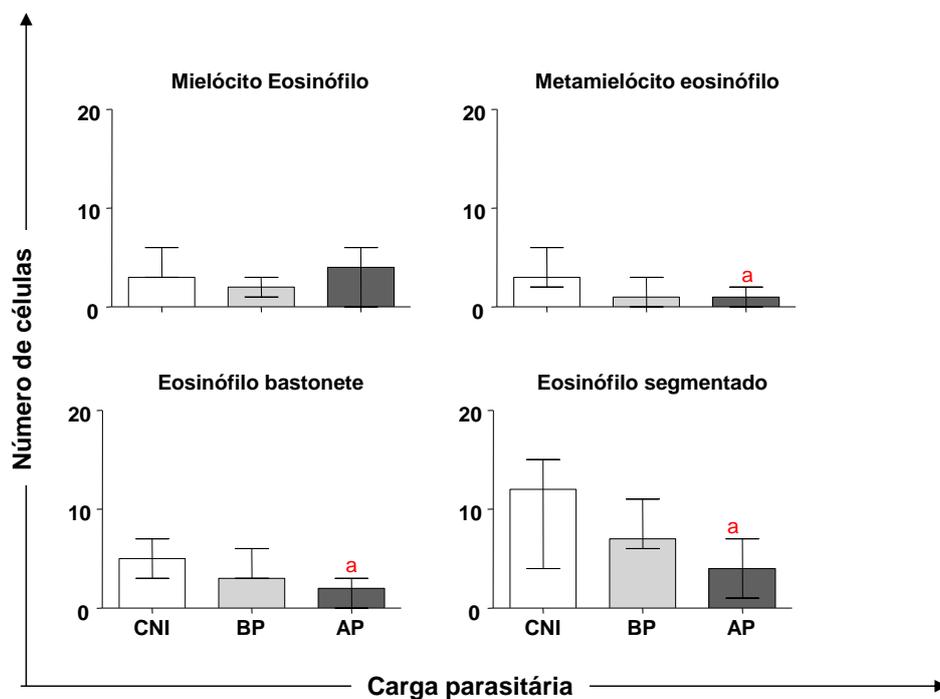


Figura 11: Contagem celular da série granulocítica eosinofílica nas diferentes densidades parasitárias. Cães não infectados (CNI), baixo parasitismo (BP) e alto parasitismo (AP). As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras “a” relacionadas ao grupo CNI.

Na figura 12 estão apresentados os resultados obtidos com as células da linhagem agranulocítica, sendo que, para as células analisadas (linfócitos, monócitos e plasmócitos) não houve diferenças significativas entre os grupos.

