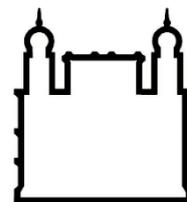




**UFBA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**TESE DE DOUTORADO**

**ALTERAÇÕES NA MEDULA ÓSSEA E DISTÚRBIOS HEMATOLÓGICOS NA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**VALTER DOS ANJOS ALMEIDA**

**Salvador – Bahia**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana**

**ALTERAÇÕES NA MEDULA ÓSSEA E DISTÚRBIOS HEMATOLÓGICOS NA  
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

**VALTER DOS ANJOS ALMEIDA**

Orientador: Washington Luis Conrado dos Santos

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana e Experimental, para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia**

**2017**

Título da Tese: "ALTERAÇÕES NA MEDULA OSSEA E DISTURBIOS HEMATOLOGICOS NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA"

VALTER DOS ANJOS ALMEIDA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 27 de janeiro de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Valéria Marçal Felix de Lima  
Professora Adjunta  
UNESP



Dra. Daniela Farias Larangeira  
Professora Adjunta  
UFBA



Dra. Claudia Ida Brodskyn  
Pesquisadora Titular  
IGM/Fiocruz



Dra. Karine Araújo Damasceno  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz



Dr. Washington Luis Conrado dos Santos  
Pesquisador Titular  
IGM/Fiocruz

---

**FONTES DE FINANCIAMENTO**

CNPq  
CPqGM  
FIOCRUZ  
CAPES  
CYTED

## **AGRADECIMENTOS**

---

Gostaria de agradecer ao meu excelente orientador Dr. Washington Luís Conrado dos Santos, um grande líder e exemplo a ser seguido. Muito obrigado por me ensinar a evoluir pessoalmente e profissionalmente!

Agradeço eternamente à minha noiva Carla Renata pela sua indispensável companhia e motivação em mais uma grande jornada! Seu nome esteve presente nos agradecimentos da minha monografia, na minha dissertação e agora na tese de doutorado. Muito obrigado por construir toda essa história comigo!

À minha família, que sempre me motivou e apoiou ao longo desses anos, em especial ao meu anjo que está no céu, minha mãe Maria Nadir (*in memoriam*), ao meu amado pai Antônio Vivaldo, meus irmãos Vivaldo e Viviane. Agradeço também o apoio dos meus sogros Inocencio e Suely por todo suporte e atenção prestada ao longo desses anos. Obrigado por tudo!

À Caroline Vilas Boas, pela excelente amizade, pela companhia nos retornos para casa, pelas conversas sobre nosso estilo musical, pelos lembretes de compromissos, por toda ajuda e convívio durante esses anos, meu muito obrigado Carolzinha.

À Micely Del'Rei Hermida, agradeço por todos os conselhos, pelas orientações, pelo exemplo profissional, pelos momentos divertidos e inesquecíveis!

À Joselli Santos Silva, my little friend! Agradeço pelos ensinamentos, por toda ajuda prestada e principalmente pela excelente companhia durante esses anos de Fiocruz. Adorei trabalhar contigo!

À Isadora dos Santos Lima, pela magnífica companhia e parceria. Pela dedicação e competência nos nossos trabalhos e por tornar o ambiente de trabalho mais prazeroso.

Maria e Djalma por todos os momentos vividos e compartilhados no nosso grupo.

À Yuri, Jonathan, Brenda, Paula, Jeanne, Patrick, Débora, Cláudio e todos outros membros do grupo WLCS.

Aos amigos do Laboratório de Patologia e Biointervenção I e II, pelo convívio nesses últimos anos.

Às minhas queridas amigas do LIM1, em especial Dra. Melissa Abbehusen, Jurema e Martinha!

Aos meus excelentes professores, especialmente Dr. Luiz Freitas, Dra. Cláudia Brodskyn, Dr. Geraldo Gileno, Dr. Patrícia Veras e Dra. Marilda Gonçalves. Agradeço imensamente à Dra. Iguaracyra Araújo pela paciência e dedicação

durante os ensinamentos nas análises histopatológicas das amostras de medula óssea.

À Fiocruz e ao CPqGM pela infra-estrutura e recursos humanos que possibilitaram a execução dos experimentos, e pelo ambiente de trabalho ameno e positivo que encontramos neste centro.

À biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM/FIOCRUZ e toda atenção prestada pelos seus funcionários. Agradecimento especial para a coordenação da biblioteca, Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio.

Aos funcionários do CPqGM.

Ao Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), onde conheci pessoas maravilhosas e pude aprender muito durante o estágio sanduíche, período essencial para minha formação durante o doutorado.

Gostaria de agradecer pela inesquecível companhia das minhas grandes amigas Carmen Sanchez, Laura Fernández, Laura Botana e Ana Victória.

Agradeço pela companhia do meu grande amigo Giorgi Babuadze! Obrigado pelos momentos inesquecíveis vividos em Madrid!

Gostaria de agradecer aos meus amigos e orientadores Dr. Javier Moreno e Dra Eugenia Carrillo por todo ensinamento, orientação e esclarecimentos nos experimentos de biologia molecular. Foram essenciais na minha formação profissional.

Agradeço também as amizades formadas no ISCIII, especialmente à Javier Nieto, Dr. Israel Cruz, Pamela, Marta, Maria, Bruno, Leire e Nino.

*Life moves fast. As much as you  
can learn from your history, you  
have to move forward.*

Eddie Vedder

ALMEIDA, Valter dos Anjos. Alterações na medula óssea e distúrbios hematológicos na leishmaniose visceral canina. 101 f.il. Tese (Doutorado em Patologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** cães com leishmaniose visceral frequentemente apresentam uma ampla variedade de anormalidades hematológicas. **Objetivo:** neste estudo, objetivou-se associar os distúrbios hematológicos com a distribuição das linhagens celulares e o perfil de expressão de citocinas na medula óssea de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. **MATERIAL E MÉTODOS:** após obtenção do diagnóstico e exames clínico-laboratoriais, as amostras foram coletadas e analisadas por microscopia convencional. Feito isso, foram utilizadas técnicas de biologia molecular para detecção de *L. infantum* e verificação da expressão de citocinas que podem influenciar na diferenciação celular na medula óssea. **RESULTADOS:** diante das análises, a infecção por *Leishmania* foi detectada por ELISA em 47/58 (81,0%) e por cultura esplênica em 18/57 (31,6%). A maioria dos cães com cultura esplênica positiva apresentou detecção do DNA de *L. infantum* na medula óssea ( $p=0,0004$ ) acompanhado por histiocitose ( $p=0,0046$ ). Destes animais, os que também possuíam desorganização esplênica apresentaram diminuição de hemácias ( $p=0,0066$ ), acompanhado pela menor quantidade de células da linhagem eritróide na medula óssea em relação aos com cultura negativa e baço organizado ( $p=0,0127$ ). Essas alterações foram acompanhadas pela elevação da expressão gênica IFN- $\gamma$  ( $p=0,0015$ ) e TNF ( $p=0,0091$ ) nos cães que possuíam *L. infantum* na medula óssea. **CONCLUSÕES:** desta maneira, cães com cultura esplênica positiva apresentam alterações de parâmetros hematológicos referentes a anemia e leucocitose com neutrofilia que são acompanhadas de hipoplasia eritróide e estão associadas a mudanças nas expressões de citocinas no microambiente medular, como o aumento de IFN- $\gamma$  e TNF.

**PALAVRAS-CHAVE:** Citocinas, Medula óssea, *Leishmania infantum*

ALMEIDA, Valter dos Anjos. Changes in bone marrow and hematological alterations in canine visceral leishmaniasis. 101 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

### **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** dogs with visceral leishmaniasis often have a wide variety of hematological abnormalities. **Objective:** this study aimed to associate hematological disorders with the distribution of cell lineages and the profile of cytokine expression in the bone marrow of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **MATERIAL AND METHODS:** after obtaining the diagnosis and the clinical laboratory tests, samples were collected and analyzed by conventional microscopy. After that, molecular biology techniques were used for detection of *L. infantum* and verification of cytokines expression that could influence in cell differentiation in the bone marrow. **RESULTS:** on the analysis, the *Leishmania* infection was detected by ELISA in 47/58 (81.0%) and splenic culture in 18/57 (31.6%). On the analysis, the *Leishmania* infection was detected by ELISA in 47/58 (81.0%) and splenic culture in 18/57 (31.6%). The majority of dogs with positive spleen culture had detection of *L. infantum* DNA in the bone marrow ( $p = 0.0004$ ) followed by histiocytosis ( $p = 0.0046$ ). Of these animals, those with splenic disorganization, they also presented a decrease of red blood cells ( $p = 0.0066$ ), accompanied by a decrease of erythroid lineage cells in bone marrow compared to those with negative culture and organized spleen ( $p = 0.0127$ ). These changes were accompanied by elevated gene expression IFN- $\gamma$  ( $p = 0.0015$ ) and TNF ( $p = 0.0091$ ) in dogs with *L. infantum* in the bone marrow. **CONCLUSIONS:** thus, dogs with positive spleen culture present anemia and leukocytosis with neutrophilia that are accompanied by erythroid hypoplasia and are associated with changes in the expression of cytokines in bone marrow microenvironment, such as the increase of IFN- $\gamma$  and TNF.

