

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

CARLA DE OLIVEIRA HONSE

AVALIAÇÃO CITOPATOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA
E PERFIL HEMATOLÓGICO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) chagasi

Rio de Janeiro

2014

THESE DPCDI – IPEC

C. O. HONSE

2014

Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil
hematológico de cães naturalmente infectados por
Leishmania (Leishmania) chagasi

CARLA DE OLIVEIRA HONSE

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para
obtenção do grau de Doutora em Ciências

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tânia Maria Valente
Pacheco.

Coorientador: Prof. Dr. Nayro Xavier de Alencar.

Rio de Janeiro

2014

CARLA DE OLIVEIRA HONSE

Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil
hematológico de cães naturalmente infectados por
Leishmania (Leishmania) chagasi

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação do Instituto de Pesquisa
Clínica Evandro Chagas para obtenção do
grau de Doutora em Ciências.

Orientadores: Prof.^a Dr.^a Tânia Maria Valente Pacheco
Prof. Dr. Nayro Xavier de Alencar
Aprovada em: 26/02 /2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Caldas Menezes (Presidente)
Doutor em Biologia Parasitária
Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a Maria de Fátima Madeira
Doutora em Ciências
Instituto Oswaldo Cruz / Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a Sara Maria de Carvalho e Suzano
Doutora em Medicina Veterinária e Clínica Veterinária
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho

Prof.^a Dr.^a Isabele Barbieri dos Santos
Doutora em Ciências
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dr.^a Isabella Dib Ferreira Gremião
Doutora em Ciências
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas / Fundação Oswaldo Cruz

À minha família.

Aos animais.

A Deus.

“Recebi como obrigação sagrada o dever de amparar os animais na escala progressiva de suas posições variadas no planeta. Estendi até eles a vossa concepção de solidariedade e o vosso coração compreenderá, mais profundamente, os grandes segredos da evolução, entendendo os maravilhosos e doces mistérios da vida”.

(Emmanuel - Psicografia: Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

À doutora Tânia Maria Valente Pacheco e ao doutor Nayro Xavier de Alencar pelos ensinamentos, orientação e incentivo em todos os momentos.

À Coordenação de Ensino do Curso de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Ipec/Fiocruz, em especial aos amigos Marcelo Eduardo Timóteo e Priscila Sá pela compreensão e confiança.

Ao Laboratório de Vigilância em Leishmaniose (Vigileish) – Ipec/Fiocruz, em especial, à doutora Maria de Fátima Madeira pela amizade, compreensão e companheirismo.

À doutora Reneé Laufer Amorin e à equipe do Laboratório de Imunohistoquímica Veterinária do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Unesp (Botucatu – SP), pela colaboração na realização dos exames laboratoriais.

À Raquel Vasconcelos pela colaboração na análise estatística deste estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.

Ao doutor e amigo Fabiano Borges Figueiredo pela sabedoria, ajuda e companheirismo.

À equipe do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LapClin-Dermzoo) – Ipec/Fiocruz, em especial, aos amigos Isabella Dib Ferreira Gremião, Rodrigo Caldas Menezes, Sandro Antônio Pereira, Luisa Helena Monteiro de Miranda, Amanda Akemi, Artur Velho e Marina Furtado.

À minha mãe Anna Maria de Oliveira Honse pelo imenso amor, carinho, compreensão e apoio.

Aos meus queridos irmãos Maila Honse Torres e Siller de Oliveira Honse por todo carinho e paciência.

Ao meu irmão de coração Matheus Bento de Oliveira pelo amor, carinho e inúmeros momentos de alegria.

À minha tia Maria Helena Honse pelo carinho, incentivo, ajuda e paciência.

À amiga Maíra Cavalcanti pela cumplicidade, amizade e paciência.

Às amigas Renata Bastos, Thaís Omena, Aline Rodrigues, Isabele Barbieri e Zelina Muniz pela força e amizade.

A todos os animais deste mundo.

A Deus, que me deu forças para que chegasse até aqui.

Honse, C. O. **Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi***. Rio de Janeiro; 2014. 81f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Foram avaliados quarenta e um cães adultos, machos e fêmeas, sem raça definida, provenientes de inquéritos sorológicos para leishmaniose visceral canina realizados pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro. O objetivo deste estudo foi descrever as alterações citopatológicas da medula óssea e o perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. A avaliação citológica da medula óssea incluiu a análise qualitativa e quantitativa. O perfil hematológico foi avaliado através de contador automático de células e esfregaços sanguíneos. Adicionalmente, foram realizadas a imunofenotipagem de linfócitos medulares, pesquisa de formas amastigotas na medula óssea e avaliação dos estoques de ferro medular. De acordo com os resultados obtidos, cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* apresentaram hiperplasia das séries mieloide, linfoide e monocítica, onde frequentemente foram observadas formas amastigotas, anemia normocítica normocrômica e aumento dos estoques de ferro medular. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as populações de linfócitos T e linfócitos B medulares. Em conclusão, os cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* apresentaram alterações na medula óssea e no perfil hematológico independentemente da manifestação clínica apresentada pelo animal. Hiperplasia das linhagens hematopoiéticas, anemia, eritrofagocitose e aumento dos estoques de ferro medular possibilitaram uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença e a pesquisa de formas amastigotas na medula óssea contribuiu como uma importante ferramenta diagnóstica da leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: 1. Medula óssea. 2. Contagem de Células Sanguíneas. 3. *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 4. Cães. 5. Linfócitos. 6. Ferro.

Honse, C. O. **Cytopathological evaluation of bone marrow and hematological profile of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi***. Rio de Janeiro; 2014. 81f. Thesis [Doctorate in Clinical Research in Infectious Diseases] – Evandro Chagas Clinical Research Institute.

ABSTRACT

Fourty one adult mongrel dogs from the VL serological surveys done by Secretaria Municipal de Saúde of Rio de Janeiro were studied. The purpose of this study was to evaluate the occurrence of cytopathological changes of bone marrow and hematological changes in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Evaluation of bone marrow included the qualitative and quantitative analysis and complete blood count was performed with an automated cell counter and blood smears. Additionally, immunophenotyping of lymphocytes, search of amastigotes and iron stores of bone marrow were performed. According to the results, dogs naturally infected by *L. (L.) chagasi* showed hiperplasia of myeloid, lymphoide and monocytic series, that often showed amastigotes form, normocytic normochromic anemia and increase iron stores of bone marrow. No significant difference was observed among the T lymphocytes and B lymphocytes populations of bone marrow. In conclusion, dogs naturally infected by *L. (L.) chagasi* showed changes in bone marrow and blood profile regardless of the clinical manifestations. Hyperplasia of hematopoietic lineages, anemia, erythrophagocytosis and increase iron stores allowed a better understanding of the physiopathological mechanisms involved in disease and the search of amastigotes in bone marrow contributed as an important diagnostic tool of canine visceral leishmaniasis.

Palavras-chave: 1. Bone marrow. 2. Complete Blood Count. 3. *Leishmania (Leishmania) chagasi*. 4. Dogs. 5. Lymphocytes. 6. Iron.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Canino, S.R.D., macho. Punção aspirativa de medula óssea em crista ilíaca	19
Figura 2	Aspirado de medula óssea de cão com LVC. Placa de <i>Petri</i> contendo inúmeras espículas medulares (seta)	19
Figura 3	Canino, S.R.D., macho. Lesão tumoral localizada na gengiva do ramo maxilar direito (seta)	29
Figura 4	Aspirado de medula óssea. Canino. Espículas medulares exibindo hipercelularidade (seta). Giemsa. 100x	33
Figura 5	Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia megacariocítica (seta). Giemsa. 100x	34
Figura 6	Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia eritroide (setas). Giemsa. 400x	35
Figura 7	Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia granulocítica – Bastões (setas pretas). Precusores mieloides (seta vermelha) Giemsa. 400x	37
Figura 8	Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia eosinofílica. Precusores imaturos (seta preta). Precusores maduros (seta vermelha). Giemsa. 400x	37
Figura 9	Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia linfoide - Plasmócitos (setas). Giemsa. 400x	39
Figura 10	Aspirado de medula óssea. Canino. <i>Mott-cell</i> (seta). Giemsa. 400x	39
Figura 11	Aspirado de medula óssea. Canino. Presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. intracelulares (fagocitadas por macrófagos) (setas). Giemsa. 400x	41
Figura 12	Aspirado de medula óssea. Canino. Presença de eritrofagocitose (seta preta) e leucofagocitose (seta vermelha). Giemsa. 400x	41
Figura 13	Aspirado de medula óssea. Canino. Emperipolese de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. (seta). Giemsa. 400x	43

Figura 14	Aspirado de medula óssea. Canino. Megacariócito <i>dwarf</i> (seta). Giemsa. 400x	44
Figura 15	Aspirado de medula óssea. Canino. Precipitados de hemossiderina (setas). Giemsa. A – 100x; B – 400x	45
Figura 16	Aspirado de medula óssea. Canino. Precipitados de hemossiderina (setas). Azul da Prússia. A – 100x; B – 400x	45
Figura 17	Aspirado de medula óssea. Canino. Imunocitoquímica. Anti-CD79a positivo – Linfócito B (setas). DAB. 400x	47
Figura 18	Aspirado de medula óssea. Canino. Imunocitoquímica. Anti-CD79a positivo – Linfócito B (seta vermelha). Plasmócito (seta preta). DAB. 400x	47
Figura 19	Aspirado de medula óssea. Canino. Imunocitoquímica. Anti-CD3 positivo – Linfócito T (setas). DAB. 400x	48
Figura 20	Aspirado de medula óssea. Canino. Imunocitoquímica. Anti-CD3 positivo – Linfócito T (setas). DAB. 400x	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alterações clínicas observadas em 28 (62,8%) cães oligossintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i>	30
Tabela 2	Achados da hematoscopia de 41 cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i>	31
Tabela 3	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do eritrograma e plaquetometria de 41 cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i>	32
Tabela 4	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do leucograma de 41 cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> ..	32
Tabela 5	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados da avaliação quantitativa do mielograma de 41 cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i>	42
Tabela 6	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados da avaliação quantitativa da imunofenotipagem de linfócitos medulares de 41 cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i>	46
Tabela 7	P-valor das variáveis hemácia, hematócrito, hemoglobina, VGM, CHGM, eosinófilos (sangue periférico) e eosinófilos (medula óssea) de 41 cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i> segundo os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney corrigido pelo método de BY	50
Tabela 8	Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados das variáveis hemácias, hematócrito, hemoglobina, VGM, CHGM, eosinófilos (sangue periférico) e eosinófilos (medula óssea) de acordo com a classificação clínica de 41 cães naturalmente infectados por <i>L. (L.) chagasi</i>	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADI – Anemia da doença inflamatória
AHI – Anemia hemolítica imunomediada
BMO – Biopsia de medula óssea
CE – Corrida eletroforética
Ceua – Comissão de Ética no Uso de Animais
CHGM – Concentração de hemoglobina globular média
DPP – Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma
Elisa – Ensaio de imunoadsorção ligado à enzima
FEC-GM – Fator estimulante de colônias granulocíticas e colônias de macrófagos
Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
TNF α – Fator de necrose tumoral alfa
H – Hemácias
Hb – Hemoglobina
Ht – Hematócrito
ICQ – Imunocitoquímica
IL – Interleucina
IHQ – Imunohistoquímica
Ipec – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Labclin – Laboratório de Análises Clínicas
Lab-Vigileish – Laboratório de Vigilância em Leishmaniose
LapClin-Dermzoo – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
LG – Leucometria global
LV – Leishmaniose visceral
LVC – Leishmaniose visceral canina
M:E – Relação mieloide:eritroide
MO – Medula óssea
MS – Ministério da Saúde
RIFI – Reação de imunofluorescência indireta
RJ – Rio de Janeiro
SHEM – Seção de Hematologia
Sin. – Sinônimo
SMF – Sistema monocítico fagocitário
Unesp – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
SP – São Paulo

VGM – Volume globular médio
WHO (World Health Organization) – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVO GERAL	2
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	A LEISHMANIOSE VISCERAL.....	3
2.2	A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	6
2.3	MEDULA ÓSSEA	9
2.4	IMUNOCITOQUÍMICA	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1	ÉTICA	15
3.2	DESENHO DO ESTUDO E CÁLCULO AMOSTRAL.....	15
3.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA	16
3.4	COLETA DE MATERIAL	17
3.4.1	Sangue total	17
3.4.2	Medula óssea	17
3.4.3	Coleta de fragmentos de pele íntegra, linfonodo e baço para isolamento e identificação de <i>Leishmania</i> sp.	20
3.5	EXAMES LABORATORIAIS	21
3.5.1	Hemograma	21
3.5.2	Mielograma	21
3.5.3	Avaliação dos estoques de ferro medular	23
3.5.4	Imunofenotipagem de linfócitos medulares	24
3.5.5	Isolamento em cultura de <i>Leishmania</i> sp. e caracterização isoenzimática	25
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	26
4	RESULTADOS	28
4.1	ANIMAIS	28
4.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS	28
4.3	EXAMES LABORATORIAIS	30

4.3.1	Hemograma	30
4.3.2	Mielograma	33
4.3.2.1	<i>Celularidade</i>	33
4.3.2.2	<i>Série megacariocítica</i>	34
4.3.2.3	<i>Série eritroide</i>	35
4.3.2.4	<i>Série mieloide</i>	36
4.3.2.5	<i>Relação mieloide:eritroide</i>	38
4.3.2.6	<i>Série linfoide</i>	38
4.3.2.7	<i>Série monocítica</i>	41
4.3.2.8	<i>Demais achados presentes na medula óssea</i>	43
4.3.3	Avaliação dos estoques de ferro medular	44
4.3.4	Imunofenotipagem de linfócitos medulares	46
4.4	ASSOCIAÇÃO: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E EXAMES LABORATORIAIS	49
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
	ANEXO	79
	ANEXO A	80

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença crônica causada por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, transmitida a seres humanos e animais através da picada de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Endêmica em inúmeras áreas dos trópicos, sub-trópicos e bacia do mediterrâneo, a LV é considerada uma das mais importantes doenças negligenciadas da atualidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2013).

No Brasil, a LV representa um importante problema de saúde pública devido a sua elevada incidência, ampla distribuição geográfica e crescente expansão para os centros urbanos de grande e médio porte. Canídeos domésticos, considerados os principais reservatórios urbanos, desempenham um papel fundamental na transmissão e manutenção da doença, uma vez que infectados podem manter-se clinicamente assintomáticos durante um longo período (HARHAY et al., 2011).

Classicamente, a leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença crônica, cujas manifestações clínicas são dependentes de fatores do hospedeiro (resposta imune mediada por células, resposta imune humoral e citocinas) e virulência do parasita (FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS, 2009). Apresenta amplo espectro de sinais clínicos e variados graus de severidade (FONT et al., 1994; CIARAMELLA et al., 1997; MORENO, 1999; ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; HONSE et al., 2013; RIGO et al., 2013).

Alterações da medula óssea (MO) como síndrome hemofagocítica e mielodisplasia das linhagens sanguíneas vêm sendo relatadas em pacientes humanos com LV (YARALI et al., 2002; KOPTERIDES et al., 2003; CASTRO et al., 2013). Contudo, pouco se tem estudado a respeito de alterações medulares em cães com leishmaniose visceral.

Face à escassez de relatos referentes às alterações citopatológicas da medula óssea de cães com leishmaniose visceral, o presente estudo teve por objetivos:

1.1 Objetivo geral

- Descrever as alterações citopatológicas da medula óssea e perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral.

1.2 Objetivos específicos

- Descrever a ocorrência de amastigotas na medula óssea de cães com leishmaniose visceral por meio de exame citopatológico,
- Avaliar os estoques de ferro medular em cães com leishmaniose visceral por meio de exame citopatológico,
- Caracterizar e quantificar as sub-populações de linfócitos presentes na medula óssea de cães com leishmaniose visceral através da técnica de imunocitoquímica,
- Descrever as alterações clínicas observadas em cães com leishmaniose visceral,
- Verificar a associação entre a classificação clínica e os resultados do hemograma e mielograma de cães com leishmaniose visceral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A LEISHMANIOSE VISCERAL

A LV é uma doença parasitária de importância médica e veterinária, endêmica em inúmeras áreas dos trópicos, sub-trópicos e bacia do mediterrâneo (MICHALSKY et al., 2007). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (2010), a LV mata cerca de 50.000 pessoas todo ano, com uma incidência estimada de 500.000 novos casos por ano no mundo, sendo 90% deles concentrados na Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil.

A LV é causada por protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios do sistema monocítico fagocitário, sendo transmitida ao ser humano e animais através de insetos hematófagos fêmeas da sub-família Phlebotominae (DEANE e DEANE, 1962).

Os agentes etiológicos da LV são *Leishmania (Leishmania) donovani* (Sudão, Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal), *Leishmania (Leishmania) infantum* (região do Mediterrâneo, Ásia, China e norte da África) e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (América Latina, exceto Chile e Uruguai) (CHAPPUIS et al., 2007). Alguns pesquisadores consideram *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* sinônimos e questionam a sua classificação separadamente (KILLICK-KENDRICK 1985, RIOUX et al., 1990, DANTAS-TORRES, 2006). Entretanto, diferenças entre estas espécies quanto à antigenicidade e estrutura molecular foram evidenciadas, o que reforça a discriminação entre ambas (SHAW, 1994; LAINSON e RANGEL, 2005; SHAW, 2006).

Os vetores incriminados na transmissão da LV são flebotomíneos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (ALVAR et al., 2004). Outras formas de transmissão da LV incluem: transfusão de sangue, congênita, acidentes em laboratórios e utilização de drogas injetáveis (CRUZ et al., 2002; QUINNELL e COURTENAY, 2009).

No ambiente silvestre, os principais reservatórios da LV são as raposas e marsupiais. No ambiente urbano, o cão doméstico é considerado a principal fonte de infecção para o vetor (COURTENAY et al., 2002; MICHALSKY et al., 2007).

Em termos epidemiológicos, existem dois tipos de LV que se diferem pelo modo da transmissão: LV zoonótica, transmitida do animal para o vetor e deste para o homem e LV antroponótica, transmitida do homem para o vetor e deste para o homem (CHAPPUIS et al., 2007). A LV zoonótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. (L.) chagasi* (sin. *L. (L.) infatum*), enquanto que a LV antroponótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. (L.) donovani* (ALVAR et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2007).

A LV pode ser diagnosticada através de métodos parasitológicos (diretos e indiretos), sorológicos (reação de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático) e/ou moleculares (reação em cadeia da polimerase), associados às evidências clínicas e epidemiológicas (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGGO et al., 2011).