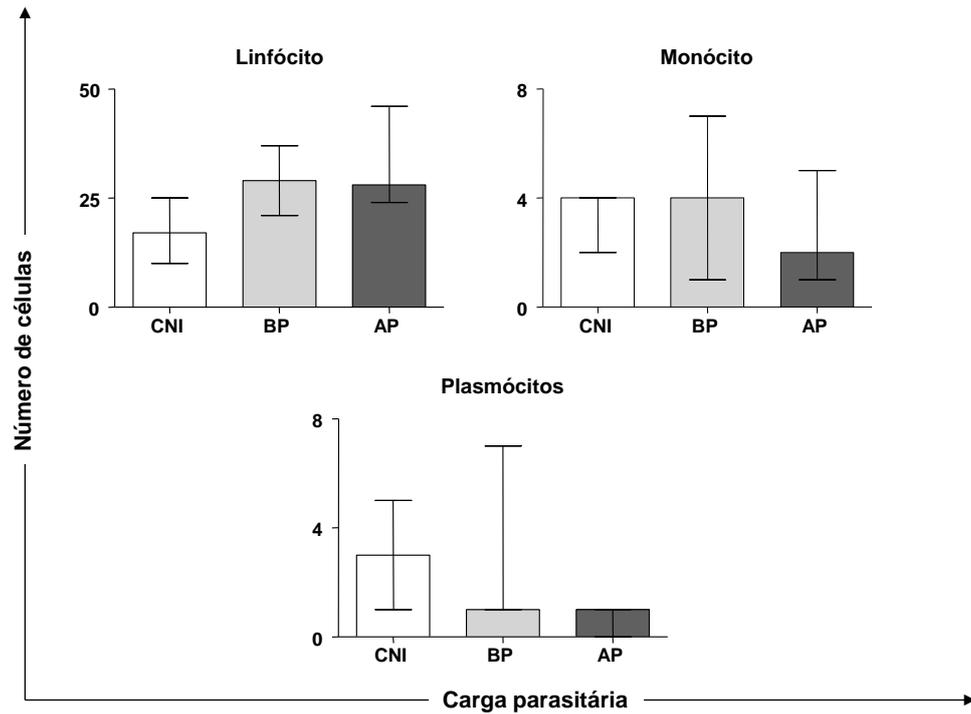


Figura 12: Contagem celular da série agranulocítica nas diferentes densidades parasitárias. Cães não infectados (CNI), baixo parasitismo (BP) e alto parasitismo (AP). Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

5 DISCUSSÃO

Um dos maiores problemas em relação ao diagnóstico da LVC é o fato dos sinais clínicos sugestivos serem muito similares àqueles observados em outras infecções caninas. O aspecto crônico da doença e seu longo período de incubação frequentemente geram atrasos, falhas e principalmente confundimento no diagnóstico clínico (Cardoso & Cabral, 1998). Além disto, há relatos de várias alterações bioquímicas e hematológicas em cães naturalmente ou experimentalmente infectados, tais como: anemia normocítica e normocrômica, leucopenia, trombocitopenia, elevação das proteínas totais com hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia e alterações nas enzimas hepatocelulares (alanina amino transferase e aspartato amino transferase) (Abranches *et al.*, 1991; Genaro, 1993; Reis *et al.*, 2006a).

Acredita-se que a gênese das alterações hematológicas, seja da série vermelha ou da série branca estão muitas vezes relacionadas às disfunções medulares tais como displasia e aplasia (Diebold *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2001; Weiss, 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre as alterações mielopoéticas em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e suas consequências imuno-hematológicas em nível sistêmico.

A avaliação da celularidade na medula óssea em cães portadores de LVC é um tópico pouquíssimo abordado por hematologistas, parasitologistas principalmente sob a óptica da imunopatologia, porém alguns autores relataram ocorrência de hiperplasia de determinados precursores como, granulócitos neutrófilos proporcionando um aumento da relação mielóide:eritróide (M:E). Outras alterações descritas tais como aumento na população de monócitos e macrófagos e a elevação no número de plasmócitos e células de Mott, parecem indicar uma estimulação antigênica associada à infecção no compartimento medular (Anosa & Idowu, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1983).

Neste sentido nosso grupo de pesquisa nos últimos anos tem se dedicado ao estudo das alterações mielopoéticas em cães naturalmente infectados com *L. infantum* portadores de diferentes formas clínicas (Trópia de Abreu, 2010; Trópia de Abreu *et al.*, 2011). Dessa forma, nossos pesquisadores avaliaram esfregaços de medula óssea corados pelo método panótico considerando três grupos clínicos: assintomático (CA), oligossintomático (CO) e sintomático (CS) em comparação com cães não infectados (CNI). Os resultados obtidos neste trabalho mostraram pela primeira vez que cães portadores de LV apresentam alterações em diferentes populações celulares na medula óssea. Diferenças significativas em relação à eritropoese foram observadas em proeritroblastos, eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos resultando em

hipoplasia eritróide principalmente nos grupos CA e CS. Já na leucopoese estes pesquisadores demonstraram que cães infectados portadores de diferentes formas clínicas (CA, CO e CS) apresentaram diminuição significativa das células da linhagem eosinofílica quando comparado com os cães saudáveis (Trópia de Abreu, 2010; Trópia de Abreu *et al.*, 2011).