**KEYWORDS:** Cytokines, Bone marrow, *Leishmania infantum*



## LISTA DE TABELAS

---

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>TABELA 01</b> | Exemplos de fatores que estimulam a hematopoiese.....  | <b>40</b> |
| <b>TABELA 02</b> | Reagentes para as reações de Nested- PCR.....  | <b>67</b> |
| <b>TABELA 03</b> | Programações para as reações de Nested-PCR.....  | <b>67</b> |
| <b>TABELA 04</b> | <i>Primers</i> e sondas para as análises de expressão gênica da medula óssea canina por RTqPCR.....  | <b>69</b> |
| <b>TABELA 05</b> | Componentes para a realização dos procedimentos da RTqPCR.....   | <b>70</b> |
| <b>TABELA 06</b> | Características gerais dos cães semi-domiciliados capturados na cidade de Jequié, BA, Brasil (área endêmica de leishmaniose visceral) em 2010..... | <b>71</b> |

---

## LISTA DE FIGURAS

---

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
| <b>FIGURA 01</b> | Ciclo de vida dos protozoários do gênero <i>Leishmania</i> . Fonte: <a href="http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html">http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html</a> (traduzido e adaptado).....  | <b>25</b> |
| <b>FIGURA 02</b> | Status da endemidade da leishmaniose visceral no mundo, 2013. (Fonte: WHO, 2015).....  | <b>26</b> |
| <b>FIGURA 03</b> | (A) e (B) Hepatoesplenomegalia e emagrecimento em crianças com leishmaniose visceral na Índia (MURRAY et al., 2005).....   | <b>27</b> |
| <b>FIGURA 04</b> | Perfil da população e alojamento dos pacientes com leishmaniose visceral no Sudão e Índia (MURRAY et al., 2005).....   | <b>29</b> |
| <b>FIGURA 05</b> | Testes sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral. <b>a)</b> Teste de aglutinação direta. <b>b)</b> Fita do teste imunocromatográfico rK39. (CHAPPUIS et al., 2007 – Traduzido e adaptado).....   | <b>31</b> |
| <b>FIGURA 06</b> | Visão da complexa interação entre as respostas do tipo Th1 e Th2 na LVC. Uma mescla entre os tipos Th1 e Th2 ocorre em cães infectados, onde a Th2 direcionam para o desenvolvimento da doença e Th1 apresentam uma atividade protetora com resistência à <i>Leishmania</i> . As citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF induzem a ativação dos macrófagos que eliminam os amastigotas. Por outro lado, as citocinas IL-10, TGF- $\beta$ e IL-4 estão envolvidas na disseminação do parasita associada com o aumento de linfócitos B. (BANETH et al., 2008 – Traduzido e adaptado)..... | <b>35</b> |
| <b>FIGURA 07</b> | Esquema do amplo suprimento sanguíneo encontrado na medula óssea (ABBOUD; LICHTMAN, 2001; TRAVLOS, 2006 – Traduzido e adaptado).....   | <b>38</b> |

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
| <b>FIGURA 08</b> | Esquema da orientação aleatória das diferentes linhagens de células presentes no microambiente medular (WEISS; GEDULDIG, 1991 – Traduzido e adaptado).....  | <b>39</b> |
| <b>FIGURA 09</b> | Representação da progressão da maturação das múltiplas linhagens celulares presentes na medula óssea. CFU = Unidade formadora de colónias; E = Eritróide; Meg = Megacariócitos; GEMM = Granulocítico, eritróide, monócitos-macrófagos e megacariocíticos; GM = Granulócitos / monócitos; G = Granulócitos; M = Monócitos; Eo = Eosinófilos; Baso = basófilos; L = Linfócito. Desenho por David Sabio. (TRAVLOS, 2006 – Traduzido e adaptado)..... | <b>43</b> |
| <b>FIGURA 10</b> | Presença de adipócitos nas imagens do lado esquerdo. Exemplos de hiper celularidade nas imagens da direita (TRAVLOS, 2006 – Traduzido e adaptado).....  | <b>44</b> |
| <b>FIGURA 11</b> | Medula óssea femoral controle (imagens da esquerda) comparada a um aumento na eritropoiese em resposta à anemia em ratos (imagens da direita) (TRAVLOS, 2006b).....   | <b>46</b> |
| <b>FIGURA 12</b> | Comparação do prognóstico com as alterações encontradas durante a biópsia da medula óssea de pacientes com LV (KUMAR et al., 2007).....   | <b>52</b> |
| <b>FIGURA 13</b> | Alterações no hemograma apresentadas pelos cães com cultura esplênica positiva para <i>L. infantum</i> . Teste <i>t</i> de student.....   | <b>72</b> |
| <b>FIGURA 14</b> | Alterações do leucograma apresentadas pelos cães com cultura esplênica positiva para <i>L. infantum</i> . Teste Mann-Whitney.....   | <b>73</b> |
| <b>FIGURA 15</b> | Animal com linfohistiocitose hemofagocítica associado à LVC. Cão com cultura esplênica positiva e detecção do DNA de <i>L. infantum</i> na medula óssea. <b>Setas pretas:</b> Presença de histiócitos fagocitando eritrócitos (eritrofagocitose). <b>Setas amarelas:</b> Aumento na quantidade de plasmócitos no  |           |

|                  |   |           |
|------------------|---|-----------|
|                  | ambiente medular. (H&E - Aumento 40x).....  | <b>74</b> |
| <b>FIGURA 16</b> | Alterações hematológicas apresentadas pelos animais com cultura esplênica positiva para <i>Leishmania</i> associada a desorganização esplênica (teste estatístico Mann-Whitney).....  | <b>75</b> |
| <b>FIGURA 17</b> | Desorganização esplênica e diminuição da quantidade de nichos para diferenciação de células da linhagem eritróide na medula óssea (teste estatístico Mann-Whitney).....   | <b>75</b> |
| <b>FIGURA 18</b> | Alterações no leucograma dos cães com cultura esplênica positiva para <i>Leishmania</i> associada a desorganização esplênica (teste estatístico Mann-Whitney).....  | <b>76</b> |
| <b>FIGURA 19</b> | Alterações no leucograma dos cães com cultura esplênica positiva para <i>Leishmania</i> associada a desorganização esplênica (teste estatístico Mann-Whitney).....  | <b>76</b> |
| <b>FIGURA 20</b> | A – Exemplo da histologia de medula óssea de um cão negativo para cultura de <i>Leishmania</i> e com baço organizado. Notar presença razoável de adipócitos (setas pretas) e dos nichos de células eritróides no círculo branco. B - Cão com cultura esplênica positiva e baço desorganizado, notar diminuição da quantidade de adipócitos (setas pretas) caracterizando hiperplasia medular, ausência de nichos eritróides e presença de hiperplasia granulocítica (círculo preto). (H&E - Aumento 10x)..... | <b>77</b> |
| <b>FIGURA 21</b> | Presença de emperipoese de célula hematopoiética no interior de megacariócito. Observar citoplasmas separados por um espaço pericelular estreito (branco) indicado pela seta preta. (H&E – Aumento 10x).....  | <b>78</b> |
| <b>FIGURA 22</b> | Cães com presença de <i>Leishmania infantum</i> no microambiente medular possuíam uma menor quantidade  | <b>79</b> |

|                  |  |           |
|------------------|--|-----------|
|                  | de eritrócitos e hemoglobina (Teste estatístico: <i>t</i> de student).....   |           |
| <b>FIGURA 23</b> | A presença de <i>Leishmania infantum</i> no microambiente medular eleva a expressão gênica de IFN- $\gamma$ e TNF na medula óssea de cães naturalmente infectados (Teste estatístico: Mann-Whitney).....                 | <b>79</b> |
| <b>FIGURA 24</b> | Elevação da expressão gênica de IFN- $\gamma$ e TNF no ambiente medular dos cães com trombocitopenia comparados aos que apresentaram quantidades normais de plaquetas circulantes (Teste estatístico: Mann-Whitney)..... | <b>80</b> |
| <b>FIGURA 25</b> | Cães que apresentaram linfocitose mostraram aumento na expressão de IFN- $\gamma$ e de TNF na medula óssea em relação aos cães com quantidade normais de linfócitos e/ou linfocitopenia.....                             | <b>81</b> |
| <b>FIGURA 26</b> | Redução na expressão de TGF- $\beta$ em cães monocitopênicos e linfocitopênicos em relação aos que possuíam quantidades normais de monócitos e linfócitos circulantes.....   | <b>82</b> |

---

## **LISTA DE ABREVIÇÕES**

---

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| <b>(M:E)</b>                   | Proporção celular mielóide/eritróide                              |
| <b>BFU-E</b>                   | Unidade formadora de “explosão” eritróide                         |
| <b>CFU</b>                     | Unidade formadora de colônia                                      |
| <b>CFU-E</b>                   | Unidade formadora de colônia eritróide                            |
| <b>CSF</b>                     | Fator estimulador de colônias                                     |
| <b>CXC</b>                     | Ligantes de quimiocinas com mais de 2 resíduos de cisteína juntos |
| <b>DAT</b>                     | Teste de aglutinação direta                                       |
| <b>DDT</b>                     | Dicloro-difenil-tricloroetano                                     |
| <b>DNA</b>                     | Ácido Desoxirribonucléico   |
| <b>DTH</b>                     | Reação de hipersensibilidade tardia                               |
| <b>EDTA</b>                    | Ácido etilenodiamino tetra-acético                                |
| <b>ELISA</b>                   | Ensaio imunoenzimático  |
| <b>EPO</b>                     | Eritropoietina  |
| <b>EpoR</b>                    | Receptor da eritropoietina  |
| <b>ESP</b>                     | Proteínas excretadas-secretadas                                   |
| <b>FML</b>                     | Ligante de fucose Manose  |
| <b>G-CSF</b>                   | Fator estimulador de colônias de granulócitos                     |
| <b>GM-CSF</b>                  | Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos        |
| <b>H&amp;E</b>                 | Coloração Hematoxilina-Eosina                                     |
| <b>IFA</b>                     | Imunofluorescência indireta                                       |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b> | Interferón gama   |
| <b>IL</b>                      | Interleucina  |
| <b>IP-10/CXCL10</b>            | Proteína 10 induzida pelo IFN- $\gamma$                           |
| <b>IV</b>                      | Intravenosa   |
| <b>LV</b>                      | Leishmaniose visceral   |
| <b>LC</b>                      | Leishmaniose cutânea  |
| <b>LiSEP</b>                   | Proteínas excretadas-secretadas de <i>L. infantum</i>             |
| <b>LVC</b>                     | Leishmaniose visceral canina                                      |
| <b>M-CSF</b>                   | Fator estimulador de colônias de macrófagos                       |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>MHC</b>                    | Complexo principal de histocompatibilidade                             |
| <b>MIG/CXCL9</b>              | Monocina induzida pelo IFN- $\gamma$                                   |
| <b>NESTED-PCR</b>             | Reação em cadeia da polimerase NESTED                                  |
| <b>NO</b>                     | Óxido nítrico  |
| <b>PB</b>                     | Pares de base  |
| <b>PBMC's</b>                 | Células mononucleares do sangue periférico                             |
| <b>PBS</b>                    | Salina tamponada com fosfato   |
| <b>PCR</b>                    | Reação em cadeia da polimerase   |
| <b>qPCR</b>                   | Reação em cadeia da polimerase quantitativa                            |
| <b>RNA</b>                    | Ácido Ribonucleico   |
| <b>RNAm</b>                   | Ácido Ribonucleico mensageiro  |
| <b>RT</b>                     | Transcrição reversa  |
| <b>RTqPCR</b>                 | Transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase -<br>quantitativa |
| <b>SCF</b>                    | Fator de células tronco  |
| <b>TAE</b>                    | Tris-acetato-EDTA  |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | Fator de transformação do crescimento beta                             |
| <b>Th1</b>                    | Linfócitos T auxiliares tipo 1   |
| <b>Th17</b>                   | Linfócitos T auxiliares tipo 17  |
| <b>Th2</b>                    | Linfócitos T auxiliares tipo 2   |
| <b>TIC</b>                    | Teste imunocromatográfico rK39   |
| <b>TNF</b>                    | Fator de necrose tumoral   |
| <b>TRAIL</b>                  | Ligante indutor de apoptose relacionados com TNF                       |