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados em função da sua ampla distribuição geográfica. O país soma cerca de 90% dos casos relatados nas Américas e é o terceiro maior foco global da doença (BERN et al., 2008).

Desde 1980, casos de LV vêm sendo relatados nas regiões Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste do país. Inicialmente conhecida como uma doença de caráter eminentemente rural, a LV vem se tornando endêmica e epidêmica em inúmeras cidades brasileiras (WERNECK, 2008).

Recentemente, casos autóctones de LVC foram relatados nas cidades de Jaboticabal (SP) (SAKAMOTO et al., 2007), Maricá (RJ) (PAULA et al. 2009), Volta Redonda (RJ) (DE CAMPOS et al., 2012) e Florianópolis (SC) (FIGUEIREDO et al., 2012).

Degradação ambiental, falta de sanitização e precárias condições de vida, associadas à migração das populações rurais para os subúrbios das grandes cidades e ao contato próximo com cães e outros animais domésticos, vêm contribuindo para a adaptação e proliferação do vetor e urbanização da doença (MARZOCHI e MARZOCHI, 1997; COSTA-VAL et al., 2007; HARHAY et al., 2011).

No Brasil, *L. (L.) chagasi* é o agente etiológico da LV e sua transmissão está associada ao flebotômíneo *Lutzomyia longipalpis*, encontrado nas cinco regiões geográficas do país. No estado do Rio Grande do Sul, o primeiro registro da ocorrência de *Lu. longipalpis* ocorreu em dezembro de 2008 (SOUZA et al., 2009). No estado do Mato Grosso do Sul, *Lu. cruzi* também tem sido considerada espécie transmissora da LV (DOS SANTOS et al., 1998).

No território brasileiro, os reservatórios silvestres da LV são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). Cães (*Canis familiaris*) são considerados a principal fonte de infecção da doença no ambiente urbano, desempenhando papel importante na manutenção do ciclo epidemiológico da LV no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) uma vez que:

- Mantêm contato próximo e frequente com humanos e outros cães;
- A doença é mais prevalente na população canina que na população humana;
- Podem apresentar infecção assintomática e;
- Apresentam alto grau de parasitismo na pele íntegra e vísceras, fato que favorece a infecção dos vetores (DI LORENZO et al., 2000; FEITOSA et al., 2000).

2.2 A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A LVC é uma doença severa de evolução lenta e início insidioso, cujas manifestações clínicas são dependentes de fatores do hospedeiro (reposta imune celular e humoral, citocinas) e virulência do parasita (CIARAMELLA et al., 1997; FERNÁNDEZ-BELLON et al., 2005; SARIDOMICHELAKIS, 2009), apresentando variados graus de severidade (FONT et al., 1994; CIARAMELLA et al., 1997; MORENO, 1999; ALVAR et al., 2004; BANETH et al., 2008; HONSE et al., 2013; RIGO et al., 2013)

Na infecção por *Leishmania*, as células do sistema monocítico fagocitário atuam como células apresentadoras de antígeno, estimulando o linfócito T CD4+ auxiliar tipo 1 (Th1) ou auxiliar tipo 2 (Th2) (LIEW e O'DONNELL, 1993). Quando ativadas as células Th1, há produção de citocinas tais como interferon γ , fator de necrose tumoral, interleucina 2 (IL-2) e interleucina 12 (IL-12), que ativam macrófagos. Estas células por sua vez, estimulam a ativação de outras células e sua própria proliferação, além de produzirem óxido nítrico, principal molécula responsável pela morte intracelular do parasito *Leishmania*, eliminando a infecção (IKEDA et al., 2003). Em contraste, quando ativadas as células Th2, há produção de citocinas tais como IL-4, IL-6, IL-10 e proliferação de células B, com consequente produção de anticorpos (PINELLI et al, 1994). Essa resposta, não protetora e deletéria, por sua vez, permite o desenvolvimento da doença. Um perigo potencial da regulação prejudicada do linfócito T e exacerbada ativação do linfócito B é a geração de grande quantidade de imunocomplexos (MAKNI et al., 1989). Na infecção natural estão ativados ambos os subtipos de células (Th1 e Th2) e a variedade de sinais clínicos e gravidade da doença dependem do equilíbrio entre estes dois sistemas (VALLADARES et al., 1998, BANETH et al., 2008).

Classicamente, a LVC é caracterizada por mucosas hipocoradas, emagrecimento, febre intermitente, linfadenopatia e lesões cutâneas, caracterizadas por alopecia, descamação,

eczema e úlceras, geralmente localizadas nas orelhas, focinho, cauda e articulações (ALVAR et al., 2004; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Com o avanço da doença, observa-se a presença de hiperqueratose, onicogrifose, esplenomegalia, hepatomegalia, lesões oculares (ceratoconjuntivite, uveíte, dentre outras) (CIARAMELLA et al., 1997), colite (FERRER et al., 1991), epistaxe (MORENO et al., 1998; CIARAMELLA e CORONA, 2003; CIARAMELLA et al., 2005), hematúria (CIARAMELLA e CORONA, 2003), coagulação intravascular disseminada (FONT et al., 1994; HONSE et al., 2013), neuralgia, poliartrite, polimiosite, glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite túbulo-intersticial associadas à severa proteinúria podendo levar à síndrome nefrótica e falência renal (RIGO et al., 2013), paresia dos membros posteriores, caquexia e inanição, levando o animal à morte (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Mancianti et al. (1988) sugerem que cães com LV sejam classificados de acordo com sinais clínicos da doença em: assintomáticos, ausência de sinais clínicos; oligossintomáticos, apresentando linfadenopatia, ligeira perda de peso e/ou alopecia; ou sintomáticos, mostrando todos ou alguns dos vários sinais da doença, como lesões cutâneas, onicogrifose, ceratoconjuntivite e rigidez dos membros posteriores, dentre outros.

Laboratorialmente, a anemia é uma das mais importantes alterações hematológicas observadas na LVC, geralmente causada pela perda de sangue (epistaxe e melena), hemólise (produção de auto-anticorpos, complexos imunes e instabilidade da membrana do eritrócito) ou diminuição da eritropoiese (anemia da doença inflamatória, deficiência de ferro, doença renal crônica e displasia eritroide) (JAIN, 1993; IKEDA et al., 2003; FREITAS et al., 2012).

Em relação à série leucocitária, alguns autores relatam a ocorrência de leucopenia (KEENAN et al., 1984; LONGSTAFFE e GUY, 1985), enquanto outros relatam a ocorrência de leucocitose com neutrofilia como um achado ocasional (CIARAMELLA et al., 1997;

BOURDOISEAU et al., 1997). Linfopenia pode ser observada em animais com quadro clínico grave da LV e linfocitose em quadros clínicos mais amenos (BOURDOISEAU et al., 1997). É comum a observação de monocitose, muitas vezes acompanhada de monócitos ativados em cães infectados (YAMAGUCHI et al., 1983; IKEDA et al., 2003; FREITAS et al., 2012).

A hiperproteinemia é um achado laboratorial comum na LVC e quase sempre está associada à hipoalbuminemia (LONGSTAFFE e GUY, 1985; CIARAMELLA et al., 1997) e/ou maior produção de anticorpos (IKEDA et al., 2003).

Trombocitopenia tem sido observada e atribuída à produção de auto-anticorpos, complexos imunes, hipoplasia da série megacariocítica da medula óssea e doenças concomitantes. Variações nos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada e fibrinólise foram observadas por diversos autores (MORENO et al., 1998; VALLADARES et al., 1998; MORENO, 1999; PELAGALLI et al., 2004; CIARAMELLA et al., 2005; CORTESE et al., 2006; HONSE, 2008; HONSE et al., 2013).

Alterações na medula óssea de cães com LV tem sido pouco estudadas, porém alguns relatos têm sido descritos (TRYPHONAS et al. 1977; CAMPOS, 2005; TRÓPIA DE ABREU et al., 2011, NICOLATO et al., 2013).

2.3 MEDULA ÓSSEA

A MO é o principal órgão responsável pela hematopoiese em animais adultos sadios (GRINDEM et al., 2002). Nos animais em crescimento, ela ocorre no interior de ossos longos e chatos. À medida que o animal envelhece, a região do canal medular é substituída por tecido adiposo, confinando a medula ativa nos locais onde há osso esponjoso (HARVEY, 2001).

A função primária da MO é a produção de células eritroides, mieloides, megacariocíticas e linfocitárias. Ela fornece informações sobre o *status* hematopoiético do indivíduo e deve sempre ser avaliada juntamente com o exame de sangue periférico (hemograma) (JAIN, 1993).

O exame citológico da MO deve ser solicitado nas situações em que as informações relativas à hematopoiese não possam ser obtidas através do hemograma, sendo indicada especialmente nos casos de anemia arregenerativa, leucopenias e trombocitopenias persistentes ou de origem desconhecida, toxicidade por drogas, doenças infiltrativas, nos distúrbios mieloproliferativos ou linfoproliferativos e pesquisa de parasitos (DIEBOLD et al., 2000). Além disso, pode ser utilizado para estadiamento de doenças neoplásicas como linfomas e mastocitomas e avaliação de estoque de ferro medular. Também pode ser muito útil na determinação de causas de hiperproteinemia e hipercalemia quando associada a neoplasias (OLIVEIRA, 2008).

Poucas são as contra-indicações para a coleta de medula óssea. A contenção, sedação e anestesia impõem um risco maior ao animal do que o procedimento em si (PERMAN et al., 1974; HARVEY, 2001). Embora a trombocitopenia e hiperglobulinemia monoclonal possam levar ao sangramento local após a coleta, estas não são contra-indicações absolutas. Nestes

casos, recomenda-se a coleta em local que permita o controle da hemorragia por pressão digital (GRINDEM et al., 2002).

Na medicina veterinária, a punção aspirativa da MO é realizada mais frequentemente do que a biopsia de medula óssea (BMO) utilizada para a avaliação histopatológica. A punção aspirativa é fácil, rápida e menos dispendiosa do que a biopsia, que necessita de agulhas especiais e posterior processamento. Embora a BMO seja um método mais preciso para avaliação da celularidade medular e diagnóstico de enfermidades como mielofibrose, mieloesclerose e focos de infecção, além de avaliar a quantidade de gordura presente no interior da medula, a avaliação da morfologia celular por este método é de difícil acesso (HARVEY, 2001; GRINDEM et al., 2002).

Em cães e gatos, a MO pode ser obtida na epífise dos ossos longos e nas regiões do íleo. Nos cães, a crista ilíaca tem sido utilizada por diversos autores como via de acesso para coleta de MO pela facilidade de localização (ZAMPROGNO, 2007; SALGADO, 2008). Contudo, em cães de pequeno porte e gatos, a coleta de amostras medulares pode ser facilitada na região trans-ilíaca ou porção proximal do fêmur (RASKIN, 1998).

Para cães obesos ou musculosos, a porção crânio-lateral da tuberosidade maior do úmero é uma ótima opção para coleta de material, além da epífise proximal da tíbia, ótima região para obtenção de grande quantidade de material (RASKIN, 1998; ZAMPROGNO, 2007).

Amostras de MO também podem ser coletadas do esterno e costela, porém há risco de penetração inadequada, levando a danos nas estruturas da cavidade torácica. Neste caso, agulhas curtas devem ser utilizadas e cuidados devem ser tomados para mantê-las na região central do esterno/costela, minimizando o risco de pneumotórax, hemorragias e laceração cardíaca (HARVEY, 2001).

As células medulares são divididas em seis grupos: série megacariocítica, série eritroide, série mieloide, série linfoide, série monocítica e outras células, normalmente encontradas na MO, mas que não se enquadram nos grupos acima citados – hematogônias, células mitóticas, células reticulares e células degeneradas (JAIN, 1993; GRINDEM et al., 2002).

A série megacariocítica é composta pelo megacarioblasto, pró-megacariócito, megacariócito basofílico e megacariócito. A série eritroide é composta pelo rubroblasto, pró-rubricito, rubricito basofílico, rubricito policromático, metarrubricito e reticulócito. A série mieloide é composta pelo mieloblasto, pró-mielócito, mielócito (neutrofílico, eosinofílico e basofílico), metamielócito (neutrofílico, eosinofílico e basofílico), bastão (neutrofílico, eosinofílico e basofílico), neutrófilo, eosinófilo e basófilo. A série linfoide é composta pelo linfoblasto, pró-linfócito e linfócito pequeno. A série monocítica é composta pelo monoblasto, pró-monócito e monócito (JAIN, 1993; HARVEY, 2001).

O estudo do mielograma é realizado nas espículas medulares e inclui a avaliação da celularidade, análise qualitativa e quantitativa dos tipos celulares que compõem a MO e avaliação da relação mieloide-eritroide (M:E), que expressa a proporção do número total de células da série granulocítica (mieloide) e o total de eritrócitos nucleados da série eritrocítica (eritroide). A avaliação dos estoques de ferro medular também deve ser incluída durante a avaliação do mielograma (HARVEY, 2001).

As síndromes mielodisplásicas são um grupo heterogêneo de alterações adquiridas da linhagem hematopoiética (*stem cells*) que ocorre em animais e humanos. As doenças podem ser primárias ou secundárias e são caracterizadas por anemia e/ou leucopenia ou trombocitopenia, juntamente com alterações displásicas únicas ou múltiplas da medula óssea (WEISS e AIRD, 2001).

As causas secundárias de mielodisplasias não têm sido estudadas extensivamente em animais, mas incluem mielofibrose, trombocitopenia imunomediada, anemia hemolítica imunomediada, policitemia vera, piometra, trombopatia e drogas anti-neoplásicas (WEISS e AIRD, 2001). Walton et al. (1996) relataram que altos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interferon γ apresentam papel importante em síndromes mielodisplásicas, juntamente com demais citocinas em cães e gatos.

Na LV humana, alterações da MO incluem síndrome hemofagocítica e mielodisplasia das linhagens sanguíneas (YARALI et al., 2002; KOPTERIDES et al., 2003). Pouco se tem estudado a respeito de alterações medulares em cães com LV. Tryphonas et al. (1977) observaram hipoplasia da série eritroide com maturação completa e ordenada, aumento de plasmócitos e monócitos, hiperplasia da série mieloide e relação M:E aumentada em um cão com LV. Achados semelhantes foram encontrados por Tafuri et al. (2001). Campos (2005) observou hiperplasia linfoplasmocítica e hipoplasia eritroide em cães com LV. Em 2006, Foglia Manzillo et al. (2006) relataram a presença de hipoplasia eritroide, hiperplasia mieloide e displasia megacariocítica em cães com LV. Trópia de Abreu et al. (2011) relataram a presença de hipoplasia eritroide, além do aumento de precursores neutrofílicos, linfócitos e plasmócitos na LVC. Recentemente, Nicolato et al. (2013) relataram hipoplasia eritroide associada à anemia, além do aumento da população de neutrófilos e seus precursores e redução de eosinófilos e seus precursores em cães sintomáticos naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. Segundo os autores, estes animais também exibiram aumento de linfócitos medular e linfopenia periférica.

2.4 IMUNOCITOQUÍMICA

Imunocitoquímica (ICQ), assim como imunohistoquímica (IHQ), são metodologias que utilizam anticorpos para localizar e identificar estruturas teciduais que funcionam como antígenos *in situ*. A técnica é baseada em um conjunto de reações específicas fundamentada na interação antígeno-anticorpo, que ao final do processo, conferem cor ou eletrodensidade à estrutura em estudo. Ela permite a conjugação de um marcador a um anticorpo, proteína ou composto sem causar dano à ligação estabelecida entre o anticorpo e o antígeno, possibilitando a visualização microscópica, seja ele um componente celular normal ou patogênico (STERNBERGER, 1986).

Na ICQ, as amostras que podem ser analisadas incluem esfregaços sanguíneos, aspirados, *swabs*, cultura de células, suspensão de células e citospinas. Cada amostra é tratada diferentemente, ainda que toda metodologia seja semelhante (JAVOIS, 1999).

Na medicina veterinária, a ICQ tem sido empregada como ferramenta diagnóstica de suporte ao diagnóstico citológico de neoplasias. Em casos de suspeita clínica de linfoma, a determinação da linhagem de células B e T pode não somente diferenciar as populações linfoides de mieloides, como também ajudar a estabilizar a probabilidade de clonagem celular (VALLI et al., 2009). Nos casos de leucemia aguda, onde nem sempre é possível diferenciar neoplasias linfoides de mieloides utilizando colorações de rotina como Romanowsky, marcadores imunocitoquímicos como a mieloperoxidase vêm sendo utilizados para identificação de células mieloides.

O diagnóstico de neoplasias de células redondas pouco diferenciadas, melanomas amelanóticos e detecção de metástases em linfonodos também vem sendo facilitado pelo uso de técnicas imunocitoquímicas. Outras aplicações incluem o diagnóstico de infecções virais,

como a coloração de macrófagos de gatos com peritonite infecciosa felina (VALLI et al., 2009), e a detecção de amastigostas contribuindo para diagnóstico de leishmaniose (LYNCH et al., 1986).

De acordo com Filho et al. (1993), as técnicas de ICQ e IHQ apresentam grande sensibilidade e especificidade e por isso ocupam um papel em destaque na investigação e diagnóstico anatomo-citopatológico das leishmanioses.

Barrouin-Melo et al. (2006) padronizaram a técnica de ICQ e IHQ para avaliar a população de leucócitos do baço de cães com LV através da técnica de punção por agulha fina, relatando um aumento relativo na contagem de neutrófilos e monócitos/macrófagos e uma diminuição relativa na contagem de linfócitos quando comparados a animais saudáveis.

Atualmente, com uma maior disponibilidade de anticorpos monoclonais capazes de interagir com antígenos de células linfoides humanas, muitas dificuldades diagnósticas puderam ser solucionadas (ALVES et al., 1999; BACCHI e BACCHI, 1999). A reatividade cruzada destes anticorpos com outras espécies possibilitou a determinação do imunofenótipo de células linfoides caninas, com grande aplicabilidade nos casos de neoplasias linfoides de cães (APPELBAUM et al., 1984; TESKE et al., 1994; MILNER et al., 1996; DARBES et al., 1997; FOURNEL-FLEURY et al., 1997).

A utilização de anticorpos policlonais e monoclonais passaram a apresentar grande aplicabilidade na medicina veterinária como o anticorpo policlonal anti-CD3, um marcador de superfície celular altamente sensível e específico para a demonstração das células linfóides T, e o anticorpo monoclonal anti-mb I CD79a (clone HM57), que além de um marcador de superfície celular, reage contra antígenos humanos e caninos, detectando a linhagem de células linfoides B em seus diferentes momentos de diferenciação, sendo, portanto, um marcador de amplo espectro e alta especificidade (ALVES et al., 1999; BACCHI e BACCHI, 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÉTICA

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (Ceua/Fiocruz) sob a licença LW-46/12.