Assim, objetivando ampliar nossos estudos, o presente trabalho buscou avaliar o perfil da maturação celular e a celularidade das séries eritróide e leucocitóide na medula óssea, bem como relacionar estas alterações com as observadas no sangue periférico em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, portadores de diferentes formas clínicas. Desta forma, o presente trabalho ampliou a avaliação do perfil da celularidade das séries eritróide e leucocitóide nas diferentes formas clínicas, incluindo cães assintomáticos (CA-I e CA-II) conforme descritas previamente por Coura-Vital *et al.* (2011), além dos animais clinicamente classificados oligossintomáticos e sintomáticos. Adicionalmente, buscando compreender a influência do parasitismo medular na patogênese das alterações do mielograma e do hemograma a densidade parasitária na medula óssea foi quantificada através da técnica microscópica de “*Leishman Donovan Units*”. Por fim nosso estudo, trouxe uma importante contribuição para a luz do conhecimento moderno ao correlacionar as alterações observadas no mielograma com as alterações encontradas no hemograma nas diferentes formas clínicas e cargas parasitárias da LVC.

De acordo com os resultados encontrados neste estudo, ficou evidente uma redução significativa da contagem de glóbulos vermelhos, hemoglobina e valores de hematócrito em cães sintomáticos ao se avaliar o sangue periférico, o que demonstra que a LVC grave está associada com alterações no compartimento eritróide, corroborando com estudos anteriores (Reis *et al.*, 2006a; Trópia de Abreu *et al.*, 2011).

É possível que a anemia observada nos cães sintomáticos possa estar relacionada a fatores como: a formação deficiente de colônias, o uso de ferro por progenitores eritróides e aumento da hemólise, em associação com a resposta inflamatória à infecção (Saeed *et al.*, 1998). Além disso, uma redução dos níveis plasmáticos de ferro na presença de um aumento das reservas de ferro sugere que a hiperplasia reticuloendotelial é acompanhada de uma retenção de ferro anormal por macrófagos, típicos da anemia de doenças crônicas. Isso pode limitar a resposta eritropoética conduzindo aos distintos níveis de anemia na leishmaniose visceral crônica (Pippard *et al.*, 1986)

Além disso, De Luna *et al.* (2000) descreveram que a anemia poderia ser resultado de deficiência na fluidez da membrana do eritrócito na LVC, favorecendo o sequestro mecânica de eritrócitos pelo baço e/ou alterações receptor/ligante de eritrócitos no mecanismo de citoaderência. Neste contexto, nós descrevemos uma importante relação entre a celularidade na medula óssea e do sangue periférico, com a diminuição de células das linhagens eritropoéticas (especialmente eritroblasto basófilos e eritroblasto ortocromático) que intensifica de acordo com o curso da LVC.

Amusátegui *et al.* (2003) relataram que os cães assintomáticos apresentaram maiores valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, quando comparados aos cães oligossintomáticos e sintomáticos. Estes resultados permitem inferir que em cães sintomáticos, há uma disfunção da medula óssea com diminuição da eritropoese, afetado por um parasitismo intenso na medula óssea, que é típico achado em cães sintomáticos (Reis *et al.*, 2006a).

Para avaliar os padrões no sangue e no compartimento da medula óssea, foi analisada a série de células brancas. Relacionou-se linfocitose no grupo CA-II e leucopenia em cães sintomáticos, caracterizada por monocitopenia, linfopenia e eosinopenia. Estes dados corroboram com os trabalhos de Reis *et al.* (2006a; 2006b). Em contraste, Da Costa-Val *et al.* (2007) não observaram correlação entre os valores de leucócitos e os sinais clínicos na LVC, com exceção de linfócitos, desde que os cães assintomáticos demonstraram linfocitose, quando comparados a outros grupos.

Avaliando os precursores da linhagem granulocítica nos animais deste estudo, observamos uma alta frequência de mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes na medula óssea de cães sintomáticos, além de uma correlação positiva de acordo com o curso da LVC. Estes dados sugerem uma elevada demanda de neutrófilos em cães sintomáticos, resultando em uma resposta inflamatória em vários órgãos afetados pelo parasitismo (Reis *et al.*, 2009). Estudos conduzidos por Amusátegui *et al.* (2003) relataram que os cães assintomáticos apresentaram uma diminuição no número de neutrófilos circulantes. Além disso, o aumento da contagem de neutrófilos no baço de cães naturalmente infectados por *L. infantum* foram descritos (Barrouin-Melo *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi relatada também hipoplasia eosinofílica em cães sintomáticos (redução de metamielócitos eosinófilos e eosinófilos segmentados), além de uma correlação negativa desta população com a progressão clínica da LVC. Estes

achados parecem indicar uma disfunção da medula óssea neste estágio da infecção, contribuindo para a eosinopenia observada na LVC sintomática. Resultados semelhantes foram observados por Tryphonas *et al.* (1977) que relataram redução de precursores eosinofílicos na medula óssea durante a fase final da LVC.