## SUMÁRIO

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | <b>24</b> |
| 2.1      | LEISHMANIOSES.....  | 24        |
| 2.2      | TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA .....   | 24        |
| 2.3      | LEISHMANIOSE VISCERAL .....   | 26        |
| 2.3.1    | Epidemiologia.....  | 26        |
| 2.3.2    | Manifestações clínicas.....   | 27        |
| 2.3.3    | Patogênese e resposta imunológica na LV .....                             | 27        |
| 2.3.4    | Diagnóstico da LV .....   | 29        |
| 2.3.4.1  | <i>Demonstração de Leishmania</i> .....                                   | 29        |
| 2.3.4.2  | <i>Testes para detecção do DNA e dos anticorpos anti-Leishmania</i> ..... | 30        |
| 2.4      | DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA LV .....                               | 31        |
| 2.5      | LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).....                                   | 31        |
| 2.6      | MEDULA ÓSSEA.....   | 36        |
| 2.6.1    | Estrutura, função e visão geral da medula óssea .....                     | 36        |
| 2.6.2    | Patologia da medula óssea.....  | 43        |
| 2.6.2.1  | <i>Distúrbios no crescimento (hiperplasias)</i> .....                     | 43        |
| 2.6.2.2  | <i>Distúrbios no crescimento (hipoplasias)</i> .....                      | 47        |
| 2.6.2.3  | <i>Alterações inflamatórias da medula óssea</i> .....                     | 48        |
| 2.7      | HEMATOLOGIA E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS .....                              | 50        |
| 2.7.1    | Anemia.....   | 50        |
| 2.7.2    | Trombocitopenia.....  | 50        |
| 2.7.3    | Alterações dos leucócitos .....   | 51        |
| 2.7.3.1  | <i>Leucocitose</i> .....  | 51        |
| 2.7.3.2  | <i>Leucopenia</i> .....   | 51        |
| 2.8      | MEDULA ÓSSEA NA LEISHMANIOSE VISCERAL.....                                | 51        |
| 2.8.1    | Medula óssea na LVC.....  | 54        |
| <b>3</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>56</b> |
| <b>4</b> | <b>HIPÓTESE</b> .....   | <b>57</b> |
| <b>5</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>58</b> |
| 5.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 58        |
| 5.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 58        |
| <b>6</b> | <b>DESENHO EXPERIMENTAL</b> .....   | <b>59</b> |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>7</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>60</b> |
| 7.1      | DECLARAÇÃO DE ÉTICA.....   | 60        |
| 7.2      | ANIMAIS.....   | 60        |
| 7.3      | EXAME CLÍNICO.....   | 60        |
| 7.4      | ELISA.....   | 61        |
| 7.5      | ANESTESIA, EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAIS.....  | 61        |
| 7.6      | CULTURA ESPLÊNICA.....   | 62        |
| 7.7      | GRUPOS DE COMPARAÇÕES.....   | 63        |
| 7.8      | HEMATOLOGIA.....   | 63        |
| 7.9      | ANÁLISES HISTOLÓGICAS DO BAÇO E MEDULA ÓSSEA.....  | 63        |
| 7.9.1    | Análises da medula ósea.....   | 64        |
| 7.9.2    | Análises histológicas do baço.....   | 65        |
| 7.10     | BIOLOGIA MOLECULAR DA MEDULA ÓSSEA.....  | 65        |
| 7.10.1   | Extração do material genético.....   | 65        |
| 7.10.2   | Deteção de <i>Leishmania infantum</i> por Nested-PCR.....  | 66        |
| 7.10.3   | Quantificação do DNA de <i>Leishmania sp</i> por qPCR.....   | 67        |
| 7.10.4   | Quantificação da expressão gênica das citocinas na medula óssea.....   | 68        |
| 7.10.4.1 | Extração do RNA.....   | 68        |
| 7.10.4.2 | Expressão das citocinas <i>IL-1<math>\beta</math></i> , <i>IL-4</i> , <i>IL-10</i> , <i>IFN-<math>\gamma</math></i> , <i>TGF-<math>\beta</math></i> e <i>TNF</i> por RTqPCR..... | 68        |
| 7.10.5   | Análises estatísticas.....   | 70        |
| <b>8</b> | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>71</b> |
| 8.1      | CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CÃES.....   | 71        |
| 8.2      | CULTURA ESPLÊNICA POSITIVA PARA <i>LEISHMANIA</i> E ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....   | 72        |
| 8.3      | ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM CULTURA ESPLÊNICA POSITIVA.....  | 73        |
| 8.4      | DISTÚRBIOS HEMATOLÓGICOS E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MEDULA ÓSSEA DOS CÃES COM CULTURA POSITIVA E DESORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA.....   | 74        |
| 8.5      | OUTRAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ENCONTRADAS NA MEDULA ÓSSEA DOS CÃES NO PRESENTE ESTUDO.....  | 77        |
| 8.6      | DIMINUIÇÃO DA QUANTIDADE DE HEMÁCIAS CIRCULANTES DE CÃES QUE TIVERAM PRESENÇA DE PARASITOS NO MICROAMBIENTE MEDULAR DETECTADA POR NESTED PCR.....                                | 78        |
| 8.7      | ELEVAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IFN- $\Gamma$ E TNF EM CÃES QUE TIVERAM PRESENÇA DE PARASITOS NO MICROAMBIENTE MEDULAR DETECTADA POR NESTED PCR.....                             | 79        |
| 8.8      | ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS APRESENTADAS PELOS ANIMAIS COM ELEVAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IFN- $\Gamma$ E TNF NA MEDULA ÓSSEA.....   | 80        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 8.9       | EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-1B, IL-4, IL-10 E TGF-B NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i> ..... | 81        |
| <b>9</b>  | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>83</b> |
| <b>10</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | <b>88</b> |
| <b>11</b> | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | <b>89</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

---

A leishmaniose visceral (LV), no Brasil causada por *Leishmania infantum*, é distribuída na Europa, nas Américas, partes da Ásia e África (DESJEUX, 2004). Os pacientes com LV apresentam febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia (MURRAY et al., 2005). Se não forem adequadamente tratados, evoluem com hemorragias, infecções secundárias e morte (MURRAY et al., 2005; WHO, 2015).

Os cães domésticos desempenham um papel fundamental na manutenção da doença em regiões endêmicas, atuando como o principal reservatório doméstico e fonte de infecção para flebotomíneos que transmitem o protozoário aos seres humanos (DEANE, 1956; MARZOCHI et al., 1985; ALVAR et al., 2004). Com base na similaridade da evolução natural dos sinais clínicos observados em cães e seres humanos, a leishmaniose visceral canina tem sido utilizada como um modelo de estudo para uma melhor compreensão desta enfermidade nos humanos (SANCHEZ et al., 2004; REIS et al., 2006; COSTA et al., 2013).

As células sanguíneas são provenientes das células pluripotentes hematopoiéticas localizadas na medula óssea (LI; XIE, 2005; VALLI et al., 2007), órgão comumente afetado nas infecções por *Leishmania infantum* (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010). A auto-renovação e a diferenciação das células pluripotentes hematopoiéticas depende do ambiente promovido pelos componentes presentes na cavidade medular (VALLI et al., 2007).

Para uma adequada produção das células sanguíneas são necessárias interações entre as células pluripotentes hematopoiéticas e os diferentes componentes presentes no microambiente da cavidade medular (VALLI et al., 2007). Esta cooperação é influenciada pela produção de citocinas e quimiocinas as quais interferem na atividade hematopoiética (BEHRINGER et al., 1997; BROXMEYER et al., 1997).

A medula óssea é um importante local de detecção de *Leishmania infantum* (DA SILVA et al., 2005). A presença do protozoário ativa a resposta

imune e interfere na expressão e produção de citocinas por células presentes nos tecidos (FALEIRO et al., 2014), o que pode influenciar o processo de diferenciação celular na medula óssea (DE BRUIN et al., 2013; DE BRUIN et al., 2014).

IFN- $\gamma$  e TNF são importantes citocinas sintetizadas e liberadas durante a resposta imune efetora na leishmaniose visceral canina (BANETH et al., 2008). O surgimento de displasia eritróide e megacariocítica pode estar associada ao aumento na produção destas citocinas devido à presença elevada de macrófagos na medula óssea dos cães infectados (MANZILLO et al., 2006).

Em doenças crônicas, o IFN- $\gamma$  afeta o metabolismo do ferro e limita a disponibilidade deste componente durante a eritropoiese (WEISS, 2009). Adicionalmente, esta citocina eleva a quantidade de macrófagos ativado que podem promover eritrofagocitose contribuindo na diminuição de eritrócitos circulantes (ZOLLER et al., 2011).

O IFN- $\gamma$  é um redutor da atividade hematopoiética medular (SELLERI et al., 1996) e afeta consideravelmente a diferenciação da maioria das células progenitoras hematopoiéticas (DE BRUIN et al., 2014). Alguns autores também demonstram que o TNF possui efeitos inibidores nas células tronco hematopoiéticas em camundongos (PRONK et al., 2011), assim como também em progenitores eritróides humanos (BFU-E e CFU-E) (ROODMAN et al., 1987).