3.2 DESENHO DO ESTUDO E CÁLCULO AMOSTRAL

Trata-se de um estudo descritivo com amostra não probabilística de conveniência.

A população alvo do estudo foi constituída por cães adultos, machos ou fêmeas, residentes no estado do Rio de Janeiro, soro-reatores para leishmaniose no teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma (DPP) e no ensaio de imunoadsorção ligado à enzima (ELISA), encaminhados à eutanásia, que apresentassem isolamento em cultura parasitológica e caracterização isoenzimática de *Leishmania (Leishmania) chagasi*.

Foram utilizados como critérios de exclusão:

- Animais com isolamento negativo em cultura parasitológica
- Animais com isolamento positivo para outras espécies de *Leishmania*.

- Presença de alterações medulares neoplásicas.
- Amostras citológicas não diagnósticas.

Amostras citológicas não diagnósticas – Nesta categoria foram incluídos os esfregaços que apresentaram amostras acelulares ou pouco celulares, excessiva ruptura celular, dessecamento, sobreposição e colorações inadequadas.

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (LapClinDermzoo – Ipec/Fiocruz – RJ) em colaboração com a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) do Estado do Rio de Janeiro, Laboratório de Análises Clínicas (Labclin – Ipec/Fiocruz – RJ) – Seção de Hematologia (SHEM), Laboratório de Vigilância em Leishmaniose (Vigileish – Ipec/Fiocruz – RJ) e Laboratório de Imunohistoquímica Veterinária do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Unesp (Botucatu) – São Paulo.

3.3 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Para realização do exame clínico, os animais foram contidos mecanicamente com a utilização de mordanças e quimicamente através da associação de cloridrato de quetamina 10% (10mg/Kg) e maleato de acepromazina 1% (0,1mg/Kg) por via intramuscular (seringa 25x7mm).

O exame clínico incluiu: inspeção de pele e mucosas e palpação de linfonodos e órgãos abdominais.

3.4 COLETA DE MATERIAL

Foram coletadas amostras de sangue total para realização do hemograma; MO para realização do mielograma, avaliação de estoques de ferro medular, imunocitoquímica e cultura parasitológica; e fragmentos de pele íntegra, baço e linfonodo para realização de cultura parasitológica.

3.4.1 Sangue total

Amostras de sangue total foram coletadas da veia cefálica ou jugular através de sistema de coleta a vácuo, após tricotomia e antissepsia local com álcool 70%. Foram utilizadas agulhas de coleta múltipla 21G1 (25x0,8mm), adaptador padrão (Greiner Bio-One) e frascos contendo como anticoagulante o EDTA 10% (K₂ EDTA, BD Vacutainer) na proporção de 0,1mL para cada 5mL de sangue. Evitou-se a compressão prolongada e múltiplas punções.

3.4.2 Medula óssea

Para realização da punção de MO, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (Thionembutal[®], Abbott) na dose de 8mg/kg de peso vivo via endovenosa.

O procedimento foi realizado na crista ilíaca utilizando-se agulhas especiais para punção aspirativa de MO. Foram utilizadas agulhas UNIGRIP-KLIMA LUER LOCK[®], cujas dimensões variaram entre 1,5mm, 1,8mm e 2,0mm de acordo com o tamanho e peso do animal. Os cães foram mantidos em decúbito lateral com os membros anteriores e posteriores próximos, de modo a flexionar-se a coluna e facilitar o acesso à crista ilíaca.

Após a tricotomia e antissepsia local, posicionou-se a agulha com o mandril sobre a crista ilíaca e por meio de movimentos rotatórios foi exercida pressão até que a mesma atingisse o canal medular. Após a retirada do mandril, uma seringa descartável de polietileno de 20mL foi conectada para a aspiração do material medular (Figura 1).

Cerca de 0,5mL de MO foi aspirado por coleta em EDTA a 3% diluído em solução fisiológica estéril. Após a retirada da agulha, juntamente com a seringa, procedeu-se a homogeneização da amostra, que foi transferida para uma placa de *Petri* para a captura das espículas medulares (Figura 2) com o auxílio de um tubo capilar (microhematócrito).

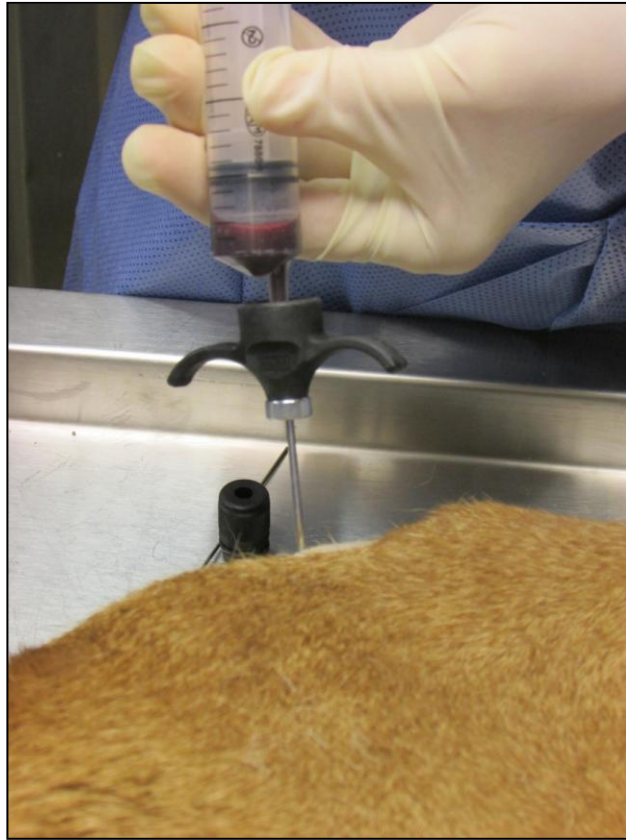


Figura 1. Canino, macho, S.R.D. Punção aspirativa de medula óssea em crista ilíaca.



Figura 2. Aspirado de medula óssea de cão com LVC. Placa de *Petri* contendo inúmeras espículas medulares (seta preta).

Para avaliação do mielograma e estoques de ferro medular foram confeccionados esfregaços em lâminas de microscopia desengorduradas com álcool 70%. Para a imunofenotipagem de linfócitos medulares foram confeccionados esfregaços em lâminas de microscopia silanizadas.

Cerca de quatro gotas do material aspirado foram diretamente semeadas em meio de cultura (NNN) para isolamento de *Leishmania* sp.

Após a punção de MO, os animais foram submetidos à eutanásia com *overdose* (doses três vezes maiores àquelas utilizadas em anestesia) intravenosa de tiopental sódico 5% (seringa 25x7mm, veia cefálica) de acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde, contidas no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A morte dos animais foi confirmada através de parada cardio-respiratória, aferida pela palpação de pulso femoral e ausculta cardíaca.

3.4.3 Coleta de fragmentos de pele íntegra, linfonodo e baço para isolamento e identificação de *Leishmania* sp.

Imediatamente após a eutanásia dos animais, fragmentos de pele íntegra, baço e linfonodo foram coletados com auxílio de *punch* de 4mm (Kolplast CI) e acondicionados em solução salina contendo penicilina G potássica e 5'fluorocitosina à temperatura de 4°C. As amostras foram encaminhadas ao Vigileish (Ipec - Fiocruz) para isolamento e posterior caracterização.

Antes da retirada dos fragmentos de pele íntegra, o local era devidamente limpo com água e sabão, sendo realizada em seguida a antissepsia do mesmo com álcool a 70%.

3.5 EXAMES LABORATORIAIS

3.5.1 Hemograma

As amostras de sangue periférico destinadas à realização do hemograma foram encaminhadas à SHEMA (Ipec) - Fiocruz.

A contagem total de células sanguíneas, incluindo plaquetometria, foi realizada em contador automático de células (COULTER Modelo T-890) e conferida através de esfregaços sanguíneos (JAIN, 1993; MEYER e HARVEY, 2004).

Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados em lâminas de microscopia (tamanho 26x76mm e espessura 1,2mm) limpas e desengorduradas em álcool a 70% imediatamente após a coleta. As lâminas foram fixadas em metanol durante cinco minutos e coradas pelo método de Romanowsky (Giemsa, Merck) por 15 minutos, para realização da contagem diferencial de leucócitos em contador manual de células sanguíneas (KACIL CCS-01) (Coles, 1984). A leitura das lâminas foi realizada por um único observador no LapClin-Dermzoo (IPEC) - Fiocruz.

3.5.2 Mielograma

A avaliação citológica da MO foi realizada a partir do esfregaço de espículas medulares obtidos pela técnica de compressão (*squash*). As lâminas foram fixadas durante cinco minutos e coradas pelo método de Romanowsky (Giemsa, Merck) por 30 minutos no

LapClin-Dermzoo (IPEC) - Fiocruz. A leitura das lâminas foi realizada por um único observador.

A celularidade da medula óssea foi estimada examinando-se a proporção de células versus gordura presentes nas espículas. Em espículas compostas por mais de 75% de células, a MO foi considerada hiper celular; em espículas compostas por mais de 75% de gordura, a MO foi considerada hipocelular.

Megacariócitos foram avaliados quanto à frequência, maturidade e morfologia. A frequência foi estimada avaliando-se cinco campos em objetiva de 10x. Quando 12 ou mais megacariócitos foram observados por campo, a série megacariocítica foi considerada aumentada. Quando raros megacariócitos foram observados por campo, a série megacariocítica foi considerada diminuída.

As séries eritroides, mieloides, linfoides e monocíticas foram avaliadas quanto à maturidade e morfologia. As séries foram consideradas completas e ordenadas quando precursores imaturos e maduros encontravam-se presentes e aumentavam progressivamente de acordo com cada estágio de desenvolvimento.

A contagem diferencial foi realizada em 500 células (Kacil CCS-02), segundo classificação proposta por Jain (1993). A determinação da relação mieloide/eritroide (M:E) foi obtida dividindo-se o número total de células da série mieloide pelo número total de células nucleadas da série eritroide (HARVEY, 2001).

3.5.3 Avaliação dos estoques de ferro medular

A avaliação dos estoques de ferro medular foi realizada a partir do esfregaço de espículas medulares (*squash*) em lâminas de microscopia coradas pelo método Romanowsky (Giemsa, Merck) e pelo método de Perls (Azul da Prússia) (HAYHOE e QLAGLIONO, 1994), cuja técnica é descrita a seguir:

- ❖ Fixação das lâminas em metanol absoluto durante cinco minutos;
- ❖ Secagem ao ar;
- ❖ Acondicionamento das lâminas em cubas de vidro contendo volumes iguais de ferrocianeto de potássio a 2,5% e ácido clorídrico a 2,5% durante uma hora;
- ❖ Lavagem das lâminas em água destilada;
- ❖ Secagem das lâminas ao ar;
- ❖ Acondicionamento das lâminas em cubas de vidro contendo como solução corante a Eosina durante dois minutos;
- ❖ Lavagem em água destilada;
- ❖ Secagem ao ar;
- ❖ Leitura das lâminas.

3.5.4 Imunofenotipagem de linfócitos medulares

A avaliação ICQ dos linfócitos medulares foi realizada a partir do esfregaço de espículas medulares obtidos pela técnica de compressão (*squash*) em lâminas de microscopia silanizadas.

As amostras foram fixadas e armazenadas em álcool 95% imediatamente após serem confeccionadas e encaminhadas ao Laboratório de Imunohistoquímica Veterinária do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Unesp (Botucatu) – São Paulo.

As lâminas foram lavadas em água destilada e submetidas à recuperação antigênica em solução pré-aquecida de EDTA pH 8,0 por 30 minutos em banho-maria. Após este período, esperou-se cerca de 20 minutos para que as lâminas fossem resfriadas e então submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena 3% por 20 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas com solução tampão de TRIS pH 7,4 e incubadas com anticorpo primário anti-CD3 (1:100; Dako) e anti-CD79a (1:50; Dako) por 18 horas a 4C°. Como anticorpo secundário ligado à peroxidase foi utilizado o Kit EnVison Dual Link (Dako) por 1 hora a 27C°. As lâminas foram coradas por DAB e contra coradas com Hematoxilina de Harris (DE MOURA et al., 2001). Foram utilizados controles positivo e negativo que acompanhavam o *kit*.

Para avaliação quantitativa das sub-populações de linfócitos medulares, 200 células nucleadas foram contadas em torno das espículas medulares através da objetiva de 40x por um único observador. A proporção de linfócitos marcados foi expressa como porcentagem da população total de células avaliadas (DE WAELE et al., 1991, JAIN 1993, MORAES et al., 2009).

3.5.5 Isolamento em cultura de *Leishmania* sp. e caracterização isoenzimática

Os fragmentos de pele íntegra, baço e linfonodo foram acondicionados em solução salina contendo penicilina G potássica e 5' fluorocitosina e conservadas à temperatura de 4°C por 24 horas. Em seguida, as amostras foram semeadas em meio bifásico NNN (Novy, MacNeal, Nicole) contendo como fase líquida o meio Schneider's (*Drosophila medium* – Sigma), acrescido de 10% de soro fetal bovino.

As amostras de MO foram diretamente semeadas no meio de cultura (NNN).

Todas as culturas foram submetidas à temperatura de 26°-28°C em estufa biológica e examinadas a fresco semanalmente durante 40-50 dias buscando evidenciar formas flageladas.

Todos os isolados obtidos em meio de cultura (formas promastigotas) foram identificados por eletroforese de isoenzimas para caracterização etiológica. Inicialmente foi realizada a expansão parasitária para obtenção de cerca de 10^9 parasitos, a qual foi posteriormente submetida a lavagens em tampão próprio sob centrifugação até a obtenção de um sedimento próprio, que foi acondicionado em nitrogênio líquido (N₂) até a realização da corrida eletroforética (CE). Foram empregados cinco sistemas enzimáticos: 6PGDH, GPI, ME, NH (dois loci) e G6PDH baseados no protocolo de Cupolillo et al. (1994).

Para a realização da CE, preparou-se um gel de agarose 1% (Tipo V) em tampão de acordo com o sistema enzimático utilizado. Depois de totalmente dissolvida e fundida, a agarose foi colocada sobre um filme de poliestireno onde as amostras foram aplicadas.

A CE foi realizada empregando-se uma cuba de eletroforese horizontal devidamente acoplada a um banho-maria com circulação para manter a refrigeração em torno de 4°C. A revelação da atividade enzimática das amostras foi realizada colocando-se diretamente sobre o gel uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima, baseados nos protocolos já descritos na literatura

(CUPOLILLO et al., 1994). A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético a 5% e a mobilidade eletroforética dos isolados foi comparada com o padrão das amostras de referência.

As amostras de referência de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) e *Leishmania chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) foram empregadas em todas as CE.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram armazenados em Banco de Dados Access e analisados com auxílio do programa de análise estatística SPSS win v.16.

Foram descritas as frequências simples da classificação clínica dos cães estudados e as medianas e percentis 25 e 75% das variáveis contínuas dos parâmetros laboratoriais: hemácias, hemoglobina, hematócrito, VGM, CHGM, plaquetas, contagem total de leucócitos, contagem diferencial de basófilos, eosinófilos, mielócitos, metamielócitos, segmentados, linfócitos e monócitos do sangue periférico, contagem de mielócitos imaturos, mielócitos maduros, eritrócitos imaturos, eritrócitos maduros, basófilos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos (monócitos), relação mieloide:eritroide e contagem diferencial de linfócitos T e linfócitos B da MO.

Para verificar diferenças entre as distribuições das variáveis contínuas do hemograma e mielograma segundo a classificação clínica (assintomático, oligossintomático e sintomático), utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis e, posteriormente, o teste de Mann-Whitney com correção de BY (BENJAMINI e YEKUTIELI, 2001), para verificar entre quais grupos da classificação clínica estava a diferença. As medianas e os intervalos interquartílicos

foram utilizados para pontuar as diferenças. P-valores $<0,05$ indicaram valores significativos nos testes estatísticos utilizados.

4 RESULTADOS

4.1 ANIMAIS

Cinquenta cães, residentes no Estado do Rio de Janeiro, soro-reatores para leishmaniose visceral nos testes ELISA e DPP, encaminhados à eutanásia, foram atendidos no LapClin-Dermzoo (Ipec) - Fiocruz.

Quarenta e um animais foram incluídos no estudo por preencherem os critérios de inclusão.

Nove animais foram excluídos do estudo por preencherem um ou mais itens estabelecidos nos critérios de exclusão.

4.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS

Dos 41 animais incluídos no estudo, 24 (58,5%) eram machos e 17 (41,5%) eram fêmeas. Trinta e nove cães (95,1%) não apresentavam raça definida e dois (4,9%) pertenciam às raças: Teckel e Dogo Argentino. A idade dos animais variou entre um e 15 anos de idade.

Trinta e oito (92,7%) animais eram procedentes do município de Barra Mansa, dois (4,9%) animais do município de Niterói (Jacaré) e um (2,4%) do município de Resende.

De acordo com os sinais clínicos, os animais foram classificados em assintomáticos (n=13; 31,7%), oligossintomáticos (n=12; 29,3%) e sintomáticos (n=16; 39,0%). As principais alterações clínicas observadas foram emagrecimento, linfadenopatia, lesões cutâneas ulceradas, descamação furfurácea e mucosas hipocoradas. Um animal apresentou uma forma clínica atípica da doença caracterizada por tumoração localizada na gengiva do ramo maxilar direito (Figura 3) (Anexo A). Os demais achados clínicos encontram-se na tabela 1.



Figura 3. Canino, S.R.D., macho. Lesão tumoral localizada na gengiva do ramo maxilar direito (seta preta)

Tabela 1. Alterações clínicas observadas em 12 (29,3%) cães oligossintomáticos e 16 (39,0%) sintomáticos naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

Sinais Clínicos	Números	Porcentagem
Emagrecimento	17	41,4%
Lesões cutâneas ulceradas	13	31,7%
Mucosas hipocoradas	12	29,2%
Descamação furfurácea	12	29,2%
Linfadenopatia localizada	8	19,5%
Esplenomegalia	8	19,5%
Ceratoconjuntivite	7	17,0%
Linfadenopatia generalizada	6	14,6%
Onicogribose	5	12,1%
Desidratação	5	12,1%
Alopecia localizada	5	12,1%
Alopecia generalizada	4	9,7%
Pêlo opaco	3	7,3%
Melena	2	4,8%
Edema de membro	1	2,43%
Tumoração	1	2,43%

4.3 EXAMES LABORATORIAIS

4.3.1 Hemograma

Anemia foi observada em 27 (65,8%) cães. Destes animais, 13 (48,1%) apresentaram anemia normocítica normocrômica, quatro (14,8%) anemia normocítica hipocrômica, oito (29,6%) anemia microcítica normocrômica e dois (7,4%) anemia microcítica hipocrômica. Segundo a classificação clínica, cinco (18,5%) animais eram assintomáticos, sete (25,9%) eram oligossintomáticos e 15 (55,5%) eram sintomáticos.