Outras análises demonstraram uma correlação positiva foram encontradas entre neutrófilos bastonetes (medula óssea) e neutrófilos bastonetes (sangue), além de eosinófilos totais (sangue) e precursores de eosinófilos (mielócitos, metamielócitos, eosinófilos bastonetes e eosinófilos segmentados). Acreditamos que estas alterações podem ocorrer devido ao estímulo fornecido pelo parasitismo da *L. infantum* presente na medula óssea, como demonstrado previamente por Trópia de Abreu *et al.* (2011) em cães sintomáticos, bem como em animais com alto parasitismo medular. No entanto, o papel dos neutrófilos e eosinófilos durante o curso da LVC ainda não está claro, e nenhuma análise funcional nestas populações celulares ainda foram descritos.

Os nossos dados demonstram que a linfocitose na medula óssea está associada com linfocitose no sangue periférico como observada no grupo CA-II, o que confirma a hipótese previamente descrita por Reis *et al.* (2006a). No entanto, em cães sintomáticos, a linfocitose na medula óssea foi correlacionada com linfopenia no sangue periférico. Este fenômeno pode ser explicado pela migração preferencial de células mononucleares (linfócitos e monócitos/fagócitos) para os órgãos linfóides infectados a fim de estabelecerem uma resposta inflamatória que se intensifica durante a história natural da LVC (Reis *et al.*, 2009). Neste contexto, a linfocitose na medula óssea na LVC ocorre devido a uma resposta compensatória que fornece linfócitos para atingir os órgãos afetados pelo parasito, que é refletido pela linfopenia no sangue periférico observada em estágios avançados da LVC (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 2006a). Assim, uma vez que cães assintomáticos apresentam aumento de linfócitos na medula e no sangue, cães sintomáticos não conseguiram manter esta população de células no compartimento sanguíneo. Acreditamos na hipótese de que um aumento da carga do parasito em diferentes tecidos, o que é típico em cães sintomáticos (Vercosa *et al.*, 2008; Guerra *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2009) contribuiria para os linfócitos migrarem do sangue para os tecidos parasitados, resultando em contagens mais baixas de linfócitos no sangue periférico.

Outra hipótese que explica este fenômeno pode ser devido a elevada atividade policlonal de linfócitos B na LVC ativa aumentando a demanda desta população para

agirem como células apresentadoras de antígenos ou como plasmócitos ativado propriamente ditos (Reis *et al.*, 2006b; Reis *et al.*, 2009).

Avaliamos as alterações morfológicas na medula óssea em cães naturalmente infectados por *L. infantum* que exibiam diferentes formas clínicas da LVC. Foi observado uma emperipoese no grupo de cães sintomáticos, que já foi previamente relatado por Foglia Manzillo *et al.* (2006) na LVC. Esse fenômeno tem sido observado em seres humanos (Cashell *et al.*, 1992) e em ratos (Lee 1989) em condições de perda crônica de sangue, câncer, doenças reumáticas e trombocitose reativa.

Também encontramos células de Mott no compartimento medular de cães sintomáticos, em associação com plasmocitose, o qual tem sido descrito como hiperatividade de células plasmáticas que contêm grânulos de imunoglobulinas no citoplasma (Jain 1986; Travlos 2006). Estudos anteriores relataram aumento da contagem de plasmócitos e células de Mott na LVC resultante da estimulação antigênica associada com intenso parasitismo no compartimento da medula óssea (Anosa *et al.*, 1983).

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, é possível que alguns dos eventos hematológicos encontrados possam ser empregados como marcadores de prognóstico e monitoramento na LVC sintomática: linfocitose na medula óssea, e linfopenia no sangue periférico. Em contraste, o grupo de cães CA-I não apresentaram mudanças hematológicas comumente observadas na LVC ativa, apresentando normalidade nas contagens tanto da medula óssea como do sangue periférico.