As alterações histológicas presentes na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum* não estão muito bem estudadas, poucos são os artigos que realizam o estudo histopatológico da medula óssea, no entanto, alguns estudos citológicos mostram que a presença do parasita interfere a produção de algumas linhagens celulares, como eritróide e trombocitária (MANZILLO et al, 2006; DE ABREU et al, 2011; NICOLATO et al, 2013).

A presença de *L. infantum* causa diversas alterações histológicas na medula óssea (KUMAR et al., 2007). Ao analisar juntamente esses fatores, é de suma importância o conhecimento das respostas específicas da medula

óssea frente a estas alterações e suas influências nos parâmetros hematológicos para um correto desenvolvimento de ferramentas terapêuticas e profiláticas.

Neste estudo, analisamos as alterações anatomopatológicas do microambiente medular e associamos essas alterações com os distúrbios hematológicos apresentados por cães com leishmaniose visceral naturalmente adquirida. Para isso, avaliamos os perfis clínico-laboratoriais dos animais, realizamos as análises histológicas e estimamos as expressões gênicas de citocinas por RTqPCR em tempo real na medula óssea.

Os mecanismos da anemia na leishmaniose visceral canina ainda não estão muito bem elucidados. Assim, para melhorar o entendimento das alterações medulares que resultam em distúrbios hematológicos na leishmaniose visceral canina, avaliamos a expressão de citocinas que interferem na hematopoiese e diferenciação celular no microambiente medular de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.

Desta forma, o objetivo deste estudo consiste em avaliar histologicamente a medula óssea, estimar a expressão de citocinas inflamatórias neste órgão durante a infecção por *Leishmania*, determinar as possíveis interferências na distribuição dos nichos de diferenciação celular que estão associadas com os sinais clínicos hematológicos e a gravidade na leishmaniose visceral canina.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

---

### 2.1 LEISHMANIOSES

Em 1903, Leishman e Donovan descreveram o protozoário atualmente denominado *Leishmania donovani* isolados do tecido esplênico de pacientes indianos com uma doença grave agora denominada leishmaniose visceral (LV) (HERWALDT, 1999).

As leishmanioses são síndromes clínicas causadas por cerca de 20 espécies de *Leishmania* e transmitidas por, aproximadamente, 30 espécies dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (novo mundo) (DESJEUX, 1996; ASHFORD, 2000). Estas síndromes resultam da replicação do protozoário em diversos locais do organismo, como no sistema mononuclear fagocitário, derme e mucosa naso-orofaríngea (HERWALDT, 1999).

A leishmaniose cutânea (LC) pode ser causada por qualquer espécie de *Leishmania* que infecta os humanos, a leishmaniose mucocutânea geralmente é causada por *L. braziliensis*, a leishmaniose dérmica pós-calazar por *Leishmania donovani* como sequência à cura da LV inicial e a leishmaniose cutânea difusa é causada por *L. aethiopica* ou *L. amazonensis* (ASHFORD, 2000).

A LV, causada pelo complexo *Leishmania donovani*, é uma doença sistêmica com distribuição mundial, alta morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento (HERWALDT, 1999). Popularmente conhecida como calazar, normalmente é causada por *L. donovani* ou *L. infantum* (ASHFORD, 2000), no entanto, há evidências de que a *L. chagasi*, espécie associada à enfermidade no Brasil, constitua uma sinonímia da *L. infantum* (MAURÍCIO et al., 2000).

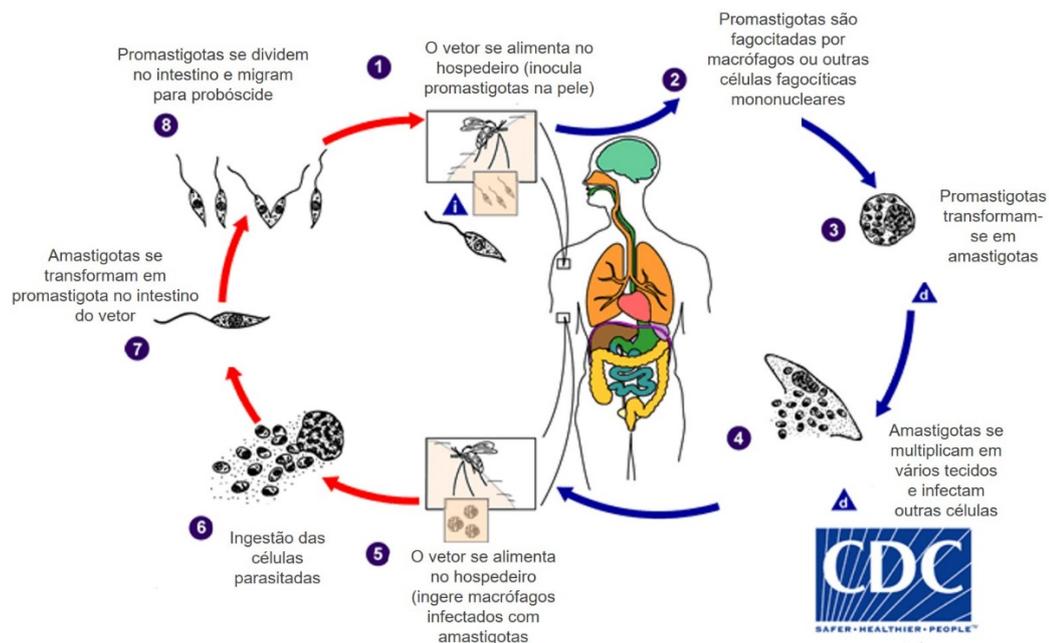
### 2.2 TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

Flebotomíneos fêmeas (*Phlebotomus* e *Lutzomyia* spp) se infectam ao realizarem repasto sanguíneo em seres humanos (antropozoonose) ou

mamíferos terrestres (zoonoses) infectados (MURRAY et al., 2005). Desta maneira, as formas amastigotas de *Leishmania* presentes nos fagolisossomos de macrófagos e outros fagócitos são ingeridos pelo vetor (BATES, 2007).

Dentro do organismo do flebotomíneo, os amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicos, onde, após alguns dias, se transformam em promastigotas nectomônadas (BATES, 2007). Ao atingirem a válvula estomodeal do vetor, se diferenciam em promastigotas leptomonas (GOSSAGE et al., 2003) e, por fim, algumas promastigotas leptomonas se diferenciam em promastigotas metacíclicas (ROGERS et al., 2004), formas capazes de infectar os hospedeiros mamíferos. Estas formas são depositadas na pele do novo hospedeiro em um novo repasto sanguíneo dos flebotomíneos fêmeas, e assim ocorre a parte final da transmissão do protozoário (BATES, 2007).

Dentro dos fagolisossomos dos macrófagos residentes, as promastigotas sobreviventes se diferenciam em amastigotas, se multiplicam e posteriormente infectam outros macrófagos ao redor ou em tecidos distantes após sua disseminação pelo organismo por via sanguínea ou linfática (MURRAY et al., 2005). O ciclo de vida do protozoário encontra-se resumido na figura 01.

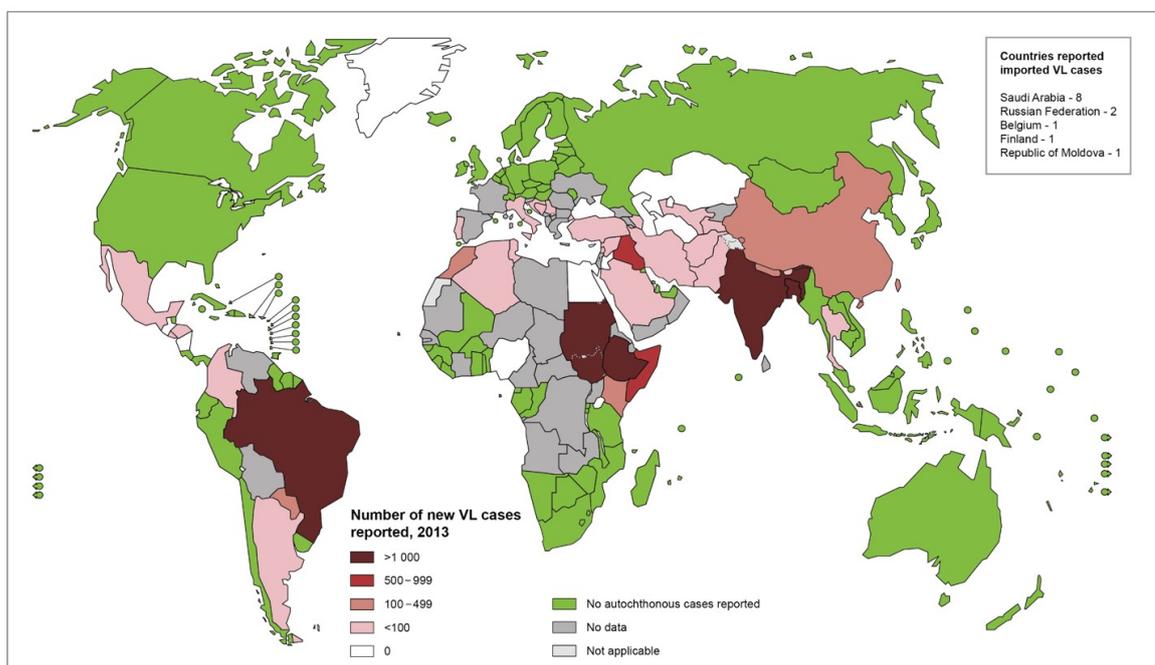


**Figura 01:** Ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania*. Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (traduzido e adaptado)

## 2.3 LEISHMANIOSE VISCERAL

### 2.3.1 Epidemiologia

A LV está distribuída na Europa, Américas, partes da Ásia, da África e afeta cerca de 500.000 pessoas com aproximadamente 50.000 mortes por ano (DESJEUX, 2004). O Brasil é um dos seis países que se enquadram nos 90% dos casos de leishmaniose visceral do mundo, são eles: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 02) (WHO, 2015).