Não foram observados hemoparasitas nas amostras analisadas. As alterações observadas na hematoscopia dos cães encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Achados da hematoscopia de 41 cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

Hematoscopia	Animais	Porcentagem
Monócitos ativados	12	29,2%
Hipocromasia	6	14,6%
Macroplaquetas	5	12,1%
Linfócitos reativos	4	9,7%
Rouleaux	4	9,7%
Anisocitose	4	9,7%
Metarrubricitos	3	7,3%
Agregados plaquetários	3	7,3%
Agglutinação	2	4,8%
Howell Jolly	2	4,8%
Policromasia	2	4,8%

O leucograma apresentou-se dentro dos parâmetros de normalidade em 22 (53,6%) animais. Leucopenia foi observada em dois (4,87%) animais, sendo que um animal apresentou leucopenia associada à neutropenia e linfopenia. Leucocitose foi observada em 17 (41,4%) cães, sendo que quatro animais apresentaram desvio nuclear de neutrófilos à esquerda (discreto a moderado).

Trombocitopenia foi observada em vinte e um (51,2%) cães. Destes animais, oito (38,1%) eram assintomáticos, cinco (23,8%) eram oligossintomáticos e oito (38,1%) eram sintomáticos.

Nas tabelas 3 e 4 observam-se os valores da mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do eritrograma, incluindo a plaquetometria, e leucograma, respectivamente, dos animais do estudo.

Tabela 3. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do eritrograma e plaquetometria de 41 cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

	Valores	Valores de Referência ^a
Eritrócitos (x10⁶/μL)	5,0 (4,0-6,0)	5,5-8,5
Hemoglobina (g/dL)	11,0 (7,5-13,0)	12,0-18,0
Hematócrito (%)	31,0 (22,5-36,5)	37-55
VGM** (fL)	62,0 (59,5-65,0)	60-77
CHGM** (%)	34,0 (33,0-36,0)	32,0-36,0
Plaquetas (x10³μL)	197 (134-253)	200-500

** VGM, volume globular médio; CHGM, concentração globular média de hemoglobina.

^a, Fonte: Jain (1993)

Tabela 4. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados do leucograma de 41 cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

	Valores	Valores de Referência ^a
LG** (/μL)	12540 (9850-15880)	6000-17000
Basófilo (/μL)	0,00 (0,00-0,00)	Raros
Eosinófilo (/μL)	259 (125-811)	100-1250
Mielócito (/μL)	0,00 (0,00-0,00)	Ausentes
Metamielócito (/μL)	0,00 (0,00-0,00)	Ausentes
Bastão (/μL)	0,00 (0,00-49)	0-300
Segmentado (/μL)	9744 (7270-11666)	3000-11500
Linfócito (/μL)	1540 (1063-1919)	1000-4800
Monócito (/μL)	298 (175-621)	150-1350

**LG, leucometria global; ^a, Fonte: Jain (1993)

4.3.2 Mielograma

4.3.2.1 Celularidade

Observou-se aumento da celularidade na MO de 39 animais (95,1%) (Figura 4). Destes animais, doze (30,7%) eram assintomáticos, onze (28,2%) eram oligossintomáticos e dezesseis (41,0%) eram sintomáticos.

Um animal sintomático apresentou diminuição da celularidade (2,4%) e um animal assintomático apresentou celularidade dentro dos parâmetros de normalidade (2,4%).

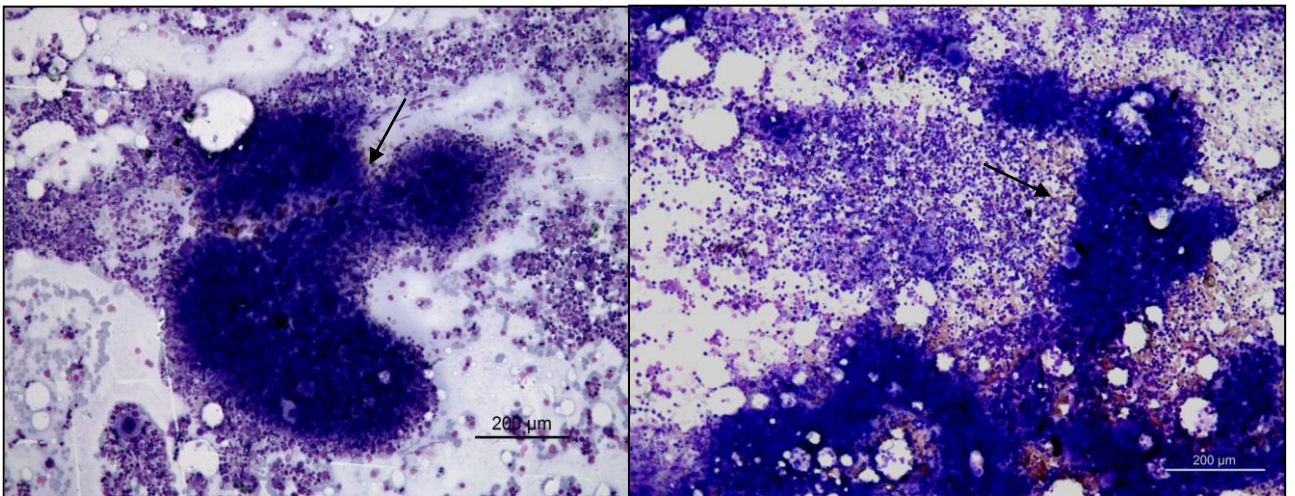


Figura 4. Aspirado de medula óssea. Canino. Espículas medulares exibindo hiper celularidade (setas pretas). Giemsa. 100x.

4.3.2.2 Série Megacariocítica

A série megacariocítica encontrou-se dentro dos padrões de normalidade em 26 animais (63,4%). Quatorze cães (34,1%) apresentaram aumento da série megacariocítica (hiperplasia megacariocítica) (Figura 5). Destes animais, três (21,4%) assintomáticos, sete (50,0%) eram oligossintomáticos e quatro (28,5%) eram sintomáticos.

Um animal (2,4%) animal apresentou diminuição da série (hipoplasia megacariocítica).

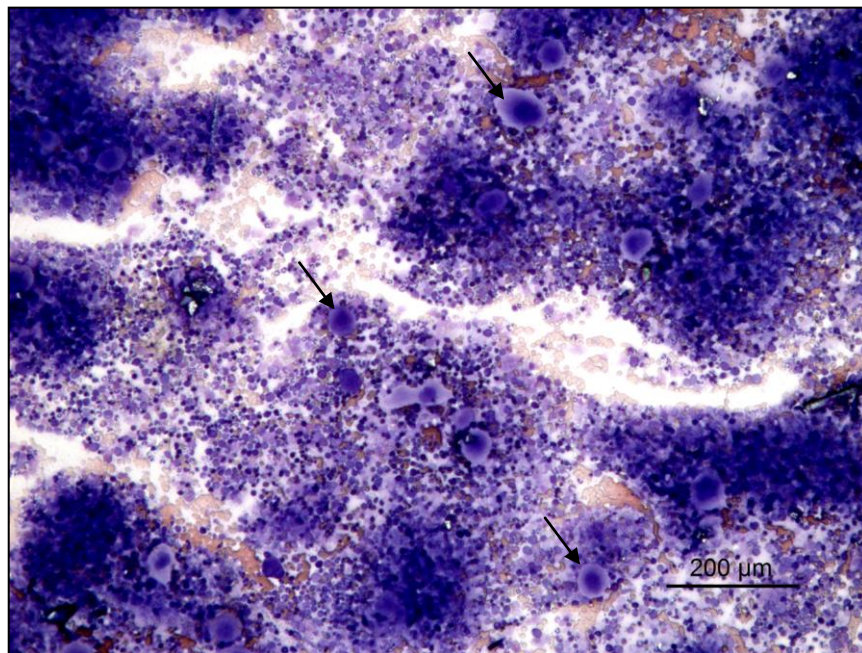


Figura 5. Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia megacariocítica (setas pretas). Giemsa. 100x.

4.3.2.3 Série Eritroide

Aumento da série eritroide (hiperplasia da série eritroide) foi observado em 20 (48,8%) animais. Vinte (48,8%) animais encontraram-se dentro dos padrões de normalidade e um (2,4%) animal apresentou diminuição da série eritroide (hipoplasia série eritroide).

A contagem diferencial da série eritrocítica esteve dentro dos parâmetros de normalidade em 20 cães (48,8%). Vinte cães (48,8%) apresentaram valores acima dos limites propostos por Jain (1993) (hiperplasia eritroide) (Figura 6). Destes animais, sete (35,0%) eram assintomáticos, sete (35,0%) eram oligossintomáticos e seis (30,0%) eram sintomáticos.

Um (2,4%) animal sintomático apresentou diminuição da série (hipoplasia eritroide).

Tais achados foram compatíveis com aqueles observados na avaliação qualitativa.

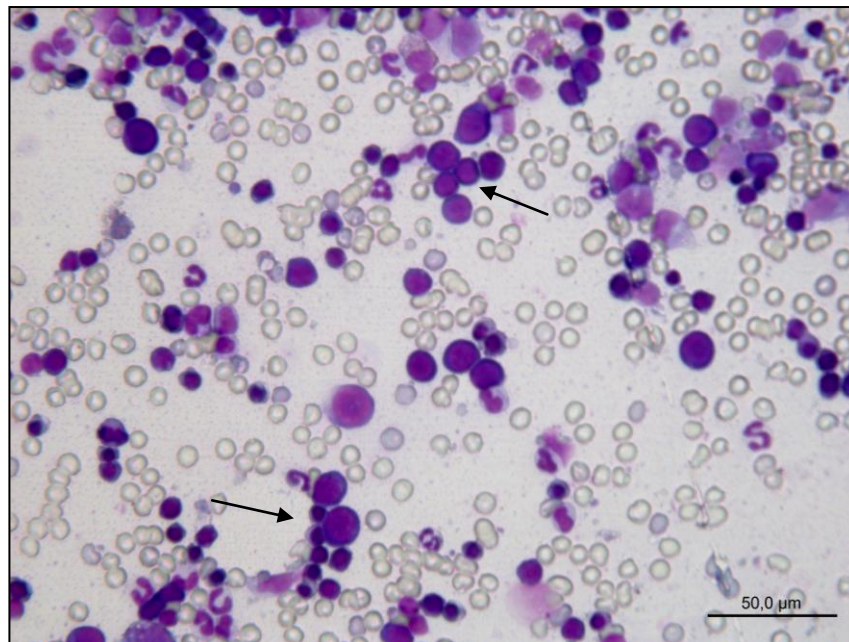


Figura 6. Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia eritroide (setas pretas). Giemsa. 400x.

4.3.2.4 Série Mieloide

Aumento da série granulocítica foi observado em 36 (87,8%) cães. Quatro (9,8%) animais encontraram-se dentro dos padrões de normalidade e um (2,4%) animal apresentou diminuição da série granulocítica (hipoplasia granulocítica), durante a avaliação qualitativa.

Trinta e seis (87,8%) cães apresentaram valores acima dos limites de normalidade na contagem diferencial da série granulocítica (hiperplasia granulocítica) (JAIN, 1993) (Figura 7). Destes animais, 13 (36,1%) eram assintomáticos, 11 (30,5%) eram oligossintomáticos e 12 (33,3%) eram sintomáticos.

Vinte e sete (75,0%) cães apresentaram um aumento expressivo da população imatura e madura de eosinófilos medulares (Figura 8). Destes animais, 11 (40,7%) eram assintomáticos, oito (29,6%) eram oligossintomáticos e oito (29,6%) eram sintomáticos. Em dez (37,0%) animais o aumento de eosinófilos foi acompanhado pelo aumento das demais células da série granulocítica. Em dezessete (63,0%) animais apenas o aumento da população de eosinófilos foi responsável pela hiperplasia da série mieloide.

Quatro (9,8%) cães apresentaram valores dentro dos limites propostos por Jain (1993) e um (2,4%) cão sintomático apresentou diminuição desta série (hipoplasia granulocítica).

Tais achados foram compatíveis com aqueles observados na avaliação qualitativa.

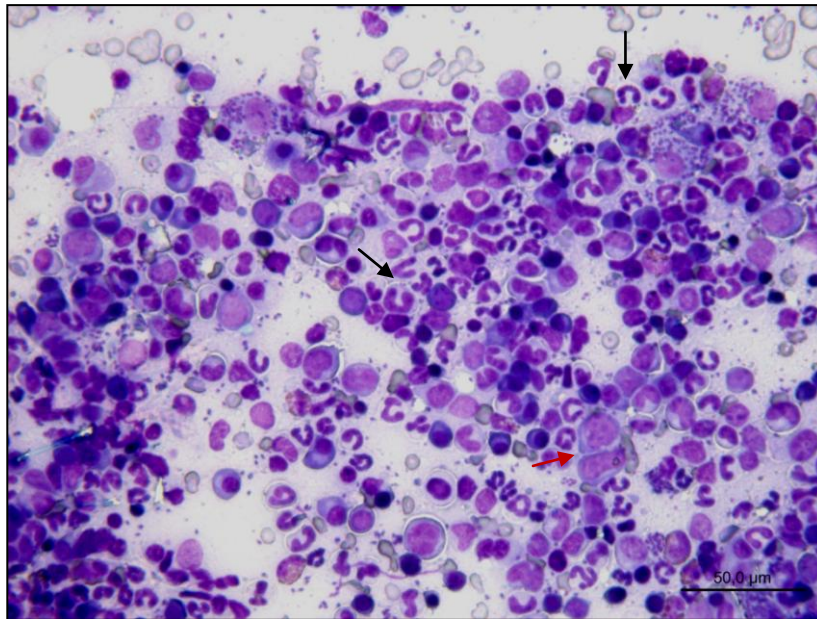


Figura 7. Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia granulocítica – Bastões (setas pretas). Precursores imaturos (seta vermelha). Giemsa. 400x.

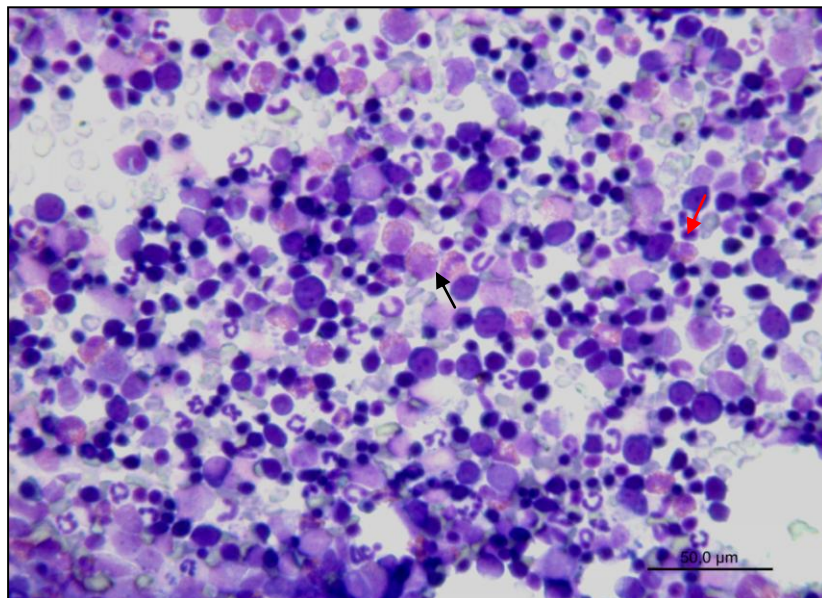


Figura 8. Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia eosinofílica. Precursores imaturos (seta preta). Precursores maduros (seta vermelha). Giemsa. 400x.

4.3.2.5 Relação mieloide:eritroide

Trinta e quatro (82,9%) animais apresentaram valores da relação mieloide:eritroide (M:E) dentro dos parâmetros de normalidade (Jain, 1993).

Quatro (9,7%) cães apresentaram aumento da relação M:E. Destes animais, um (25,0%) era assintomático, um (25,0%) era oligossintomático e dois (50,0%) eram sintomáticos.

Três (7,3%) cães apresentaram diminuição da relação M:E. Destes animais, um (33,3%) era oligossintomático e dois (66,6%) eram sintomáticos.

4.3.2.6 Série Linfoide

Quarenta (97,5%) animais apresentaram aumento da série linfoide, representada por linfócitos e, principalmente, plasmócitos, incluindo *Mott-Cell* e *Flame-cell*. Um animal (2,4%) apresentou resultado dentro dos padrões de normalidade.

A contagem diferencial de linfócitos esteve dentro dos parâmetros de normalidade em 37 cães (90,2%). Quatro (9,7%) cães apresentaram valores acima dos limites propostos por Mischke e Busse (2002). Destes animais, um (25,0%) era assintomático e três (75,0%) eram sintomáticos.

Aumento significativo foi observado na contagem diferencial de plasmócitos, abrangendo um total de 40 cães (97,5%) (Figura 9). Destes animais, 13 (32,5%) eram assintomáticos, 12 (30,0%) eram oligossintomáticos e 15 (37,5%) eram sintomáticos.

Mott-cell e *Flame-cell* estiveram presentes em 16 (39,0%) e oito (19,5%) cães do estudo, respectivamente (Figura 10).

Estes achados confirmam aqueles observados na avaliação qualitativa desta série (hiperplasia linfoide).