Neste estudo, também avaliamos o impacto do parasitismo da medula óssea nas diferentes formas clínicas da LVC através da LDU (“*Leishman Donovan Units*”), segundo Stauber (1955). Reis *et al.* (2006b) demonstraram que a densidade parasitária da medula óssea parece ser o marcador parasitológico mais confiável capaz de elucidar o status clínico da LVC, pois foi o órgão que apresentou melhor correlação com as formas clínicas comparado ao baço, linfonodo, pele e fígado. Apesar da sensibilidade relativamente baixa em cães assintomáticos (Saridomichelakis *et al.*, 2005), a citologia de medula óssea é um método altamente sensível e específico para o diagnóstico da LVC patente.

Com o objetivo de avaliar o impacto do parasitismo na hematopoese, os animais foram reagrupados em: cães com baixo (BP) e alto parasitismo (AP), levando-se em conta a carga parasitária da medula óssea. O grupo de cães com alto parasitismo foi o

grupo que apresentaram maior número e alterações mais relevantes, indicando que a alta intensidade parasitária medular esta associada com alterações na eritropoese e leucopoese, tais como: diminuição de todas as células da série eritroblástica, proliferação neutrofílica aumentada (metamielócito neutrófilo, neutrófilos bastonetes e segmentados) frente à proliferação eosinofílica diminuída (metamielócito eosinófilo, eosinófilos bastonetes e segmentados). Esses resultados corroboram com os trabalhos de Reis *et al.* (2006c) e de Trópia de Abreu *et al.* (2011) que relataram alterações no hemograma como diminuição nos valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, bem como no número de leucócitos circulantes (eosinófilos) em cães que apresentaram alta densidade parasitária na medula óssea. Trópia de Abreu *et al.* (2011) também encontrou aumento de algumas células da linhagem neutrofílica em cães com alto parasitismo.

Neste sentido, acreditamos que o presente estudo forneceu importantes contribuições na patogênese das alterações medulares e sanguíneas decorrentes da evolução da história natural da LVC em suas diferentes manifestações clínicas. Sabemos que nosso estudo dará mais fundamento às futuras investigações no âmbito da biologia molecular e da genômica que serão conduzidas por pesquisadores do nosso laboratório permitirá a geração de novos conhecimentos e abrindo novos horizontes nesta nova linha de pesquisa.

6 CONCLUSÃO

6.1 – Conclusão

Nossos resultados mostraram pela primeira vez que as alterações na hematopoese e nos parâmetros hematológicos podem ocorrer e por vezes de forma correlacionada durante o curso natural na LVC.

Cães sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* apresentaram alterações de maior magnitude tanto nos parâmetros hematológicos (hemograma) como hematopoese (mielograma). Em contraste, os cães do grupo CA-I não apresentaram alterações significativas em qualquer compartimento (sangue e medula), apresentando valores de contagem normais extremamente semelhantes aos observados no grupo de cães não infectados.

Na LVC ativa ou sintomática as alterações no mielograma foram relacionadas com as contagens absolutas de célula no sangue periférico, sugerindo que distúrbios no mielopoese se refletem diretamente nas células das linhagens da série branca e vermelha tendo como conseqüências a anemia e leucopenia (eosinopenia, monocitopenia e linfopenia) típicas de cães com doença grave.

A análise da carga parasitária comprovou que o aumento do parasitismo medular foi acompanhado pela diminuição do número de células da série eritroblastica e de precursores da linhagem eosinofílica, bem como do aumento dos precursores neutrofílicos.

7.1 - Perspectivas

Como perspectivas deste estudo temos o propósito de verificar, por meio da técnica de PCR em Tempo Real, a expressão dos fatores de maturação eritrocitária (Epo e Ligante kit) e leucocitária (GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-5, IL-6, IL3, IL-4, IL-10, IL-2 e IL-1) e a carga parasitária dos animais.

Além disso, propomos correlacionar à expressão dos fatores de maturação e as alterações do mielograma e hemograma com as diferentes formas clínicas e cargas parasitárias da LVC, que permitirá entender melhor a patogênese das alterações medulares e sanguíneas na leishmaniose visceral.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches P, Silva-Pereira MC, Conceicao-Silva FM, Santos-Gomes GM, Janz JG 1991. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *The Journal of parasitology* 77: 557-561.

Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM 2005b. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol* 127: 227-232.

Alvar, Jorge; Cañavate, C.; Molina, Ricardo; Moreno, J.; Nieto, Javier. Canine leishmaniasis. *Advances in parasitology*, v. 57, p. 1–88, 2004.

Alves W 2006, Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino, In: Consulta de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis sobre leishmaniose visceral en las Américas. Organización Panamericana de salud, Rio de Janeiro, pp. 94- 98.

Amusatogui I, Sainz A, Rodriguez F, Tesouro MA (2003) Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol* 18: 147–156.

Anosa, V.O.; Idowu, A.L. (1983). The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *Zentralbl Veterinarmed B.*, v. 30, p.600-608.

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, de Andrade Filho FA, Trigo J, Juliao FS, et al. (2006) Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. *Vet J* 171: 331–339.

Baneth, Gad; Koutinas, A. F.; Solano-Gallego, Laia; Bourdeau, Patrick; Ferrer, Lluís. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in parasitology*, v. 24, n. 7, p. 324–30, 2008.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-Andre I, Chabanne L (1997) Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol* 56: 345–351.

Cardoso, L.; Cabral, M. (1998). *Leishmania* and canine Leishmaniosis. *Rev. Port. C. Vet.* , v. 93, p. 122-141.

Cashell AW, Buss DH (1992) The frequency and significance of megakaryocytic emperipolesis in myeloproliferative and reactive states. *Ann Hematol* 64: 273– 276.

Coura-Vital, W.; Marques, Marcos José; Veloso, V. M. et al. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, n. 8, p. e1291, 2011.

Coura-vital, W.; Reis, A. B.; Fausto, M. A. et al. Risk Factors for Seroconversion by *Leishmania infantum* in a Cohort of Dogs from an Endemic Area of Brazil. *PLoS one*, v. 8, n. 8, p. e71833, 2013.

da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, et al. (2007) Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Vet J* 174: 636–643.

De Luna R, Ferrante M, Severino L, Ambrosio R, Piantedosi D, et al. (2000) Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *J Comp Pathol* 122: 213–216.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 89: 463-469.

Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.

Diebold, J.; Molina, T.; Camilleri-Broet, S.; Le Tourneau, A.; Audouin, J. (2000). Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy review. *Histopathology*, v.37, p.199-211.

Falqueto A, Coura JR, Barros GC, Grimaldi Filho G, Sessa PA, Carias VR, de Jesus AC, de Alencar JT 1986. [Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espírito Santo, Brazil]. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 81: 155-163.

Foglia, M. V.; Restucci, B.; Pagano A.; Gradoni L.; Oliva G. (2006). Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet Rec.*, v. 158, p.690-694.

Gasper, P.W. (2000). The hemopoietic system. In: Feldman, B.F. et al. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap.11, p. 63-68.

Galloway, J. L.; Zon, L. I. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Current topics in developmental biology*, v. 53, p. 139–58, 2003.

Garg, R.; Dube, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *The Indian journal of medical research*, v. 123, n. 3, p. 439–54, 2006.

Gasper, P.W. (2000). The hemopoietic system. In: FELDMAN, B.F. et al. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap.11, p. 63-68.

Genaro O 1993. *Leishmaniose visceral canina experimental*. Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 202 pp.

Grimaldi, G.; Teva, A.; Santos, C. B.; Ferreira, A. L.; Falqueto, Aloísio. The effect of removing potentially infectious dogs on the numbers of canine *Leishmania infantum* infections in an endemic area with high transmission rates. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, v. 86, n. 6, p. 966–71, 2012.

Guerra LL, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Reis AB, et al. (2009) Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res* 104:611–622.

Hammond, W.P.; Boone, T.C.; Donahue, R.E.; Souza, L.M.; Dale, D.C. (1990). A comparison of treatment of canine cyclic hematopoiesis with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), G-CSF, interleukin-3, and canine G-CSF. *Blood*, v.76, p.523-532.

Hoffbrand, A. V. ; Moss, P. A. H., *Fundamentos em hematologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 464p., il. col.

Jain, N. C. (1986). *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th edn. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 8-18.

Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*17: 279-289.