**Figura 02:** Status da endemidade da leishmaniose visceral no mundo, 2013. (Fonte: WHO, 2015).

A distribuição da doença nas Américas não está precisamente esclarecida pelo fato da baixa efetividade dos programas de vigilância (HOTEZ et al., 2004). A LV, era normalmente conhecida como uma doença endêmica rural, no entanto, se tornou endêmica e epidêmica nas grandes cidades brasileiras desde a década de 1980 (WERNECK, 2008).

O primeiro registro de LV no Brasil foi descrito por Migone em 1913 em um paciente proveniente do Mato Grosso (ALENCAR et al., 1991). Após alguns anos, durante um estudo epidemiológico de febre amarela, foram

diagnosticados 41 casos nas regiões Norte e Nordeste, marcando o início dos estudos sobre a distribuição geográfica da LV nas Américas (PENNA, 1934).

### 2.3.2 Manifestações clínicas

A LV engloba uma ampla variedade de manifestações clínicas, no entanto, pode permanecer assintomática ou subclínica, aguda, subaguda ou se apresentar de forma crônica (HERWALDT, 1999). Os principais sinais apresentados por pacientes com LV bem estabelecida são febre, caquexia grave, hepatoesplenomegalia (Figura 03), pancitopenia e hipergamaglobulinemia com hipoalbuminemia (HERWALDT, 1999). Os sintomas persistem semanas ou meses e os pacientes podem evoluir para óbito devido a coinfeções bacterianas, hemorragia ou anemia grave (CHAPPUIS et al., 2007).

Resumidamente, as manifestações da doença visceral variam entre fatal e infecção assintomática (KUMAR; NYLÉN, 2012).



**Figura 03:** (A) e (B) Hepatoesplenomegalia e emagrecimento em crianças com leishmaniose visceral na Índia (MURRAY et al., 2005).

### 2.3.3 Patogênese e resposta imunológica na LV

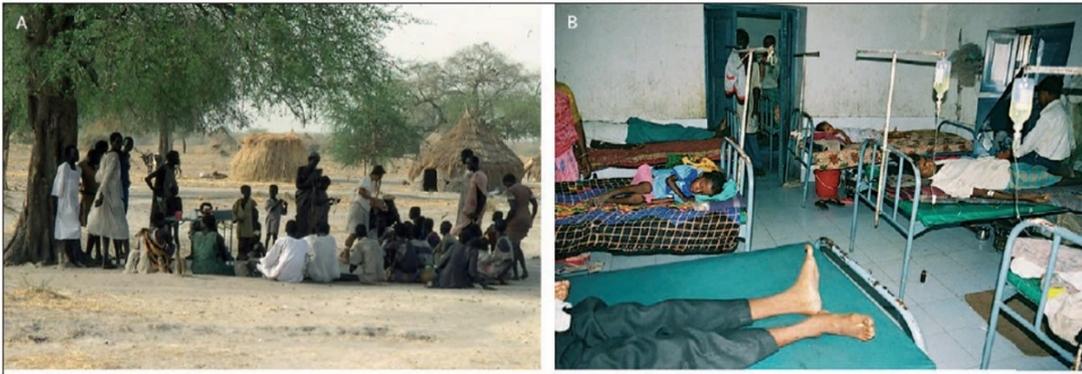
O curso da LV varia com a eficiência da resposta imune do hospedeiro em relação à persistência e multiplicação do parasita (REIS et al., 2010). A ineficiência da resposta imune adaptativa proveniente dos linfócitos T contra o parasita, resulta no surgimento dos sintomas clínicos, aumento dos níveis de anticorpos específicos contra *Leishmania* e elevadas cargas parasitárias na pele, medula óssea, baço, fígado e linfonodos (REIS et al., 2009; REIS et al., 2010).

Uma vez presente no organismo do hospedeiro, os parasitas se disseminam através da circulação linfática e/ou sanguínea, vias pelas quais atingem a medula óssea e outros órgãos como baço, fígado e linfonodos (CHAPPUIS et al., 2007).

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC's) são utilizadas para testes da capacidade de resposta imunológica dos pacientes com LV. Carvalho et al., 1992, verificaram que as células de pacientes subclínicos ou assintomáticos, quando estimuladas com antígenos de *Leishmania*, respondem com elevação na produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-12.

Por outro lado, as PBMC's de pacientes com LV estabelecida não proliferam ou produzem IFN- $\gamma$  quando estimuladas com antígeno de *Leishmania* (SACKS et al., 1987; WHITE et al., 1992). Outros estudos demonstram a relação na produção de IFN- $\gamma$  com pacientes assintomáticos (SACKS et al., 1987; CARVALHO et al., 1992; WHITE et al., 1992).

Os fatores ambientais também são importantes no desenvolvimento de LV. O agravamento da doença é comumente visto em pacientes provenientes de populações carentes com baixo estado nutricional (Figura 04) (ANSTEAD et al., 2001). A má-nutrição afeta a resposta imune e facilita a visceralização de *Leishmania* (ANSTEAD et al., 2001).



**Figura 04:** Perfil da população e alojamento dos pacientes com leishmaniose visceral no Sudão e Índia (MURRAY et al., 2005).

#### 2.3.4 Diagnóstico da LV

O diagnóstico da LV é complexo pois suas características clínicas são compartilhadas com uma série de outras doenças, inclusive enfermidades que se desenvolvem juntamente com a LV (co-infecções) (SUNDAR; RAI, 2002). Sendo assim, os testes de diagnósticos são essenciais e contribuem na determinação do tratamento dos pacientes com a enfermidade (CHAPPUIS et al., 2007).

##### 2.3.4.1 Demonstração de *Leishmania*

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado pela demonstração de *Leishmania* em tecidos provenientes do paciente, durante exames com microscópico de luz ou na cultura *in vitro* (SUNDAR; RAI, 2002).

A forma clássica do diagnóstico definitivo para LV é realizada através da visualização de formas amastigotas do protozoário por exame microscópico dos linfonodos, aspirados esplênicos ou de medula óssea (CHAPPUIS et al., 2007).

O diagnóstico parasitológico continua sendo o padrão ouro por causa de sua alta especificidade (HERWALDT, 1999). No entanto, a sensibilidade varia consideravelmente uma vez que a precisão do exame microscópico é influenciada pela qualidade da amostra, pela capacidade técnica do

examinador e pela qualidade dos reagentes utilizados nos procedimentos (HERWALDT, 1999; CHAPPUIS et al., 2007; REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

A sensibilidade na técnica do esfregaço de medula óssea é em torno de 60 a 85%, já o aspirado esplênico é um dos métodos mais valiosos para o diagnóstico de LV e apresenta sensibilidade superior a 95% (SUNDAR; RAI, 2002).

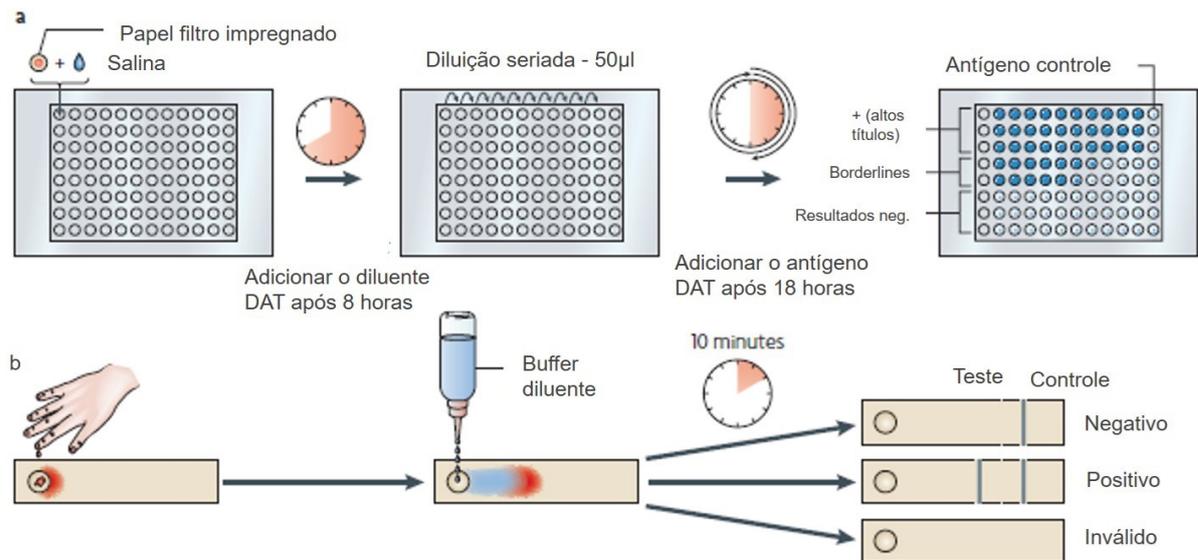
#### 2.3.4.2 Testes para detecção do DNA e dos anticorpos anti-*Leishmania*

Embora os níveis de anticorpos presentes no soro do paciente diminuam após tratamento (KUMAR et al., 2001; BRAZ et al., 2002), os testes que detectam os anticorpos específicos anti-*Leishmania* podem permanecer detectáveis anos após a cura (ALMEIDA et al., 2006). Sendo assim, é difícil estabelecer um diagnóstico sorológico em um caso de recidiva de LV, o que se faz necessário o uso de outras formas de diagnóstico em associação para ter acesso ao perfil clínico do paciente (CHAPPUIS et al., 2007).

Os testes sorológicos baseados em imunofluorescência indireta (IFA), ensaio imunoenzimático (ELISA) ou western blot, normalmente apresentam alta precisão diagnóstica em pesquisas científicas (IQBAL, et al., 2002).

A proteína recombinante rK39, a qual possui uma repetição de 39 aminoácidos que fazem parte de uma proteína recombinante de 230-kDa presente em amastigotas de *L. chagasi* (BURNS et al., 1993), é uma alternativa para a detecção dos anticorpos anti-*Leishmania* (BRAZ et al., 2002; CHAPPUIS et al., 2007). A utilização deste teste apresenta excelente sensibilidade (93 - 100%) e especificidade (97 - 98%) em alguns locais endêmicos para LV (BRAZ et al., 2002), porém, pesquisas indicam algumas limitações de sensibilidade e problemas de persistência na positividade do teste após o tratamento dos pacientes (ZIJLSTRA et al., 2001).