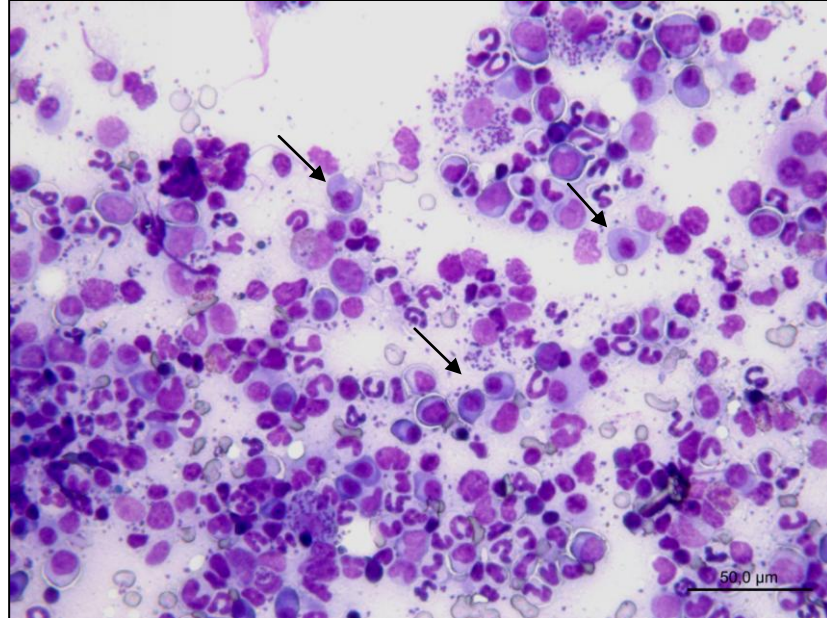


Figura 9. Aspirado de medula óssea. Canino. Hiperplasia linfoide – Plasmócitos (setas). Giemsa. 400x.

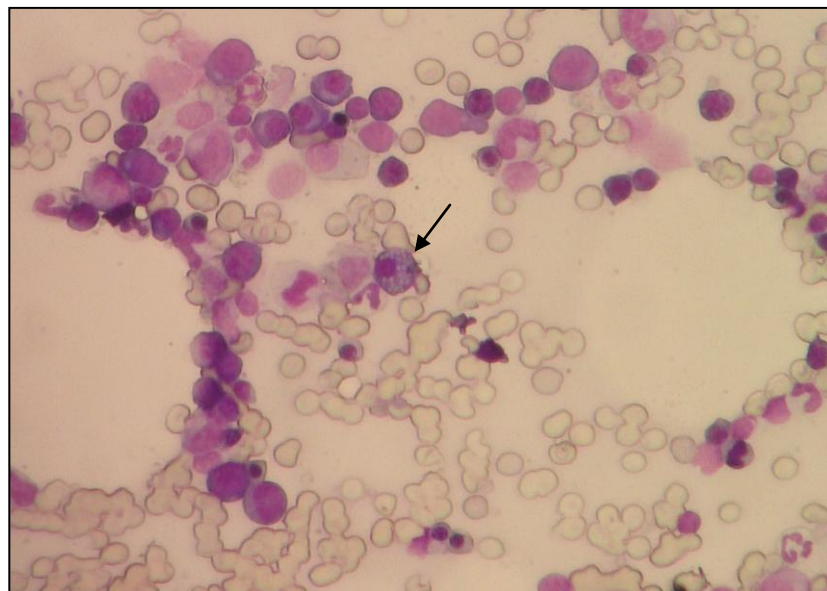


Figura 10. Aspirado de medula óssea. Canino. *Mott-cell* (seta). Giemsa. Objetiva 40x.

4.3.2.7 Série Monocítica

Todos os animais apresentaram aumento da série monocítica (100%), representada em sua maioria por macrófagos que apresentavam intensa atividade fagocítica.

Foi observada fagocitose de:

- amastigotas de *Leishmania* sp. em 39 animais (95,1%) (Figura 11),
- hemossiderina em 28 animais (68,3%),
- hemácias (eritrofagocitose) em 40 animais (97,6%) (Figura 12) e
- leucócitos (leucofagocitose) em nove animais (22,0%) (Figura 12).

Discreta à intensa quantidade de amastigotas de *Leishmania* sp., intracelulares (fagocitadas por macrófagos) e/ou extracelulares, que apresentavam citoplasma azul claro, núcleo oval e cinetoplasto pequeno em forma de bastonete, foram visualizadas na MO de 39 (95,1%) animais do estudo. Não foram observadas formas amastigotas de *Leishmania* sp. na MO de dois (4,9%) animais.

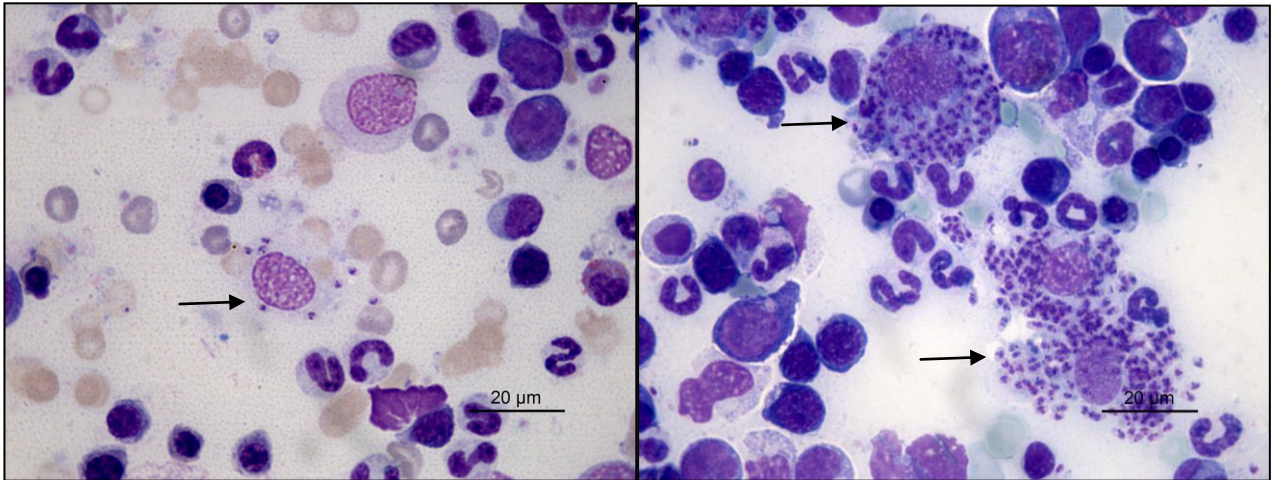


Figura 11. Aspirado de medula óssea. Canino. Presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. intracelulares (fagocitadas por macrófagos) (setas). Giemsa. 400x.

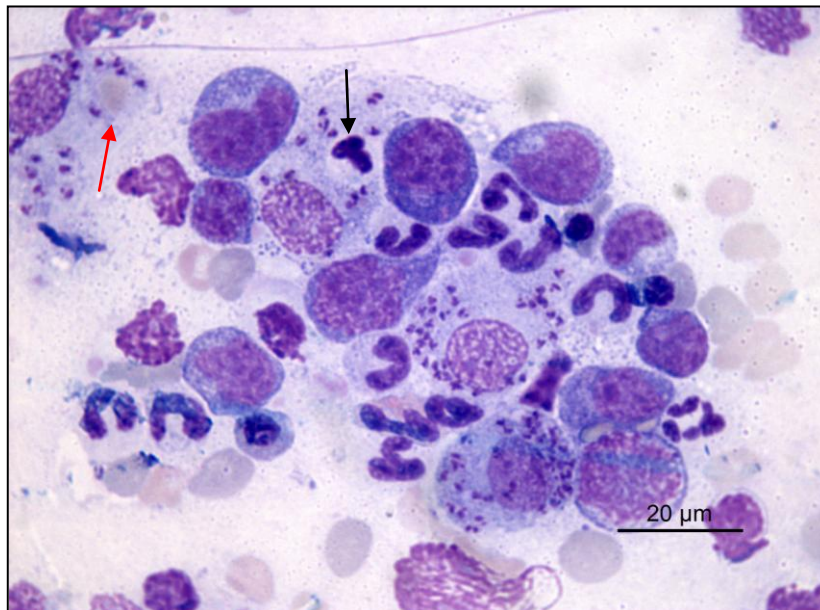


Figura 12. Aspirado de medula óssea. Canino. Presença de eritrofagocitose (seta preta) e leucofagocitose (seta vermelha). Giemsa. 400x.

A contagem diferencial de monócitos e macrófagos esteve aumentada em 40 cães (97,5%). Destes animais, 12 (30,0%) eram assintomáticos, 13 (32,5%) eram oligossintomáticos e 15 eram sintomáticos (37,5%). Um animal (2,4%) apresentou resultados dentro do limite de normalidade, segundo Mischke e Busse (2000).

Os valores da mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados da avaliação quantitativa do mielograma encontram-se na tabela 5.

Tabela 5. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados da avaliação quantitativa do mielograma de 41 cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

	Valores (%)	Valores de Referência (%)
Mieloide imaturo	8,0 (5,0-10,0)	10,3 Jain, 1993
Mieloide maduro	35,0 (29,5-39,5)	39,4 Jain, 1993
Eosinófilos	6,0 (3,0-8,5)	3,6 Jain, 1993
Basófilos	0,0 (0,0-0,0)	0 Jain, 1993
Eritroide imaturo	4,0 (2,0-5,0)	4,1 Jain, 1993
Eritroide maduro	29,0 (25,0-36,5)	42,3 Jain, 1993
Linfócitos	6,0 (4,0-8,0)	10,0 Mischke e Busse, 2000
Plasmócitos	6,0 (4,0-10,0)	2,0 Jain, 1993
Macrófagos	2,0 (1,0-4,0)	0,5 Mischke e Busse, 2000
Relação M:E	1,0 (1,0-2,0)	0,75-2,53 Jain, 1993

4.3.2.8 Demais achados presentes na medula óssea

Emperipolese de formas amastigotas de *Leishmania* sp. por megacariócitos foi observada em 12 (36,5%) cães (Figura 13). Destes animais, dois (16,6%) eram assintomáticos, três (25,0%) eram oligossintomáticos) e sete (58,3%) eram sintomáticos.

Megacariócitos *Dwarf* foram visualizados em dois (4,87%) cães sintomáticos (Figura 14).

Raros osteoclastos, células reticuloendoteliais e hematogônias foram visualizados.

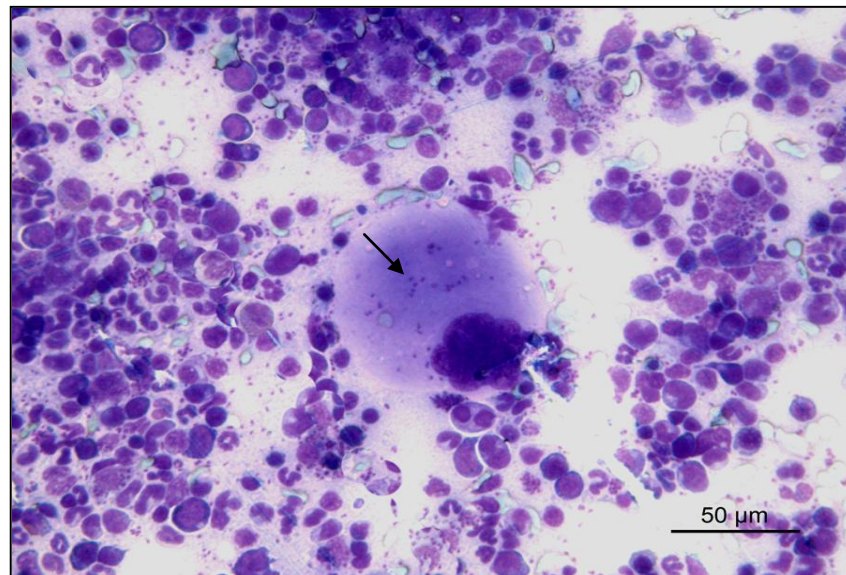


Figura 13. Aspirado de medula óssea. Canino. Emperipolese de formas amastigotas de *Leishmania* sp. (seta). Giemsa. 400x.

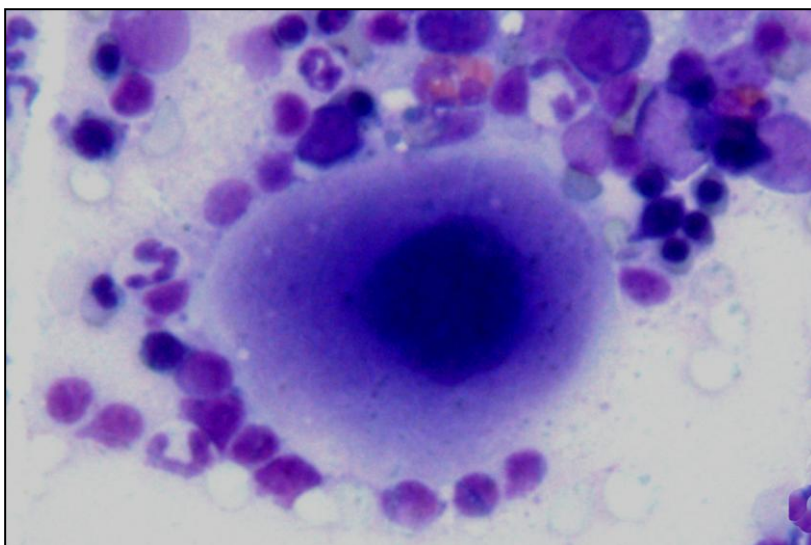


Figura 14. Aspirado de medula óssea. Canino. Megacariócito *dwarf* (seta). Giemsa. 400x.

4.3.3 Avaliação dos estoques de ferro medular

Trinta e dois (78,0%) animais apresentaram aumento dos estoques de ferro (Figura 15 e Figura 16) e nove (21,9%) animais apresentaram valores dentro dos padrões de normalidade durante a avaliação do mielograma. Estes achados foram confirmados após utilização do método de Perls (Azul da Prússia).

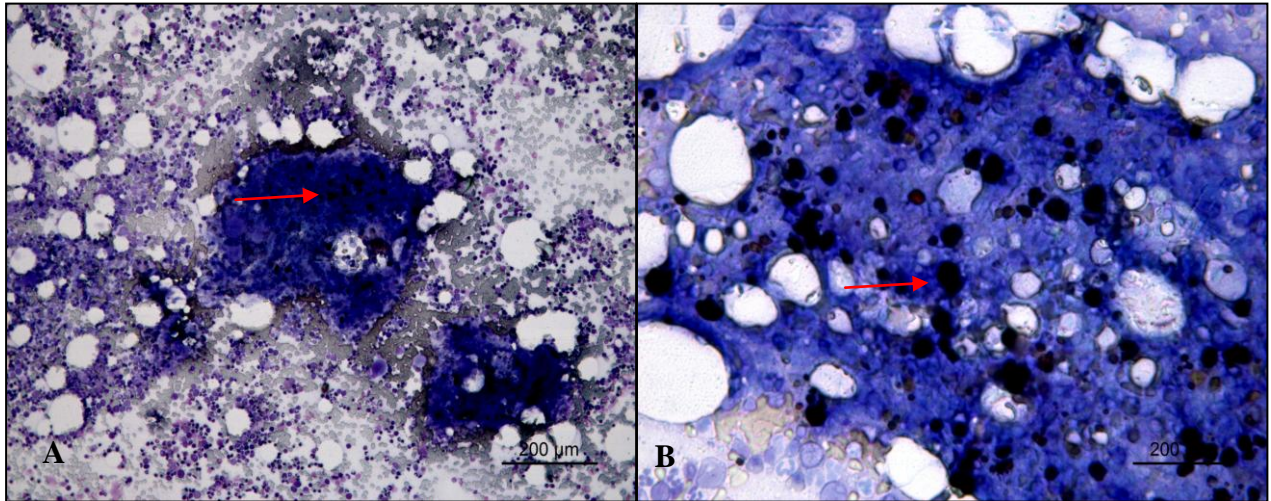


Figura 15. Aspirado de medula óssea. Canino. Precipitados de hemossiderina (setas). Giemsa. A – 100x; B – 400x.

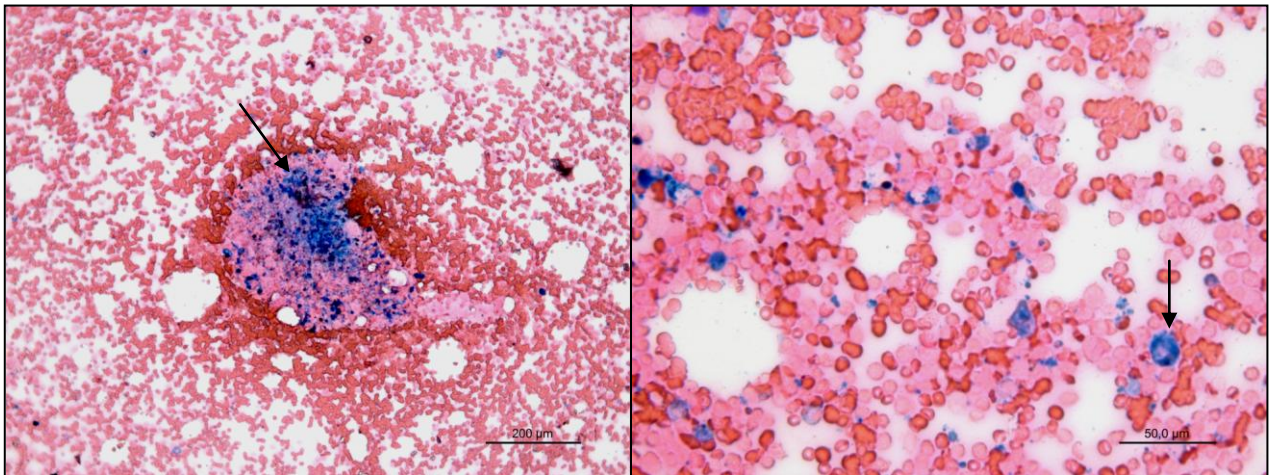


Figura 16. Aspirado de medula óssea. Canino. Precipitados de hemossiderina (setas). Azul da Prússia. A – 100x; B – 400x.

4.3.4 Imunofenotipagem de linfócitos medulares

Todos animais do estudo apresentaram marcações positivas para anticorpos anti-CD79a (Figura 17 e 18) e anticorpos anti-CD3 (Figura 19 e 20) durante a avaliação qualitativa das amostras.

Os valores da mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados da avaliação quantitativa dos linfócitos medulares se encontram na tabela 6.