Lee KP (1989) Emperipolesis of hematopoietic cells within megakaryocytes in bone marrow of the rat. *Vet Pathol* 26: 473–478.

Lund, J. E. (2000). Toxicologic effects on blood and bone marrow. In *Schalm's Veterinary Hematology*, 5th edition (B. F. Feldman, J. G. Zinkl, and N. C. Jain, eds.), pp. 44–50, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.

Mancianti, F.; Gramiccia, M; gradoni, L.; Pieri, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 82, n. 4, p. 566–7, 1988.

Molina, R; Amela, C.; Nieto, J; et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 4, p. 491–3, 1994.

Nash, R.A.; Schuening, F.G.; Seidel, K.; Appelbaum, F.R.; Boone, T.; Deeg, H.J.; Graham, T.C.; Hackman, R.; Sullivan, P.M.; Storb, R. (1994). Effect of recombinant canine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation. *Blood*, v.83, p.1963-1970.

Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Goncalves Filho J, Perri SH 2010. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. *Vet Parasitol* 170: 131-133.

Penny, R. H. C.; Carlisle, C. H. (1970). The bone marrow of the dog: a comparative study of biopsy material obtained from the iliac crest, rib and sternum. *J. Small Anim. Pract.*, v.11, p. 727-734.

Penny, R. H. C. (1974). The bone marrow of the dog and cat. *J. Small Anim. Pract.*, v.15, p. 553-562.

Pippard MJ, Moir D, Weatherall DJ, Lenicker HM (1986) Mechanism of anaemia in resistant visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 80: 317- 323.

Reagan, W. J. (1993). A Review of myelofibrosis in dogs. *Toxicol. Pathol.*, v. 21, p.164-169.

Reis, Alexandre Barbosa; Martins-Filho, Olindo A; Teixeira-Carvalho, A. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in veterinary science*, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006a.

Reis, Alexandre Barbosa; Teixeira-Carvalho, A.; Vale, A. M. et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 112, n. 3-4, p. 102-116, 2006b.

Reis, Alexandre Barbosa; Martins-Filho, O. A.; Teixeira-Carvalho, A. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology*, v. 128, n. 1-3, p. 87–95, 2009.

Reithinger, Richard; Dujardin, J.; Louzir, H. et al. Cutaneous leishmaniasis. , 2007.

Saeed AM, Khalil EA, Elhassan AM, Hashim FA, Fandrey J, et al. (1998) Serum erythropoietin concentration in anaemia of visceral leishmaniasis (kala-azar) before and during antimonial therapy. *Br J Haematol* 100: 720–724.

Saridomichelakis, M.N.; Mylonakis, M.E.; Leontides, L.S.; Koutinas, A.F.; Billinis, C.; Kontos, V.I. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.73, p. 82-86.

Solano-Gallego, L; Koutinas, A; Miró, G; et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology*, v. 165, n. 1-2, p. 1–18, 2009.

Solano-Gallego, Laia; Miró, Guadalupe; Koutinas, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & vectors*, v. 4, p. 86, 2011.

Stauber, L.A. (1955). Leishmaniasis in the hamster. In: Cole, W.H. (Ed.), *Some Physiological Aspects and Consequence of Parasitism*. *Rugers University Press*, New Brunswick, NJ, p. 77–90.

Travlos, G. S. (2006b). Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.*, v. 34, p.548–565.

Trópia de Abreu, R.; Carvalho, M. D. G.; Carneiro, C. M. et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with leishmania (*Leishmania*) chagasi. *PloS one*, v. 6, n. 5, p. e18873, 2011.

Tryphonas L, Zawidzka Z, Bernard MA, Janzen EA (1977) Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can J Comp Med* 41: 1–12.

Vercosa BL, Lemos CM, Mendonca IL, Silva SM, de Carvalho SM, et al. (2008) Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Vet Res* 4: 45.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 90: 31-37.

WHO 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. In WHO. Geneva, p. 184.

Weiss, D.J. (2006). A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004). *J. Vet. Intern. Med.*, v.20, p.955-961.

Yamaguchi, R. A.; French, T.W.; Simpson, C.F.; Harvey, J.W. (1983). *Leishmania donovani* in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.19, p.723-726.