Os grandes benefícios na utilização da proteína recombinante rK39 para o diagnóstico da LV são: adequação para pesquisa em campo, custo reduzido, rápido tempo na obtenção do resultado e reprodutibilidade (ZIJLSTRA et al., 2001; CHAPPUIS et al., 2007) (Figura 05).



**Figura 05:** Testes sorológicos para o diagnóstico da leishmaniose visceral. **a)** Teste de aglutinação direta. **b)** Fita do teste imunocromatográfico rK39. (CHAPPUIS et al., 2007 – Traduzido e adaptado)

## 2.4 DROGAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA LV

Diversos medicamentos foram disponibilizados para o tratamento da LV com o intuito de alcançar formas ideais para o tratamento, ou seja, que possuam baixa toxicidade, sem resistência, preços acessíveis, vias de administrações adequadas para utilização em campo e adequado tempo de tratamento (FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

Os antimoniais pentavalentes fazem parte da primeira linha de escolha quando os pacientes ainda não desenvolveram resistência (SINGH et al., 2006). A anfotericina B é amplamente utilizada no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (SINGH et al., 2012). Em alguns locais endêmicos onde a resistência de espécies de *Leishmania* aos antimoniais é comum, a anfotericina B é a segunda opção no tratamento dos pacientes (BERN et al., 2006).

## 2.5 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)

Baseado na semelhança da evolução natural e na similaridade dos sinais clínicos observados em cães e humanos, a leishmaniose visceral canina

tem sido utilizada como modelo para o entendimento da complexa patogênese da doença humana (SANCHEZ et al., 2004; REIS et al., 2006).

A maioria dos cães com LVC apresenta uma condição corporal debilitada com atrofia muscular generalizada, linfadenomegalia e escamação excessiva da pele (BANETH et al., 2008). O principal achado histopatológico nos tecidos é uma reação inflamatória granulomatosa associada a presença de formas amastigotas de *Leishmania* em macrófagos (BANETH et al., 2008).

A pele é o primeiro contato dos protozoários do gênero *Leishmania* provenientes dos flebotomíneos com os hospedeiros (GIUNCHETTI et al., 2006). Assim, as lesões cutâneas são comuns na LVC, os animais apresentam dermatite pustulosa, lesões esfoliativas, ulcerosas e nodulares (SOLANO-GALLEGO et al., 2004).

Linfadenomegalia é uma alteração comum em cães com LV, normalmente, os linfonodos cervicais e poplíteos se encontram aumentados de tamanho (CIARAMELLA et al., 1997). Esse aumento no tamanho normalmente se associa ao aumento do número e tamanho dos folículos linfóides seguido de hipertrofia e hiperplasia acentuada dos macrófagos presentes nos seios e cordões medulares do linfonodo (LIMA et al., 2004).

Cães com LV apresentam uma alta frequência de periesplenite, desenvolvem granulomas, demonstram desorganização estrutural do parênquima esplênico seguido de atrofia dos folículos linfóides e da zona marginal (SANTANA et al., 2008). As alterações esplênicas na infecção natural estão associadas com uma baixa expressão de CXCL13, desordem na migração dos linfócitos B e desestruturação do centro germinativo (SILVA et al., 2012). Em resumo, os animais com LV apresentam alterações estruturais na polpa branca do baço (SANTANA et al., 2008) e este fato está associado com a gravidade da doença (LIMA et al., 2014).

Há indicativos de progressão da doença renal para proteinúria assintomática, síndrome nefrótica ou até mesmo insuficiência renal crônica com glomerulonefrite associada à depósitos de imunocomplexos, nefrite túbulo-intersticial e amiloidose (KOUTINAS et al., 1999). Um aumento na membrana basal glomerular, proliferação de células mesangiais e crescimento

da matriz mesangial são alterações adicionais observadas em associação com depósitos aos complexos imunes nos rins (NIETO et al., 1992).

Cães com LVC podem apresentar claudicação, dor nas articulações e atrofia muscular (AGUT et al., 2003). A atrofia muscular progressiva está associada a um grau variável de necrose das fibras musculares, polimiosite crônica caracterizada pela presença de infiltrados mononucleares com formas amastigotas de *Leishmania*, vasculite neutrofilica e depósitos de imunocomplexos de IgG nos tecidos musculares (VAMVAKIDIS et al., 2000). Quando os ossos são acometidos, geralmente apresentam lesões proliferativas intramedulares e no periósteo, com frequente osteólise cortical e medular (AGUT et al., 2003).

Cães com LVC podem apresentar uma variedade de anormalidades hematológicas, como anemia, leucopenia e trombocitopenia (BANETH et al., 2008).

A anemia está presente na maioria dos cães sintomáticos com LV, onde, os principais fatores patogênicos para esta alteração são a doença renal, diminuição da eritropoiese causada pela cronicidade da doença e a perda de sangue através de ferimentos apresentados pelos animais (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999).

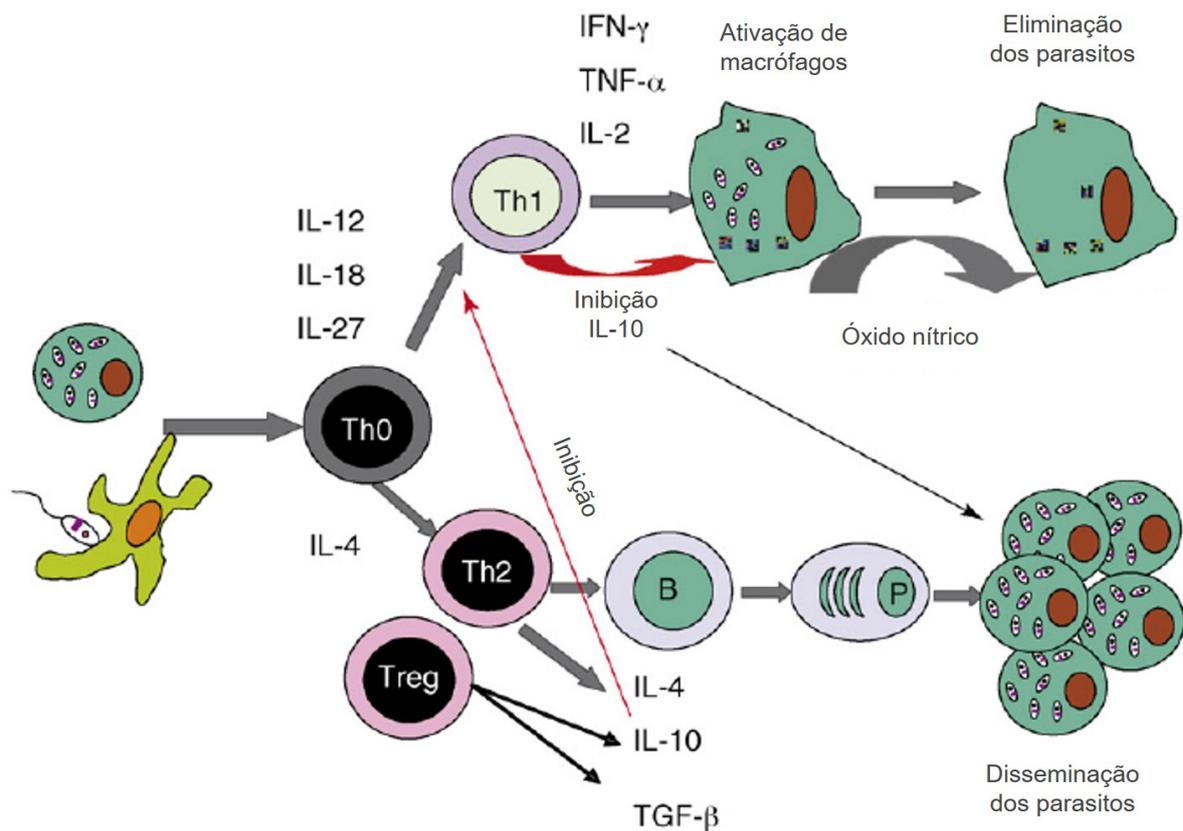
A epistaxe muitas vezes é o único sinal aparente que está associado com a trombocitopenia apresentada pelos cães com LVC (BANETH et al., 2008). Jüttner e colaboradores (2001) acreditam que as causas significativas de epistaxe na LVC se devem ao surgimento de lesões ulcerativas e inflamatórias na mucosa nasal. As alterações patológicas presentes na medula óssea de cães com LV podem atingir a linhagem eritrocitária, leucocitária (MANZILLO et al., 2006) e trombocitária levando o surgimento de distúrbios hemostáticos que podem ocorrer devido a disfunção plaquetária (CIARAMELLA et al., 2005).

O grau de desenvolvimento da LVC depende do espectro imunológico do animal que indica a forma como a doença vai progredir (CABRAL et al., 1998). Com base em estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foi verificado que os macrófagos desempenham um papel fundamental no controle da infecção por *Leishmania* (BANETH et al., 2008). Além disso, o aumento na produção de

interleucina 2 (IL-2) e fator de necrose tumoral (TNF) está associado com o perfil assintomático da doença (BANETH et al., 2008). O óxido nítrico (NO) é a principal molécula efetora que causa a morte intracelular de *Leishmania* por induzir apoptose das formas amastigotas (HOLZMULLER et al., 2006). As citocinas interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e TNF, secretadas pelos linfócitos T ativados induzem essa atividade leishmanicida dos macrófagos (BANETH et al., 2008).

Subtende-se que *Leishmania infantum* parece induzir respostas imunológicas mistas entre os tipos Th1 e Th2, onde o controle da disseminação do protozoário ou progressão da doença são determinadas pelo equilíbrio entre estas formas de respostas imunológicas (Figura 06) (BANETH et al., 2008).

O baço é um órgão comumente afetado na infecção natural por *L. infantum* (SANTANA et al., 2008; SILVA et al., 2012; LIMA et al., 2014). A resposta imune esplênica de cães com leishmaniose visceral é tanto do tipo Th1 quanto Th2, onde inicialmente ocorre uma elevação da interleucina 4 (IL-4) que pode estar relacionada com a persistência de parasitas mesmo com elevação na expressão de IFN- $\gamma$  (STRAUSS-AYALI et al., 2007).