Tabela 6. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados da avaliação quantitativa da imunofenotipagem de linfócitos medulares de 41 cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

	Anti-CD3 (%)	Anti-CD79a (%)
Mediana	12,0	14,0
Intervalo Interquartil		
25	8,5	10,0
75	19,5	19,0

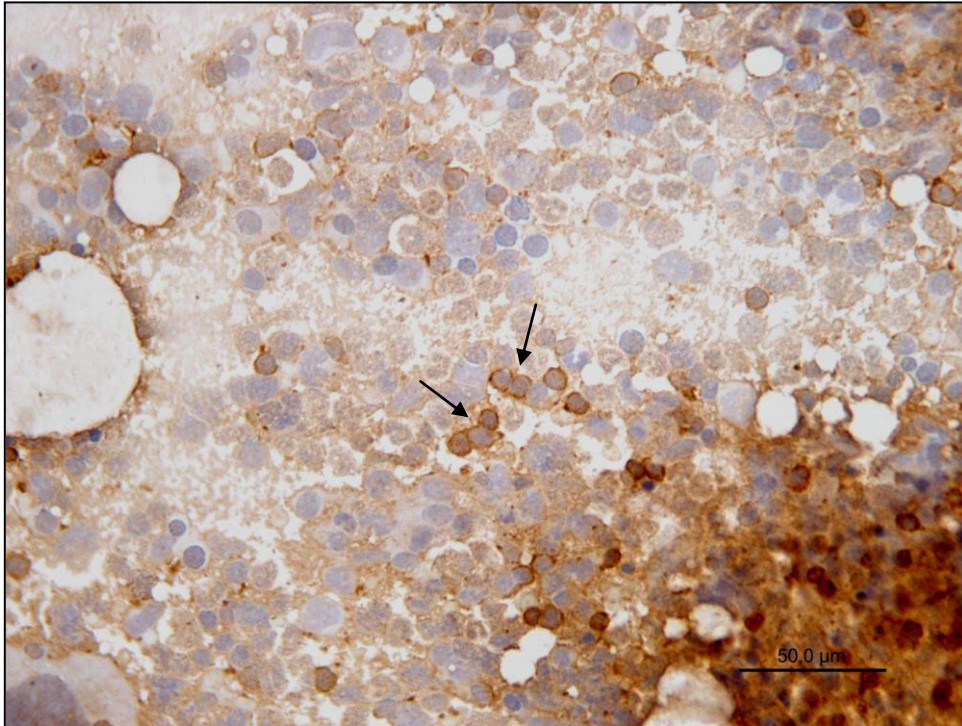


Figura 17. Aspirado de medula óssea. Canino. Imunocitoquímica. Anti-CD79a positivo – Linfócito B (setas). DAB. 400x.

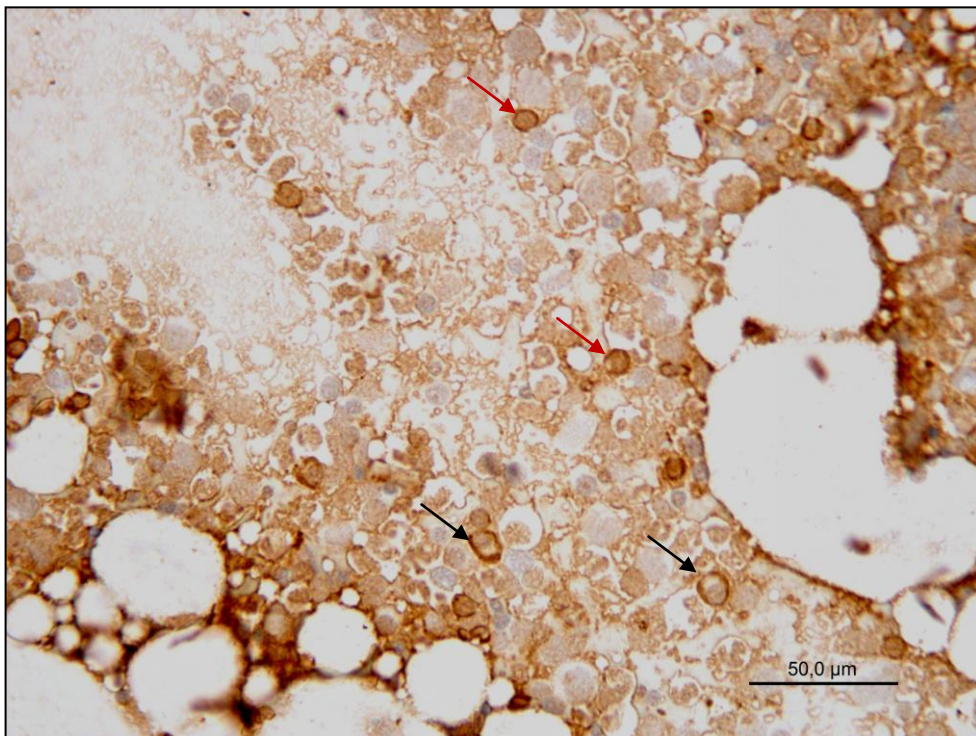


Figura 18. Aspirado de medula óssea. Canino. Imunocitoquímica. Anti-CD79a positivo – Linfócito B (seta vermelha). Plasmócito (seta preta). DAB. 400x.

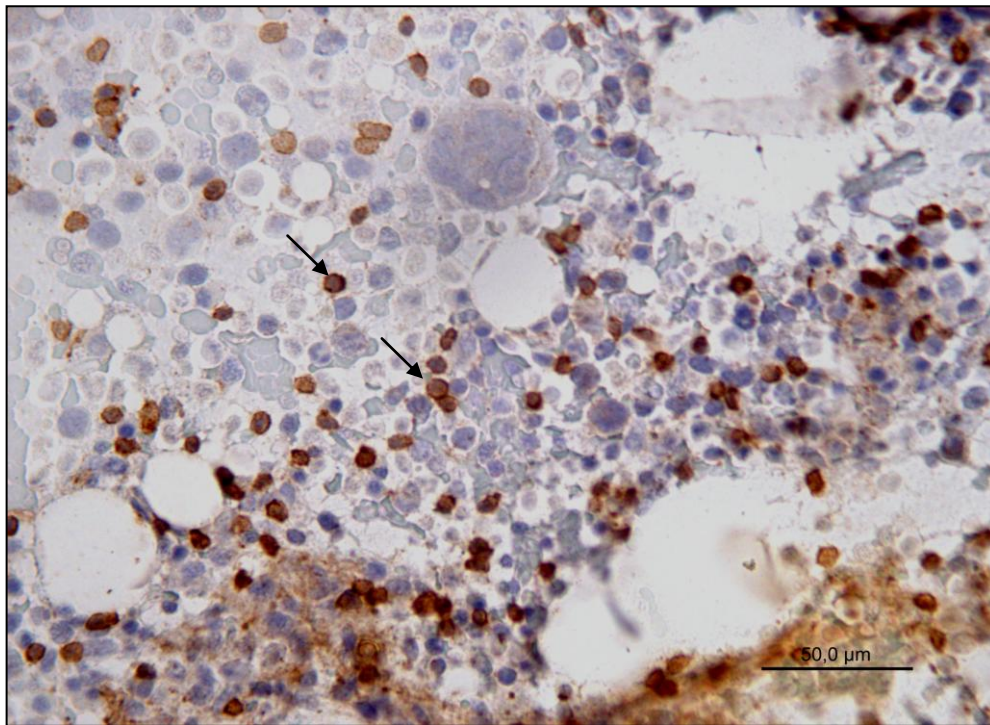


Figura 19. Aspirado de medula óssea. Canino. Imunocitoquímica. Anti-CD3 positivo – Linfócito T (setas). DAB. 400x.

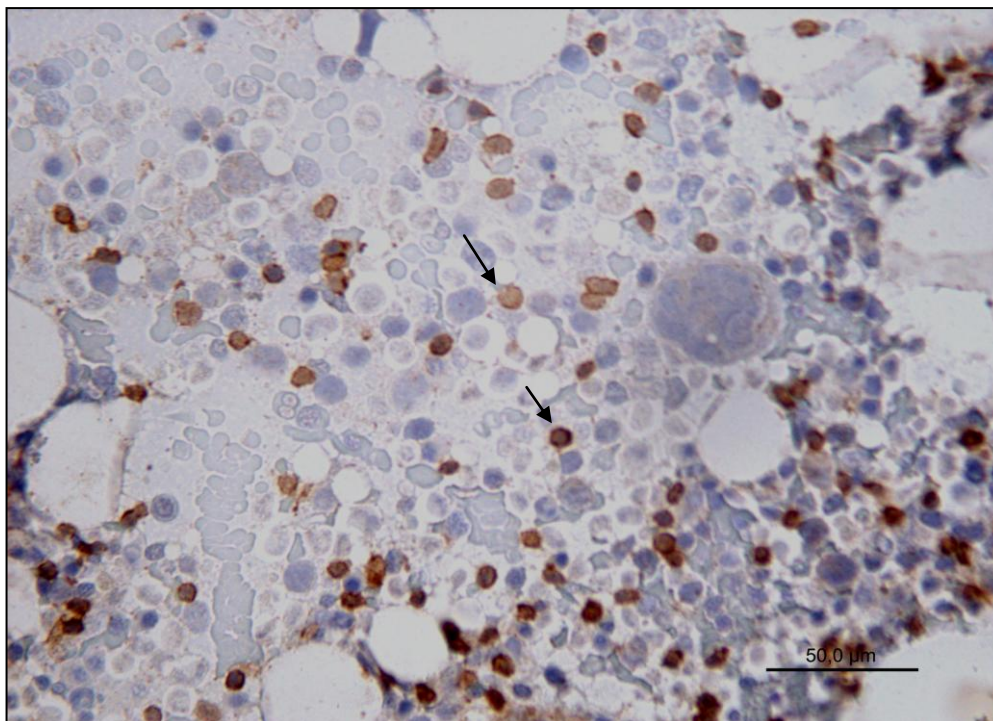


Figura 20. Aspirado de medula óssea. Canino. Imunocitoquímica. Anti-CD3 positivo – Linfócito T (setas). DAB. Objetiva 40x.

4.4 ASSOCIAÇÃO: CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E EXAMES LABORATORIAIS

Quando analisados os resultados dos animais pertencentes à classificação clínica “assintomáticos” e “sintomáticos”, diferenças significativas foram observadas nos parâmetros hemácias, hemoglobina, hematócrito, CHGM e eosinófilos periféricos e medulares.

Quando analisados os resultados dos animais pertencentes à classificação clínica “oligossintomáticos” e “sintomáticos”, diferenças significativas foram observadas somente nos parâmetros hemácias, hemoglobina e hematócrito.

Quando analisados os resultados dos animais pertencentes à classificação clínica “assintomáticos” e “oligossintomáticos”, somente o parâmetro VGM apresentou diferença significativa.

A tabela 7 apresenta o p-valor das variáveis laboratoriais que apresentaram associação com a classificação clínica dos animais do estudo pelo teste de Kruskal-Wallis e quais foram significativas pelo teste de Mann-Whitney corrigido pelo método de BY.

Tabela 7. P-valor das variáveis hemácia, hematócrito, hemoglobina, VGM, CHGM, eosinófilos (sangue periférico) e eosinófilos (medula óssea) de 41 cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* segundo os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney corrigido pelo método de BY.

	Ass. ^a x Oligo. ^b		Ass. ^a x Sint. ^c		Oligo. ^b x Sint. ^c	
	Kruskal	Mann-Whitney	Kruskal	Mann-Whitney	Kruskal	Mann-Whitney
H (x10⁶/μL)	0,186	0,341	0,000*	0,000*	0,002*	0,005*
Ht (%)	0,406	0,744	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
Hb (g/dL)	0,137	0,251	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
VGM (fL)	0,002*	0,001*	0,779	1,000	0,090	0,247
CHGM (%)	0,168	0,308	0,000*	0,000*	0,121	0,308
Eos (/μL)^d	0,040	0,110	0,004*	0,022*	0,133	0,243
Eos (%)^e	0,046	0,126	0,009*	0,004*	0,982	1,000

*Resultados estatisticamente significativos nos testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

^aAss., assintomático; ^bOligo., oligossintomático; ^cSint., sintomático; ^dEos (μL), eosinófilo (sangue periférico); ^eEos (%), eosinófilo (medula óssea).

A tabela 8 apresenta os resultados da mediana e intervalo interquartil das variáveis hemácias, hematócrito, hemoglobina, VGM, CHGM, eosinófilos (sangue periférico) e eosinófilos (MO) de acordo com a classificação clínica dos animais.

Tabela 8. Mediana e intervalo interquartil (25 e 75%) dos resultados das variáveis hemácias (H), hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), eosinófilos (sangue periférico) (Eos/ μL) e eosinófilos (medula óssea) (Eos %) de acordo com a classificação clínica de 41 cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*.

Classificação		H ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Ht (%)	Hb (g/dL)	VGM (fL)	CHGM (%)	Eos (/ μL)	Eos (%)
Assintomático								
	Mediana	6,0	36	13,0	64,0	36,0	1344	7,0
	Percentil 25	5,0	32	11,5	61,0	35,0	275	6,5
	75	6,0	39	14,0	65,0	37,0	1866	13,5
Oligossintomático								
	Mediana	5,0	33	11,0	60,0	34,5	285	4,0
	Percentil 25	5,0	30	10,0	58,2	32,2	151	2,0
	75	6,0	36	12,7	62,0	36,7	479	8,2
Sintomático								
	Mediana	3,5	21	7,0	63,5	33,5	140	4,0
	Percentil 25	3,0	17	6,0	58,2	31,2	21	2,2
	75	4,0	28	9,7	66,7	34,0	237	6,7

*H, Hemácia; Ht, hematócrito; Hb, hemoglobina; VGM, volume globular médio; CHGM, concentração globular média de hemoglobina; Eos (μL), eosinófilo sangue periférico; Eos (%), eosinófilo medula óssea.

5 DISCUSSÃO

A presente tese foi baseada em um estudo descritivo com amostra não probabilística de conveniência, pois não havia parâmetros de referência na literatura para a realização do cálculo amostral.

De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas predisposições sexual, etária e racial nos cães com LV, o que também tem sido relatado por diversos autores (ABRANCHES et al., 1991; FISA et al. 1999; FEITOSA et al., 2000). Entretanto estudos epidemiológicos têm demonstrado que raças como Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e Pastor Alemão parecem ser mais predispostas à infecção (SIDERIS et al., 1996, FRANÇA-SILVA et al., 2003), achado questionado por alguns autores que não confirmam tal afirmação, atribuindo-a ao habitat do cão, condições ambientais e sua exposição ao flebotomíneo (POZIO et al., 1981; AMELA et al., 1995).

A LVC é caracterizada por diversas manifestações clínicas (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Emagrecimento, linfadenopatia, lesões cutâneas e mucosas hipocoradas foram os achados mais frequentes observados neste estudo.

O emagrecimento observado nos animais com leishmaniose visceral pode ser atribuído à competição entre o parasita e o hospedeiro por nutrientes como triptofano, à má absorção intestinal e/ou à doença renal (KEENAN et al., 1984; SLAPPENDEL 1988).

A linfadenopatia pode ser atribuída à hipertrofia e hiperplasia das camadas cortical e medular dos linfonodos acometidos e ao aumento do número de macrófagos nos cordões e sinus medulares (CORDATA et al., 2004; LIMA et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2008).

As alterações dermatológicas, normalmente observadas na doença, podem ser atribuídas à ação direta do parasita, deposição de complexos imunes e/ou redução das fibras colágenas tipo I e aumento das fibras colágenas tipo III (GIUNCHETTI et al., 2006). A presença de mucosas hipocoradas está relacionada à anemia decorrente de vários processos patológicos que serão explicados mais à frente (IKEDA et al., 2003 e CAMPOS, 2005)

Os demais achados clínicos, menos frequentes, porém relatados por diversos autores na LVC incluíram: alopecia localizada e generalizada (decorrentes das alterações dermatológicas observadas na doença) (KOUTINAS et al., 1992), ceratoconjuntivite seca (associada à inflamação granulomatosa secundária à presença do parasita ao redor do ducto lacrimal, causando retenção e diminuição da produção de lágrima) (NARANJO et al., 2005), onicogribose (relacionada à dermatite mononuclear liquenoide associada à presença do parasita) (KOUTINAS et al., 1992; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007) e esplenomegalia (causada pela proliferação e infiltração de células imunes associada à hiperplasia da polpa branca e vermelha e mudanças na estrutura microvascular) (TAFURI et al., 2001).

Uma forma clínica atípica da LVC, caracterizada pela presença de tumoração localizada na gengiva do ramo maxilar direito, foi observada neste estudo. Embora não tenha sido possível isolar e identificar a espécie de *Leishmania* das formas amastigotas observadas na lesão, mas considerando o isolamento de *L. (L.) chagasi* de todas as amostras coletadas, é provável que se trate do mesmo agente etiológico. Neste caso, supõe-se que o parasito tenha se distribuído pela membrana mucosa do cão, provavelmente através das vias hematógenas ou linfáticas (FONT et al., 1996). De acordo com alguns autores, é possível que os parasitos invadam diretamente a mucosa através da picada ou mastigação de flebotomíneos infectados (MIRÓ et al., 2011). Considerando a ocorrência de leishmaniose tegumentar no Brasil, é importante incluí-la no diagnóstico diferencial de lesões da mucosa oral, principalmente nas áreas de sobreposição de leishmaniose tegumentar e LV (MADEIRA et al., 2006).

A anemia, achado laboratorial observado no estudo, tem sido comumente observada nos cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* (ABRANCHES et al., 1991; KONTOS e KOUNTINAS, 1993; CIARAMELLA et al., 1997; IKEDA et al., 2003; CAMPOS, 2005; REIS et al., 2006). A anemia normocítica normocrômica arregenerativa tem sido o tipo mais frequente de anemia observado na LVC, achado também observado no presente estudo, e possui como principal mecanismo a anemia da inflamação, embora a hemólise (produção de auto-anticorpos, complexos imunes e instabilidade da membrana do eritrócito), insuficiência renal e perda de sangue (epistaxe e perda gastrointestinal), também possam contribuir para este evento (REIS et al., 2006; FREITAS et al., 2012).

A anemia da inflamação, também conhecida como anemia da doença inflamatória (ADI), frequentemente acompanha doenças inflamatórias crônicas (JAIN, 1993; MEYER e HARVEY, 2004). O principal mecanismo envolvido na fisiopatogenia da ADI é produção de mediadores inflamatórios que inibem a eritropoiese em decorrência de alterações na produção de eritropoietina. Entretanto anormalidades como a indisponibilidade de ferro apreendido por macrófagos e redução da meia vida dos eritrócitos associados a danos de membrana causados por oxidantes endógenos gerados durante a inflamação também possam ser responsáveis por este processo (MEANS e KRANTZ 1992; SEARS, 1992).

Fandrey e Jelkmann (1991) e Faquin et al. (1992) sugerem que citocinas produzidas por macrófagos como a IL-1 e TNF sejam responsáveis pela diminuição da inibição da eritropoiese e da proliferação dos precursores eritroides imaturos.