**Figura 06:** Visão da complexa interação entre as respostas do tipo Th1 e Th2 na LVC. Uma mescla entre os tipos Th1 e Th2 ocorre em cães infectados, onde a Th2 direcionam para o desenvolvimento da doença e Th1 apresentam uma atividade protetora com resistência à *Leishmania*. As citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF induzem a ativação dos macrófagos que eliminam os amastigotas. Por outro lado, as citocinas IL-10, TGF- $\beta$  e IL-4 estão envolvidas na disseminação do parasita associada com o aumento de linfócitos B. (BANETH et al., 2008 – Traduzido e adaptado).

A determinação da função e atividade das subpopulações de linfócitos Th1 e Th2 em diferentes tecidos e órgãos de cães infectados é fundamental para compreender os mecanismos das respostas imunológicas induzidas pela infecção por *Leishmania* (MAIA; CAMPINO, 2012).

Em algumas pesquisas não se pôde observar as diferenças das formas de apresentação da resposta imunológica entre cães sintomáticos e assintomáticos (CORRÊA et al., 2007; LAGE et al., 2007), outras sugerem que os sintomas clínicos não ocorrem por conta de uma deficiência na produção de IFN- $\gamma$  (QUINNELL et al., 2001).

Adicionalmente, células mononucleares, provenientes de animais assintomáticos, que são estimuladas com antígeno de *Leishmania*, podem produzir tanto IFN- $\gamma$  (citocina presente na resposta do tipo Th1) quanto IL-4 (citocina presente na resposta do tipo Th2) (CHAMIZO et al., 2005).

Na LVC, uma elevada resposta imune humoral é frequentemente associada com a incapacidade de controlar a disseminação de *Leishmania* (BANETH et al., 2008). Os níveis de imunoglobulinas específicas para *Leishmania* detectados em cães sintomáticos são maiores do que os detectados em cães assintomáticos (REIS et al., 2006).

## 2.6 MEDULA ÓSSEA

O sangue juntamente com a medula óssea representa um dos maiores órgãos do organismo (LUND, 2000; TRAVLOS, 2006). Uma vez que os efeitos de uma determinada enfermidade podem refletir nas células circulantes no sangue ou na produção de células sanguíneas, são necessárias avaliações constantes de amostras individuais do sangue total e esfregaços sanguíneos, assim como também, aspirados de medula óssea e secções de tecido da medula óssea para compreender alterações dinâmicas na hematopoiese (WEISS, 1986; TRAVLOS, 2006).

As avaliações do sangue e medula óssea tornaram-se procedimentos de rotina na investigação de enfermidades que afetam os parâmetros hematológicos (PERKINS, 1999, citados por TRAVLOS, 2006).

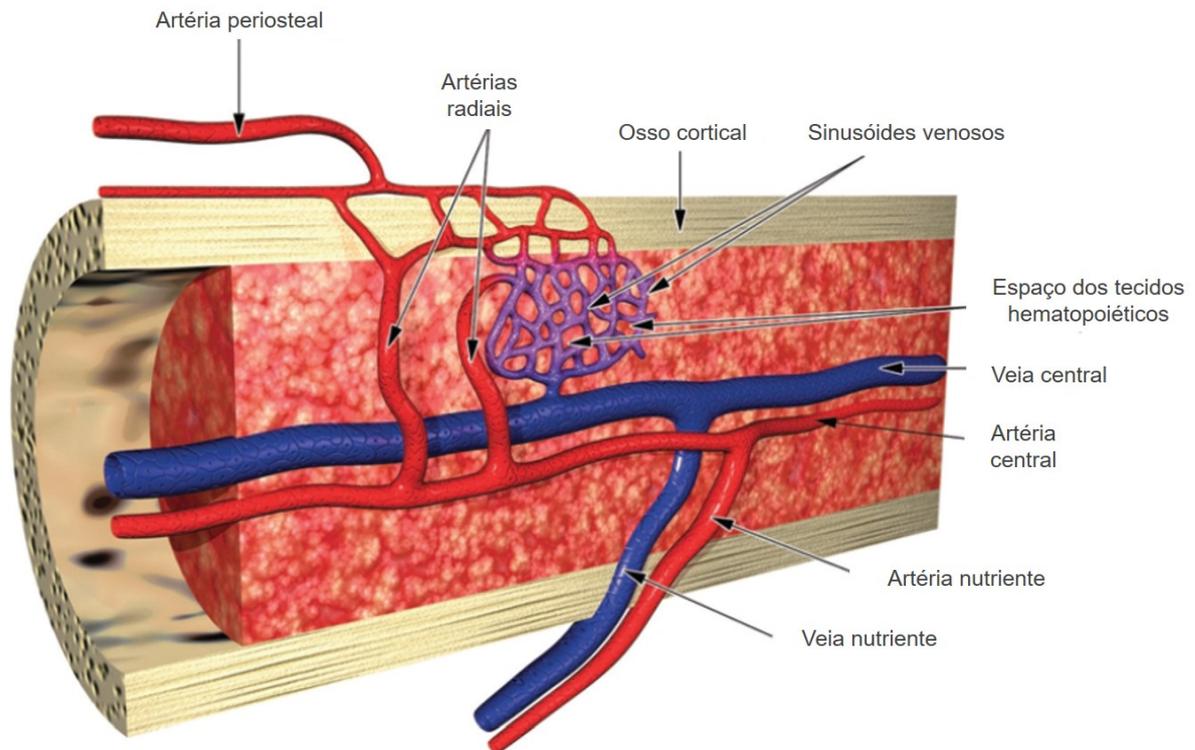
### 2.6.1 Estrutura, função e visão geral da medula óssea

A medula óssea é encontrada no interior das cavidades centrais axiais e de ossos longos. Consiste em ilhas hematopoiéticas e adipócitos rodeados por seios vasculares intercalados dentro de uma malha de osso trabecular (TRAVLOS, 2006). Representa aproximadamente 2% do peso corporal de cães (JAIN, 1986, citado por TRAVLOS, 2006) e 5% do peso dos seres humanos (PICKER; SIEGELMAN, 1999, citado por TRAVLOS, 2006).

Principal órgão hematopoiético, representa um tecido linfóide primário responsável pela produção de eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas (TRAVLOS, 2006). Em sua normalidade, as células hematopoiéticas ocupam entre 25 a 75% do espaço medular e seus vasos sanguíneos consistem em seios venosos e arteríolas de paredes finas (WEISS, 1986).

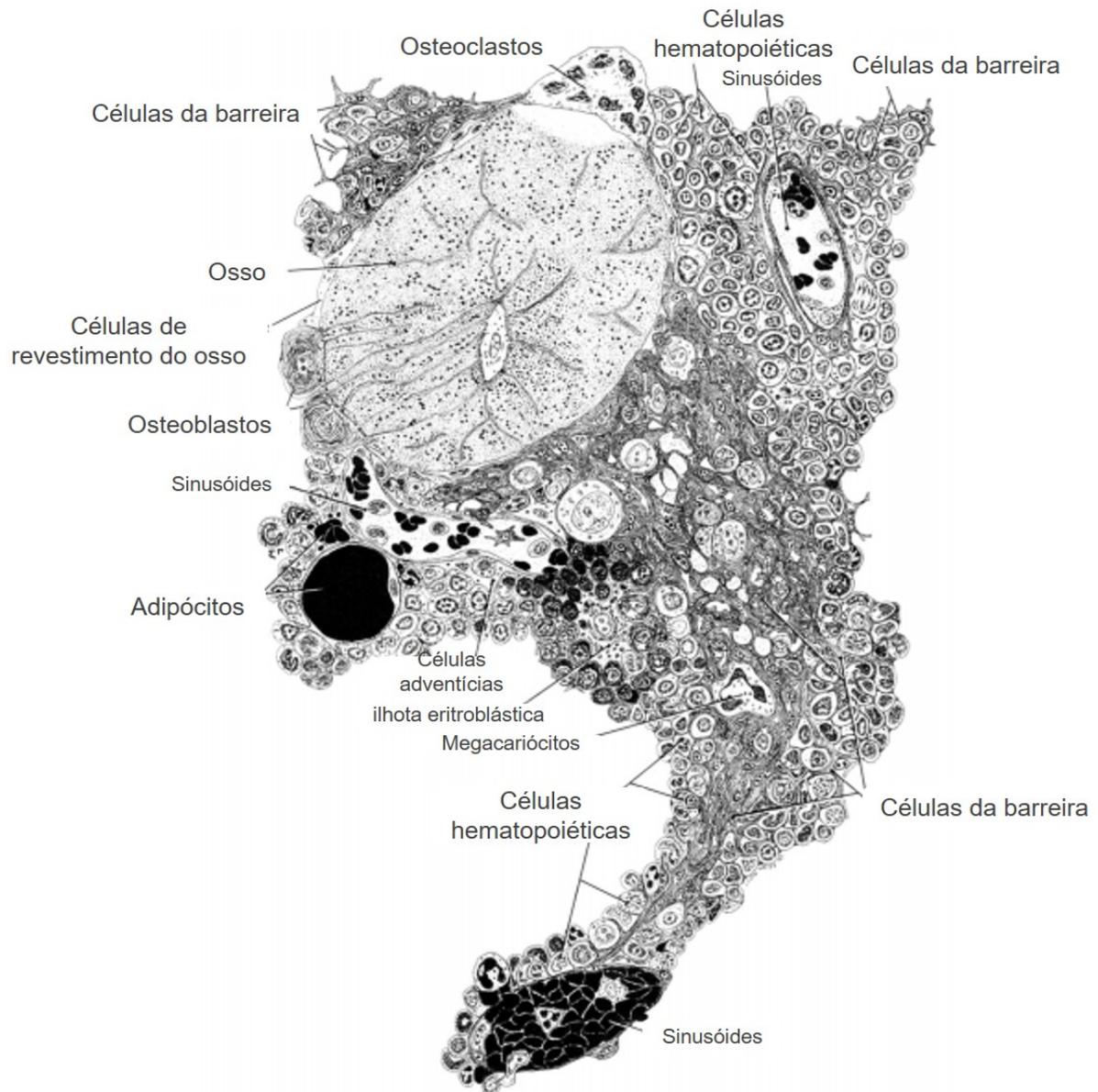
Nos ossos longos, um ou mais canais nutrientes (contendo uma artéria e uma ou duas veias nutrientes) passam através do osso cortical e entram na cavidade medular obliquamente (TRAVLOS, 2006). Em ossos chatos, o suprimento sanguíneo da medula é realizado por numerosos vasos sanguíneos de vários tamanhos que entram na medula através de grandes e pequenos canais nutrientes (TRAVLOS, 2006). Após sua entrada no ambiente medular, a artéria se divide em ramos ascendente e descendente que correm paralelas ao eixo longo da parte central da cavidade medular, enrolando-se em torno da veia central longitudinal no canal medular (TRAVLOS, 2006).