A anemia hemolítica imunomediada (AHI) é decorrente da destruição imunomediada de eritrócitos pelo sistema monocítico fagocitário em função da adesão de auto-anticorpos IgG aos eritrócitos e/ou fixação do complemento C3. Segundo a literatura, agentes infecciosos estão intimamente relacionados ao mecanismo fisiopatológico da doença (BALCH e MACKIN, 2007; PIEK, 2011). No presente estudo, o protozoário *L. (L.) chagasi* parece

apresentar papel fundamental no desencameamento da AHI, em virtude da frequente presença de eritrofagocitose na medula óssea dos cães avaliados, demonstrando que este mecanismo pode ser também um dos responsáveis pela anemia observada na leishmaniose visceral canina.

Em estudos realizados por Slappendel (1988) e Kontos e Koutinas (1993), um mecanismo imunomediado foi descrito em alguns cães com LVC, que apresentaram teste de “Coombs” positivo e presença de título para anticorpo antinuclear. De acordo com Bildik et al. (2004), a lesão oxidativa causa diminuição da meia-vida dos eritrócitos e subsequente hemólise, contribuindo para anemia observada na leishmaniose visceral.

A presença de anemia normocítica hipocrômica, microcítica hipocrômica e microcítica normocrômica, observadas em alguns animais do estudo, foi relatada em alguns cães com LVC (FERRER et al., 1991; CIARAMELLA e CORONA, 2003; HONSE, 2008) e pode ser explicada pela deficiência de ferro e síntese do heme comuns em doenças crônicas (COHN, 2003; MEYER e HARVEY, 2004) ou atribuída à ADI (MEYER e HARVEY, 2004).

No presente estudo, achados hematoscópicos como policromasia, metarrubricitos e corpúsculos de Howell Jolly observados no sangue periférico de alguns animais, foram insuficientes para classificar as anemias encontradas como anemias regenerativas, já relatadas na LVC (LONGSTAFFE e GUY, 1985; IKEDA et al., 2003).

Uma grande variedade de resultados referentes à contagem total de leucócitos é relatada na LVC (LONGSTAFFE e GUY, 1985; KOUTINAS et al., 1999; IKEDA et al., 2003; CIARAMELLA e CORONA, 2003; CAMPOS, 2005; FREITAS et al., 2012). Neste estudo, a maioria dos animais apresentou resultados de leucometria global dentro dos parâmetros de normalidade descritos por Jain (1993), estando de acordo com os achados de Campos (2005) e Costa-Val et al. (2007). A leucopenia observada em dois animais, descrita por alguns autores na LVC (LONGSTAFFE e GUY, 1985, SLAPPENDEL, 1988), pode ser atribuída à redução

da liberação de neutrófilos medulares em decorrência de hipoplasia seletiva ou generalizada da MO ou processos imunomediados. A leucocitose com neutrofilia e desvio nuclear de neutrófilos à esquerda observada em alguns animais pode estar associada a condições inflamatórias crônicas ou não inflamatórias e/ou a quadros de infecção bacteriana concomitante.

A trombocitopenia vem sendo relatada em cães com LV (CIARAMELLA et al., 1997; CIARAMELLA e CORONA, 2003; COSTA-VAL et al., 2007; HONSE, 2008; HONSE et al., 2013). Os principais mecanismos fisiopatológicos responsáveis por este evento na LVC incluem: diminuição da produção, decorrente da hipoplasia da MO ou destruição imunomediada de megacariócitos; aumento da destruição, decorrente de reações imunomediadas primárias (trombocitopenia auto-imune idiopática) ou secundárias (trombocitopenia imuno-mediada resultado da exposição à antígenos); e aumento do consumo, decorrente de injúrias ao endotélio vascular e liberação de citocinas inflamatórias (SCOTT e ARI JUTKOWITZ, 2010). No presente estudo é possível que estes mecanismos fisiopatológicos estejam ocorrendo única ou simultaneamente.

Pouca informação está descrita na literatura sobre as alterações patológicas da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*, embora existam relatos (TRÓPIA DE ABREU et al., 2011; NICOLATO et al., 2013).

A avaliação qualitativa da MO revelou aumento de celularidade na maioria dos cães avaliados. Este aumento ocorreu devido à expressiva hiperplasia das séries monocítica, linfoide (plasmócitos) e mieloide. Em alguns animais a hiperplasia das séries megacariocítica e eritroide também contribuiu para o aumento da celularidade. Segundo Harvey (2001), processos inflamatórios e infecciosos podem ser responsáveis pela hiperplasia dos variados tipos celulares da MO, associados às citopenias periféricas como anemias, leucopenias e

trombocitopenias. Em alguns animais do estudo, foi verificada associação de hiperplasia ou hipoplasia de alguns tipos celulares e citopenias periféricas, achado discutido mais à frente.

A série megacariocítica apresentou resultados dentro dos parâmetros de normalidade na maioria dos animais (JAIN, 1993), achado também relatado por Tryphonas et al. (1977) e Campos (2005). A hiperplasia da série megacariocítica acompanhada de trombocitopenia periférica em alguns animais sugere destruição plaquetária decorrente de reações imunomediadas. A formação de anticorpos anti-plaquetas pode ocorrer por razões desconhecidas (idiopática) ou secundariamente a doenças infecciosas, neoplasias e drogas (SCOTT e ARI JUTKOWITZ, 2010). Na LVC, a trombocitopenia imunomediada pode estar relacionada à presença do parasito *L. (L.) chagasi* induzindo a produção de anticorpos ou à indução de imunocomplexos associados à plaqueta.

Hipoplasia da série megacariocítica associada à trombocitopenia periférica observada pode ser atribuída à diminuição da produção, decorrente da hipoplasia da MO (citocinas) ou destruição imunomediada de megacariócitos.

A hiperplasia da série eritroide foi caracterizada pelo aumento da população de precursores imaturos e maduros e pode ser atribuída à resposta ineficaz decorrente da deficiência de ferro e/ou a processos imunomediados. No presente estudo, este achado esteve associado à anemia arregenerativa e foi observado nos animais pertencentes as três classificações clínicas. Este resultado diverge daquele obtido por Nicolato et al. (2013), que não observaram alterações significativas na série eritroide de cães soro-reatores e PCR positivos para *Leishmania* sp. pertencentes à classificação clínica ‘assintomático’ e ‘oligossintomático’. Tal discrepância pode ser atribuída a fatores do hospedeiro, carga parasitária e mecanismos fisiopatológicos envolvidos na infecção.

A hipoplasia da série eritroide associada à anemia arregenerativa pode estar relacionada à anemia da doença inflamatória e liberação de citocinas derivadas de macrófagos, como o TNF e IL-1, capazes de inibir a eritropoiese e a proliferação dos precursores eritroides imaturos ou a alterações imunomediadas. Achado semelhante foi observado por Tryphonas et al. (1977) e Campos (2005). Em 2013, Nicolato et al. observaram hipoplasia da série eritroide associada à anemia em cães sintomáticos soro reatores e PCR positivos para *Leishmania* sp.

A hiperplasia da série granulocítica foi caracterizada pelo aumento da população de precursores imaturos e maduros de neutrófilos e eosinófilos e observada nos animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Este achado é possivelmente atribuído à demanda de leucócitos durante a doença inflamatória ou utilização destas células em processos imunomediados. Tryphonas et al. (1977) e Campos (2005) não observaram alterações significativas na série mieloide de cães com leishmaniose visceral.

A hiperplasia neutrofílica geralmente ocorre em resposta a fatores de crescimento hematopoiéticos como o fator estimulante de colônias granulocíticas e colônias de macrófagos (FEC-GM), o que pode explicar a ocorrência de hiperplasia granulocítica associada à neutrofilia com desvio a esquerda em alguns animais do estudo. Nicolato et al. (2013) relataram aumento de neutrófilos e seus precursores em cães sintomáticos sororeatores e PCR positivos para *Leishmania* sp., resultado da resposta inflamatória em múltiplos órgãos afetados pelo parasito. Segundo Trópia de Abreu (2011), a proliferação de células neutrofílicas também pode ser atribuída à tentativa de controlar a densidade parasitária na MO, através da ativação de mecanismos oxidativos. Em 2000, Cotterell et al. mostraram que a infecção por *L. donovani* em ratos induziu ao aumento da mielopoiese com mobilização de células progenitoras para o sangue periférico devido a altos níveis de FEC-GM.

A hipoplasia granulocítica observada no estudo pode ser atribuída a mecanismos imunomediados, que podem ser desencadeados por *L. (L.) chagasi*. A presença de leucofagocitose (principalmente neutrófilos) e eritrofagocitose reforçam esta hipótese.

Hiperplasia eosinofílica foi observada nos animais assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Em alguns animais ela esteve associada à eosinofilia periférica e pode ser atribuída a condições parasitárias e inflamatórias. A interleucina 5 (IL-5), citocina que estimula a produção de eosinófilos agindo diretamente na unidade formadora de colônias eosinofílica, está diretamente relacionada com resposta imune tipo 2 (Th2) na LVC e parece ter um papel fundamental na proliferação de eosinófilos durante a doença. Tryphonas et al. (1977) e Nicolato et al. (2013) relataram a ocorrência de hiperplasia eosinofílica associada à eosinopenia periférica em animais sintomáticos, achado não observado neste estudo.

O aumento da relação M:E foi atribuído à hiperplasia mieloide e hiperplasia mieloide associada à hipoplasia eritroide. A diminuição da relação M:E foi atribuída à hiperplasia eritroide e hipoplasia mieloide. Campos (2005) observou aumento da relação M:E em dois cães com LV, diminuição da relação M:E em um cão com LV e relação M:E dentro dos parâmetros de normalidade em quatro animais. Tryphonas et al. (1977) observaram relação M:E dos parâmetros de normalidade em um cão com LV. Em 2011, Trópia de Abreu et al. observaram aumento da relação M:E em cães com leishmaniose visceral, atribuindo-o à hiperplasia mieloide (precursores neutrofílicos).

A hiperplasia da série linfóide foi caracterizada pelo aumento significativo de plasmócitos, achado também observado durante a avaliação quantitativa deste tipo celular.

O número de linfócitos pequenos que se manteve dentro dos parâmetros de normalidade na maioria dos animais, achado também observado por Campos (2005), pode ser justificado pela infecção e inflamação crônicas causadas pelo parasito *L. (L.) chagasi*. Nicolato et al. (2013) observaram aumento do número de linfócitos na MO de cães sintomáticos associada à linfopenia periférica e atribuíram este achado à migração destas células para órgãos linfóides acometidos por *Leishmania* sp.

A intensa estimulação antigênica decorrente da infecção por *L. (L.) chagasi* também pode explicar o significativo aumento do número de plasmócitos observado nos animais do estudo. A ocorrência de plasmócitos maduros contendo um acúmulo de anticorpos (*Mott-Cell* e *Flame-cell*) pode estar relacionada à cronicidade da infecção (Lewis e Rebar, 1979; Harvey, 2001). Em 2006, Reis et al. relataram uma redução de células B circulantes em cães sintomáticos, o que poderia ser explicado pela migração seletiva destas células para órgãos linfóides ou à perda do marcador de células B CD21.

A avaliação qualitativa dos linfócitos medulares pela técnica de imunocitoquímica conseguiu evidenciar e diferenciar linfócitos T e linfócitos B dos cães estudados, embora quantitativamente nenhuma diferença significativa tenha sido observada.

A hiperplasia da série monocítica pode estar relacionada à resposta imune adaptativa a microrganismos, onde linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ produzem citocinas (IFN γ , TNF e IL-1) que atuam na ativação e proliferação de macrófagos, responsáveis pela fagocitose e tentativa de destruição de formas amastigotas de *Leishmania* sp. através da produção de intermediários reativos do oxigênio, óxido nítrico e enzimas lisossomais. Este achado também foi observado Tryphonas et al. (1977), Diebold et al. (2000), Tafuri et al. (2001) e Manzillo et al. (2006).

Discreta a intensa quantidade de amastigotas de *Leishmania* sp., intracelulares (macrófagos) ou extracelulares, foram observadas na MO dos animais estudados, demonstrando que a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* sp é uma importante

ferramenta diagnóstica na leishmaniose visceral canina, principalmente nos casos em que o diagnóstico sorológico é inconclusivo. Resultados semelhantes foram observados por Campos (2005). Segundo Ciaramella et al. (1997) e Diebold et al. (2000), a presença de parasita na MO de animais com LV é um achado frequente. Em um estudo realizado por Trópia de Abreu et al. (2011), a evolução da LVC de acordo com o *status* clínico do animal foi acompanhada pelo aumento da densidade parasitária na MO.

O aumento dos estoques de ferro medular observado nos animais do estudo evidencia o envolvimento da doença inflamatória na patogenia da LVC. Achado semelhante foi observado por Campos (2005) em cinco animais naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi*. A disponibilidade reduzida de ferro na ADI ocorre devido à entrega de ferro para macrófagos e ao aumento da síntese de ferritina (LEE, 1983). A lactoferrina, proteína transportadora de ferro encontrada no leite, nas secreções mucosas e nos leucócitos polimorfonucleares, tem a capacidade de ligar-se a uma grande quantidade de ferro, especialmente em pH baixo, como ocorre nos processos inflamatórios. Neste caso, citocinas como IL-1 e α -TNF induzem a síntese e liberação de lactoferrina e macrófagos ativados passam a expressar um número maior de receptores de superfície, possibilitando a utilização do ferro ligado a lactoferrina, que é transferido para a molécula de ferritina.

A liberação da lactoferrina pelos neutrófilos leva a um sítio de combinação de ferro no local da infecção, reduzindo a disponibilidade deste mineral. Com o ferro no compartimento de estoque, a concentração de ferritina aumenta até estabilizar, enquanto a hemossiderina é depositada, tornando este mineral menos disponível para a proliferação de eritrócitos (FELDMAN et al., 1981).

Os resultados do presente estudo estão de acordo com os achados de Pippard et al. (1986) e Campos (2005) que sugerem que a retenção anormal de ferro por macrófagos pode limitar a resposta eritropoiética à anemia observada na LV.

A emperipolese megacariocítica ainda não está totalmente esclarecida, porém em humanos este achado tem sido atribuído a várias condições como perda de sangue, desordens mieloproliferativas, trombocitoses reativas e neoplasias (CASHELL e BUSS, 1992). No presente estudo, a ocorrência de emperipolese de formas amastigotas pode ser explicada pela intensa atividade inflamatória e produção de citocinas decorrentes da infecção por *L. (L.) chagasi*. Recentemente, Foglia Manzillo et al. (2006) e Nicolato et al. (2013) relataram a ocorrência deste fenômeno em cães com LV. Em 1999, Prater et al., relataram a internalização de estruturas leveduriformes de *Histoplasma capsulatum* dentro de megacariócitos de um gato com lesões cutâneas.

A presença de megacariócitos *dwarf*, ainda não relatada na LVC, associada à hiperplasia megacariocítica pode ser atribuída à intensa atividade inflamatória e/ou imunomediada causadas por *L. (L.) chagasi*, levando à maturação anormal deste tipo celular (DUNN et al., 1999).

Considerando a associação ‘classificação clínica’ e ‘variáveis laboratoriais’, diferença significativa foi observada entre o grupo ‘assintomático’ e o grupo ‘sintomático’ em todas as variáveis hematológicas, com exceção do VGM. Este achado parece estar intimamente ligado ao *status* clínico da LVC. Os valores de hemácias, hematócrito, hemoglobina e CHGM parecem estar intimamente relacionados à cronicidade da doença (BANETH et al., 2008). Já os valores de eosinófilos periféricos e medulares parecem estar associados à intensa resposta antigênica comumente observada na LVC. Segundo Young e Meadows (2010), a IL-5 e IL-13, secretadas por células T (Th2) sensibilizadas por parasitas ou alérgenos, são responsáveis pelo aumento da produção de eosinófilos pela medula óssea e pelo recrutamento de

eosinófilos para tecidos, respectivamente. Na LVC, a função imunológica dos eosinófilos pode estar relacionada à sua capacidade de responder a antígenos ou à expressão de receptores Fc para imunoglobulinas.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste estudo foi possível chegar às seguintes conclusões:

1. As principais alterações citopatológicas observadas na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* foram hiperplasia das séries mieloide, linfoide e monocítica.
2. Cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* apresentaram anemia normocítica normocrômica.
3. O exame citopatológico da medula óssea foi importante para o diagnóstico de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em cães.
4. Cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* apresentaram aumento dos estoques de ferro medular.
5. A ocorrência de eritrofagocitose e leucofagocitose na medula óssea de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* sugere o envolvimento de processos imunomediados na patogênese da leishmaniose visceral canina.

6. Cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na população de linfócitos T e linfócitos B medulares, independentemente do *status* clínico.
7. Os principais sinais clínicos observados em cães naturalmente infectados por *L. (L.) chagasi* foram emagrecimento, linfadenopatia, alterações dermatológicas e mucosas hipocoradas, embora alguns animais possam apresentar manifestações clínicas atípicas.
8. Cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi* apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de classificação clínica ‘assintomáticos’ e ‘sintomáticos’ e com relação às variáveis laboratoriais hemácias, hematócrito, hemoglobina, VGM, eosinófilos periféricos e eosinófilos medulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1991;13(5):537-550.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57:1-88.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. *Manual de Imuno-histoquímica.* São Paulo:Sociedade Brasileira de Patologia; 1999.

Amela C, Mendez I, Torcal JM, Medina G, Pachón I, Cañavate C, et al. Epidemiology of canine leishmaniasis in the Madrid region, Spain. *Eur J Epidemiol.* 1995; 11(2):157-161.

Appelbaum FR, Sale GE, Storb R, Charrier K, Deeg HJ, Graham T, Wulff JC. Phenotyping of canine lymphoma with monoclonal antibodies directed at cell surface antigens: classification, morphology, clinical presentation and response to chemotherapy. *Hematol Oncol.* 1984; 2(2):151-168.

Bacchi CC, Bacchi MM. Immunohematopathology markers in paraffin sections. *The Journal of Histotechnology* 1999;22(3):195-205.

Balch A, Mackin A. Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs and diagnosis. *Compend Contin Edu Vet.* 2007; 29(4):217-225.

Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008; 24(7):324-330.

Barrouin-Melo SM, Lorangeira DF, Santos SO, Chagas-Júnior AD, Paixão M, Aguiar PH, dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 111(3-4):251-61.

Benjamini Y, Yekutieli D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of Statistics* 2001; 29:1165–1188.

Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to Leishmaniasis. *Plos Negl Trop Dis.* 2008; 2(10) e313.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Hoareau E, Boehringer C, Stolle T, Chabanne L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* – infected treated and untreated dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997; 59(1-2):21-30.

Campos KCH. Avaliação citológica da medula óssea, estoques de ferro medular, hemograma e níveis séricos de proteína total, albumina e globulina em cães (*Canis familiares*) naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Niterói. Dissertação [Mestrado] – Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária; 2005.

Cashel AW, Buss DH. The frequency and significance of megakaryocytic emperipolesis in myeloproliferative and reactive states. *Ann Hematol.* 1992; 64:273-276.

Castro AJM, Gonçalves RP, Pitombeira MHS. Bone marrow cytomorphological changes in patients co-infected with visceral leishmaniasis and human immunodeficiency vírus. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2011; 33(6):484

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(11):873-882.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 1997; 141(21):539-43.

Ciaramella P, Corona M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 2003; 25(5):358-369.

Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, et al. Altered platelet aggregation on coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J.* 2005; 169(3):465-467.

Cohn LA. Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2003; 33(4):863-84.

Coles EH. *Patologia Clínica Veterinária.* 3 ed. São Paulo: Manole; 1984.

Cordata VM, Doval, ME, Souza Lima MA, Oshiro ET, Meneses CR, Abreu-Silva AL, et al. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. *Vet Res Comm.* 2004; 28:365-74.

Cortese L, Pelagalli A, Piantedosi D, Mastellone V, Manco A, Lombardi P, et al. Platelet aggregation and haemostatic response in dogs naturally co-infected by *Leishmania infantum* and *Ehrlichia canis*. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2006; 53(10):546-548.

Costa-Val AP, Cavalcanti RR, Gontijo NF, Michalick MSM, Alexandrer B, Williams P, et al. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. Vet J. 2007; 174(3):636-643.

Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. Infect Immun. 2000; 68:1840-1848.

Courtenay O, Quinnell RJ, Garcez ML, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. J Infect Dis. 2002; 186(9):1314-1320.

Cruz I, Morales MA, Nogueira I, Rodrigues A, Alvar J. Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users. Lancet 2002; 30(359):1124-1125.

Cupolillo E, Grimaldi JG, Momen H. A general classification of new world Leishmania using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg. 1994; 50:296-311.

Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the Law priority. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(1):117-118.

Darbes J, Majzoub M, Hermanns W. Evaluation of the cross-reactivity between human and feline or canine leucocyte antigens using commercially available antibodies. J Vet Diag Invest. 1997; 9(1):94-97.

Deane LM, Deane MP. Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1962; 4:198-212.

De Campos MP, da Silva DA, Madeira MF, Júnior AAMV, Figueiredo FB. First autochthonous case of canine visceral leishmaniasis in Volta Redonda, Rio de Janeiro, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 2013; 22(3): 424-426.

De Moura VMBD, Sequeira JL, Amorim, RL, Bandarra EP. Imunofenotipagem dos linfomas caninos em tecido incluído em parafina. Rev. Educao Contin. CRMV-SP 2001; 4(3):71 - 75.

De Waele M, Renmans W, Segers E, Jochmans K, Salmon I, Depardieu C, Dehou MF, Camp BV. Leukemia and lymphoma immunophenotyping in cell smears with immunogold-silver stain. *Hematopathol.* 1991; 96(3):351-359.

Diebold J, Molina T, Camilleri-Bröet S, Toumeau AL, Audouin J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy. *Histopathology.* 2000; 37(3):199.

Di Lorenzo C, Proietti FA, Assunção RM. A urbanização da leishmaniose visceral no Brasil – uma breve revisão. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2000; 33(1):316-7.

Dos Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol.* 1998; 12(3):315-7.

Dunn JK, Heath MF, Jefferies AR, Blackwood L, McKay JS, Nicholls PK. Diagnosis and hematologic features of probable essential thrombocytopenia in two dogs. *Vet Clin Pathol.* 1999; 28:131-138.

Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammation cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 1992; 79(8):1987- 1994

Fandrey J, Jelkmann WEB. Interleukin-1 and tumor necrosis factor- α inhibit erythropoietin production in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991; 628(1):250-255.

Feldman BF, Keen CL, Kaneko JJ, Farver RTB. Anemia of inflammatory disease in the dog: measurement of hepatic superoxide dismutase, hepatic nonheme iron, copper, zinc, and ceruloplasmin and serum iron, copper, and zinc. *Am J Vet Res.* 1981; 42(7):1114 – 1117.

Feitosa MM, Ikeda FA, Luvizotto MC, Perri SHV. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). *Clínica Veterinária* 2000; 5(28):36-43.

Fernández-Bellón H, Solano-Gallego L, Rodríguez A, Rutten VP, Hoek A, Ramis A, Alberola J, Ferrer L. Comparison of three assays for the evaluation of specific cellular immunity to *Leishmania infantum* in dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 107(1-2):163-169.

Ferrer L, Juanola B, Ramos JA, Ramis A. Chronic colitis due to *Leishmania* infection in two dogs. *Vet Pathol.* 1991; 28(4):342-343.

Figueiredo FB, Lima FEF Jr, Tomio JE, Indá FMC, Corrêa GLB, Madeira MF. Leishmaniose Visceral Canina: Dois casos autóctones no município de Florianópolis, Estado de Santa Catarina. *Acta Sci Vet.* 2012; 40(1):1026

Fisa R, Gállego M, Castillejo S, Aisa MJ, Serra T, Riera C, et al. Epidemiology of canine leishmaniosis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus. *Vet Parasitol.* 1999; 83(2):87-97.

Foglia-Manzillo VF, Restucci B, Pagano A, Gradoni L, Oliva G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet Rec* 2006;158(20):690-694.

Font A, Gines C, Closa JM, Mascort J. Visceral leishmaniasis and disseminated intravascular coagulation in a dog. *Am Vet Med Assoc.* 1994; 204(7):1043-1044.

Font A, Roura X, Fondevila D, Closa JM, Mascort J, Ferrer L. Canine mucosal leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1996; 32(2):131-137.

Fournel-Fleury C, Magnol JP, Bricaire P, Maarchal T, Chabanne L, Delverdier A, Bryon PA, Felman P. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non-Hodgkin's lymphomas. *J Comp Pathol.* 1997; 117(1):35-59.

França-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2003; 111(2-3):161-173.

Freitas JC, Nunes-Pinheiro DC, Lopes Neto PE, Santos GJ, Abreu CR, Braga RR, et al., Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012 45(1):24-29.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA et al., Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006; 135(2-3):100-107.

Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Carneiro CM, Mayrink W, Tafuri WL, Corrêa-Oliveira R, et al., Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008, 121(1-2):23-33.

Grindem, CB, Neel JÁ, Juopperi TA. Cytology of bone marrow. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002; 32(6):1313-1374.

Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011; 27(9):403-409

Harvey JW. Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001. 228p.

Hayhoe FGJ, Quaglino D. Haematological Cytochemistry. 3 ed. United Kingdom: Churchill Livingstone; 1994. cap. 6:183-98.

Honse CO. Alterações hemostáticas em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* provenientes de inquéritos sorológicos realizados pela Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado] – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas; 2008.

Honse CO, Figueiredo FB, de Alencar NX, Madeira MF, Gremião IDF, Schubach TMP. Disseminated intravascular coagulation in a dog naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* from Rio de Janeiro – Brazil. *BMC Vet Res.* 2013; 9:43.

Ikeda FA, Ciarlini PC, Feitosa MM, Gonçalves ME, Luvizotto MVR, Lima VMF. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba – SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. *Clínica Veterinária* 2003; 8(47):42-48.

Jain NC. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993.

Javois LC. Immunocytochemistry. Methods and Protocols. 2ed. Human Press; 1999.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German Shepherd Dog II – Pathology. *Vet Pathol.* 1984; 21(1):80-86.

Killick-Kendrick R. Some epidemiological consequences of the evolutionary fit between *Leishmania* and their phlebotomine vectors. *Bull Soc Path Exot.* 1985; 78:747-755.

Kontos VJ, Koutinas AF. Old world canine leishmaniasis. *Compend Contin Educ Pract Vet.* 1993; 15(7):949-959.

Kopterides P, Halikias S, Tsavaris N. Visceral leishmaniasis masquerading as myelodysplasia. *Am J Hematol* 2003; 74:198-199.

Koutinas AF, Scott DW, Kontos V, et al. Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study of 22 spontaneous cases in Greece. *Vet Dermatol.* 1992; 3:121-130.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: A retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999; 35(5):376-383.

Lainson R, Rangel E. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(8):811-827.

Lee GR. The anemia of chronic disease. *Semin Hematol.* 1983; 20:61-70.

Liew FY, O'Donnell CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 1993;32:161-259.

Lima WG, Michalick MS, de Melo MN, Luis Tafuri W, Luis Tafuri W. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta Trop.* 2004; 92:43-53.

Longstaffe JA, Guy MW. Leishmaniasis in dogs. *Veterinary Annual* 1985; 25:358-67.

Lynch NR, Malavé C, Ifante RB, Modlin RL, Convit J. In situ detection of amastigotes in American cutaneous leishmaniasis, using monoclonal antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986; 80(1):6-9.

Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira AS, et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100(5):442-445.

Makni S, Ayed K, Ben Said M, Ben Rachid MS. Study of circulating immune complexes during the evolution of visceral Mediterranean leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1989; 83(4):349-355.

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. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82(4):566-7.

Manzillo VF, Restucci B, Pagano A, Gradoni L, Oliva G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet Rec.* 2006; 158(20): 690–694.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997; 30:162-4.

Means RTJ, Krantz SB. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood* 1992; 80(1):1639-1647.

Meyer DJ, Harvey JW. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis.* St. Louis: Saunders; 2004. cap. 3:27-46.

Michalsky EM, Rocha MF, Lima ACVM, França-Silva R, Pires MQ, Oliveira FS, et al. Infectivity of seropositive dogs, showing different clinical forms of leishmaniasis, to *Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies. *Vet Parasitol.* 2007; 147(1-2):67-76.

Milner RJ, Pearson J, Nesbit JW, Close P. Immunophenotypic classification of canine malignant lymphoma on formalin-fix paraffin wax-embedded tissue by means of CD3 and CD79a cell markers. *Onderstepoort J Vet Res.* 1996; 63(4):309-313.

Ministério da Saúde (MS). *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos.* Brasília: 2006; 120 p.

Miró G, Galvez R, Fraile C, Descalzo MA, Molina R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit Vectors.* 2011; 4:52.

Moraes JM, Brito LAB, Moura VMDB, Ribeiro CS, Guimarães VY, Andrade DF, Lobo JR, Fioravani MCS. Imunofenotipagem e avaliação quantitativa de linfócitos circulantes de bovinos da raça Curraleiro. *Pesq Vet Bras.* 2009; 29(4):339-344.

Moreno P, Lucena R, Ginel PJ. Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 1998; 142(4):81-83.

Moreno P. Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 1999; 144(7):169-71.

Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Peña T. Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2005; 133(1):37-47.

Nicolato RC, Trópia de Abreu R, Roatt BM, Aguiar-Soares RDO, Reis LES, Carvalho MG, et al. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania-infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *Plos One* 2013; 12(8) e82947.

Oliveira GK. Células-tronco mononucleares autólogas na cicatrização de defeitos tibiais agudos experimentais de cão. Santa Maria. Mestrado [Dissertação] – Universidade Federal de Santa Maria; 2008.

Organização Mundial da Saúde. Control of the Leishmaniasis. WHO (Technical Report Series 949). Geneva: 2010, 186p.

Organização Mundial da Saúde. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Geneva:2013; 137p.

Paula CC, Figueiredo FB, Menezes RC, Mouta-Confort E, Bogio A, Madeira MF. Leishmaniose visceral canina em Maricá, Estado do Rio de Janeiro: relato do primeiro caso autóctone. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(1):77-78.

Pelagalli A, Ciaramella P, Lombardi P, Pero ME, Cortese L, Corona M, et al. Evaluation of adenosine 5'-diphosphate (ADP) and collagen-induced platelet aggregation in canine leishmaniasis. *J Comp Pathol.* 2004; 130(2-3):124-9.

Perman V, Osborne CA, Stevens JB. Bone marrow biopsy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1974 4:293-309.

Piek CJ. Canine idiopathic immune-mediated haemolytic anaemia: a review with recommendations for future research, *Vet Q.* 2011; 31(3):129-141.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenberg J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994; 62(1):229-235.

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

Pozio E, Gradoni L, Bettini S, Gramiccia M. Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.* 1981; 38(4):383-393.

Prater MR, De Gopegui RR, Burdette K, Veit H, Feldman B. Bone marrow aspirate from a cat with cutaneous lesions. *Vet Clin Pathol.* 1999; 28:57-58.

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* 2009; 136(14):1915-1934.

Raskin R. Medula óssea. In: Slatter D, editor. *Manual de cirurgia de pequenos animais.* São Paulo: Manole; 1998. p.1135-1142.

Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG, Mayrink W, França-Silva JC, et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2006; 81(1):68-75.

Rigo RS, Carvalho CME, Honer MR, Andrade GB, Silva, IS, Rigo L et al. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2013; 55(2):113-116.

Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990; 65:111-125.

Sakamoto CAM, Bresciani KDS, Serrano ACM, Lima VMF, Machado GF, Kanamura CT, et al. Leishmaniose visceral canina em Jaboticabal - SP – primeiro caso. *Ars Vet.* 2007; 23(3): 125-128.

Salgado VR. Avaliação do cultivo microbiológico de aspirados de medula óssea e sangue no diagnóstico da brucelose canina. *Pubvet.* 2008; 2(24):66-71.

Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Olivry T. Regional parasite density in the skin of dogs of symptomatic canine leishmaniasis. *Vet Dermatol.* 2007 18(4), 227-233.

Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol* 2009; 20(5-6):471-489.

Scott MA, Ari Jutkowitz L. Immune-mediated thrombocytopenia. In: Weiss DJ, Jane Wardrop K, editors. Schalm's Veterinary Hematology. Iowa: Blackwell Publishing Ltda; 2010. p.586-595.

Sears DA. Anemia of chronic disease. Medical Clinics of North America 1992; 76 (3):567-579.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. Mem Inst Oswaldo Cruz 1994; 89(3):471-478.

Shaw SE, Day MJ, Birtles RJ, Breitschwerdt EB. Tickborne infectious diseases of dogs. Trends Parasitol. 2001; 17(2):74–80.

Shaw JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) chagasi* for the aetiological agent of American Visceral Leishmaniasis. Mem Inst Oswaldo Cruz 2006; 101(5):577-579.

Sideris V, Karagouni E, Papadopoulou G, Garifallou A, Dotsika E. Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. Parasite 1996; 3(2):125-130.

Slappendel RJ. Canine leishmaniasis: A review based on 95 in Netherlands. Vet Q. 1988; 10(1):1-16.

Sollano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisis MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasit Vectors 2011; 4:86.

Souza GD, dos Santos E, Andrade Filho JD. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Mem Int Oswaldo Cruz 2009; 104(8):1181-1182.

Sternberger L. Immunocytochemistry. 3ed. John Wileys & Sons; 1986.

Tafari WL, Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. Vet Parasitol 2001; 96(3):203-212.

Teske E, Wisman P, Moore PF, Van Heerde P. Histologic classification and immunophenotyping of canine non-Hodgkin's lymphomas: unexpected high frequency of T cell lymphomas with B cell morphology. *Exp Hematol* 1994; 22(12):1179-1187.

Trópia de Abreu R, Carvalho MG, Carneiro CM, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho Andréa, Martins-Filho OA et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Plos One* 2011; 6(5):e18873.

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

Valladares JE, Ruiz De Gopegui R, Riera C, Alberola J, Gállego M, Espada Y, et al.. Study of haemostatic disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Res Vet Sci*. 1998; 64(3):195-198.

Valli V, Peters E, Williams C, Shipp L, Barger A, Chladny J et al. Optimizing methods in immunocytochemistry: one laboratory's experience. *Vet Clin Pathol*. 2009; 38(2):261-269.

Yamaguchi RA, French TW, Simpson CF, Harvey JW. *Leishmania donovani* in the fluid of a dog with visceral leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1983; 19:723-726.

Yarali N, Fisgin T, Duru F, Kara A. Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. *Am J Hematol* 2002; 71:191-195.

Young KM, Meadows RL. Eosinophils and their disorders. In: Weiss DJ, Jane Wardrop K, editors. *Schalm's Veterinary Hematology*. Iowa: Blackwell Publishing Ltda; 2010. p.281-289.

Walton RM, Modiano JF, Thrall MA, Wheeler SL. Bone marrow cytological findings in 4 dogs and a cat with hemophagocytic syndrome. *J Vet Inter Med* 2001; 10:7-14

Weiss DJ, Aird B. Cytologic evaluation of primary and secondary myelodysplastic syndromes in the dog. *Vet Clin Pathol* 2001; 30(2):67-75.

Weiss DJ. Bone marrow pathology in dogs and cats with non-regenerative immune-mediated haemolytic anaemia and pure red cell aplasia. *J Comp Pathol*. 2008; 138(1):46-53.

Werneck GL. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil introduction. *Cad Saúde Pub* 2008; 24(12):2937-2940.

Zamprogno H. Células-tronco esqueléticas para o tratamento da não união de fraturas. *Acta Sci Vet.* 2007;35(2):289-290.

ANEXO

ANEXO A – Submissão de artigo.

30-Dec-2013

Dear Miss Honse:

Your manuscript entitled "Atypical tumor-like lesion of canine visceral leishmaniasis" by Honse, Carla; Figueiredo, Fabiano; Gremião, Isabella; Madeira, Maria de Fátima; Alencar, Nayro; de Miranda, Luisa Helena; Menezes, Rodrigo; Schubach, Tânia Maria has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Veterinary Clinical Pathology.

Co-authors: Please contact the Editorial Office as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript.

Your manuscript ID is VCP-13-2327.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/vcp> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/vcp>.

Manuscripts submitted to Veterinary Clinical Pathology may be screened electronically for plagiarism.

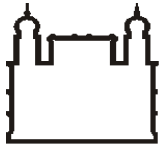
Thank you for submitting your manuscript to Veterinary Clinical Pathology.

Sincerely,

Laura Kathleen Brashear
Managing Editor, Veterinary Clinical Pathology

vetclinpathjournal@gmail.com

972-854-8948



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

CARLA DE OLIVEIRA HONSE

AVALIAÇÃO CITOPATOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA
E PERFIL HEMATOLÓGICO DE CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR
Leishmania (Leishmania) chagasi

Rio de Janeiro

2014