Estes ramos da artéria dão origem a múltiplas arteríolas pequenas com paredes finas e capilares que se estendem em direção ao osso cortical (TRAVLOS, 2006). Próximo ao osso, as arteríolas formam anastomose com um plexo de seios venosos. Estes seios venosos drenam para vênulas coletoras que levam de volta à veia longitudinal central que, em seguida, drena para as veias nutrientes (TRAVLOS, 2006). De posse destas informações, percebe-se que a medula óssea possui um extenso suprimento sanguíneo como pode ser visualizado no esquema da (Figura 07) (TRAVLOS, 2006).



**Figura 07:** Esquema do amplo suprimento sanguíneo encontrado na medula óssea (ABBOUD; LICHTMAN, 2001; TRAVLOS, 2006 – Traduzido e adaptado).

O tecido hematopoiético é composto por uma variedade de tipos celulares, incluindo, as células sanguíneas e os seus precursores, as células da barreira adventícia, adipócitos e macrófagos (WEISS; GEDULDIG, 1991). As células hematopoiéticas estão localizadas aleatoriamente no tecido medular, mas demonstram uma certa organização no interior do tecido, como pode ser visualizado no esquema da figura 08 (WEISS; GEDULDIG, 1991).



**Figura 08:** Esquema da orientação aleatória das diferentes linhagens de células presentes no microambiente medular (WEISS; GEDULDIG, 1991 – Traduzido e adaptado).

Para a homeostasia da hematopoiese, o microambiente medular deve ser capaz de reconhecer e reter as células estaminais hematopoiéticas, assim como também, fornecer os fatores (por exemplo, citocinas) necessários para suportar a proliferação, a diferenciação e a maturação das células tronco ao longo das linhagens celulares (TRAVLOS, 2006).

O microambiente hematopoiético consiste também em células adventícias reticulares (células de barreira), células endoteliais, células ósseas

de revestimento (por exemplo, osteoblastos) e os elementos da matriz extracelular (WEISS; GEDULDIG, 1991; TRAVLOS, 2006).

A hematopoiese é um processo compartimentado dentro do tecido hematopoiético onde a eritropoiese ocorre em unidades anatômicas distintas (ilhas eritroblásticas), a granulopoiese ocorre em locais menos determinados e a megacariopoiese normalmente ocorre adjacente ao endotélio do seio medular (TRAVLOS, 2006).

Após a diferenciação e maturação, as células hematopoiéticas, com o auxílio das células de barreira, atravessam a parede dos seios venosos para entrar na corrente sanguínea, com exceção das plaquetas que são liberadas diretamente para a corrente sanguínea a partir de processos citoplasmáticos dos megacariócitos que penetram através da parede da cavidade para dentro do lúmen do sinusóide medular (GASPER, 2000; ABOUD; LICHTMAN, 2001 citados por TRAVLOS, 2006).

A produção, a diferenciação e a maturação das células hematopoiéticas são reguladas por fatores humorais (Tabela 01) (TRAVLOS, 2006). Alguns fatores (por exemplo, interleucina 3 - IL-3) age sobre células mais primitivas e possuem uma ação mais generalizada no microambiente medular, enquanto outros (por exemplo, eritropoietina - EPO) age em progenitores celulares de uma linhagem celular específica (TRAVLOS, 2006).

**Tabela 01:** Exemplos de fatores que estimulam a hematopoiese (TRAVLOS, 2006 – Traduzido e adaptado)

#### **Estimulação de células pluripotentes**

Fator de células tronco (SCF)

Interleucina 6 (IL-6)

#### **Eritropoiese**

Eritropoietina (EPO)

Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)

Hormônio da tireoide

---

Hormônio do crescimento

---

Testosterona

---

**Granulocitopoiese**

GM-CSF

---

Granulocitopoietina (G-CSF)

---

Interleucina 1 (IL-1)

---

Interleucina 3 (IL-3)

---

Interleucina 5 (IL-5)

---

Eosinofilopoietina

---

Basofilopoietina

---

Interferon (IFN)

---

Fator de necrose tumoral (TNF)

---

**Monocitopoiese**

GM-CSF

---

Fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF)

---

Monocitopoietina

---

IL-3

---

**Linfoipoiese**

Hormônio tímico

---

Fator mitogênico de linfócitos

---

Fator de crescimento de linfócitos B

---

Fator de diferenciação de linfócitos B

---

Interleucina (IL-1)

---

Interleucina 2 (IL-2)

---

Interleucina 3 (IL-3)

---

Interleucina 4 (IL-4)

---

**Megacariocitopoiese**

---

M-CSF

---

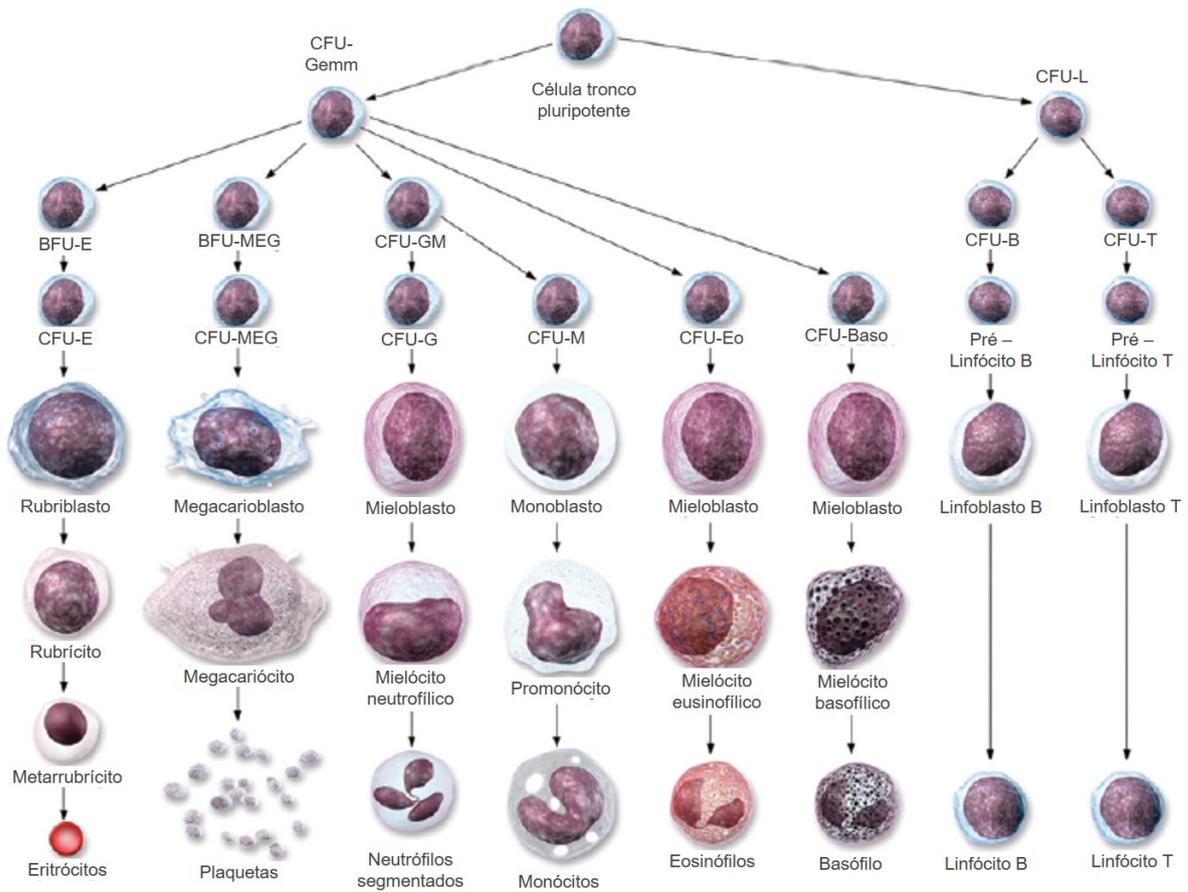
Trombopoietina

---

O volume de produção de fatores hematopoiéticos pode variar. A eritropoietina é produzida principalmente nos rins e pelo fígado em menor quantidade. Este fator estimula a proliferação de células progenitoras eritrocíticas, a liberação de eritrócitos imaturos, assim como também, elevam a taxa de diferenciação das células progenitoras eritróides quando estão em concentrações elevadas (WEISS; GEDULDIG, 1991; TRAVLOS, 2006).

Fatores estimuladores de colônias (CSF) são produzidos por uma variedade de células, incluindo macrófagos / monócitos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos. A maioria das interleucinas, fatores de crescimento e diferenciação dos linfócitos B são provenientes dos linfócitos T (TRAVLOS, 2006).

A hematopoiese é um processo contínuo e dividida em etapas envolvendo células não comprometidas (tronco pluripotentes) estaminais que possuem duas funções principais. Primeira, elas mantêm o seu número por um processo de auto-renovação, segundo, elas possuem a capacidade de dar origem a todas as células hematopoiéticas (eritrócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas) (Figura 09). (WEISS; GEDULDIG, 1991; PICKER; SIEGELMAN, 1999; TRAVLOS, 2006).



**Figura 09:** Representação da progressão da maturação das múltiplas linhagens celulares presentes na medula óssea. CFU = Unidade formadora de colônias; E = Eritróide; Meg = Megacariócitos; GEMM = Granulocítico, eritróide, monócitos-macrófagos e megacariocíticos; GM = Granulócitos / monócitos; G = Granulócitos; M = Monócitos; Eo = Eosinófilos; Baso = basófilos; L = Linfócito. Desenho por David Sabio. (TRAVLOS, 2006 – Traduzido e adaptado).

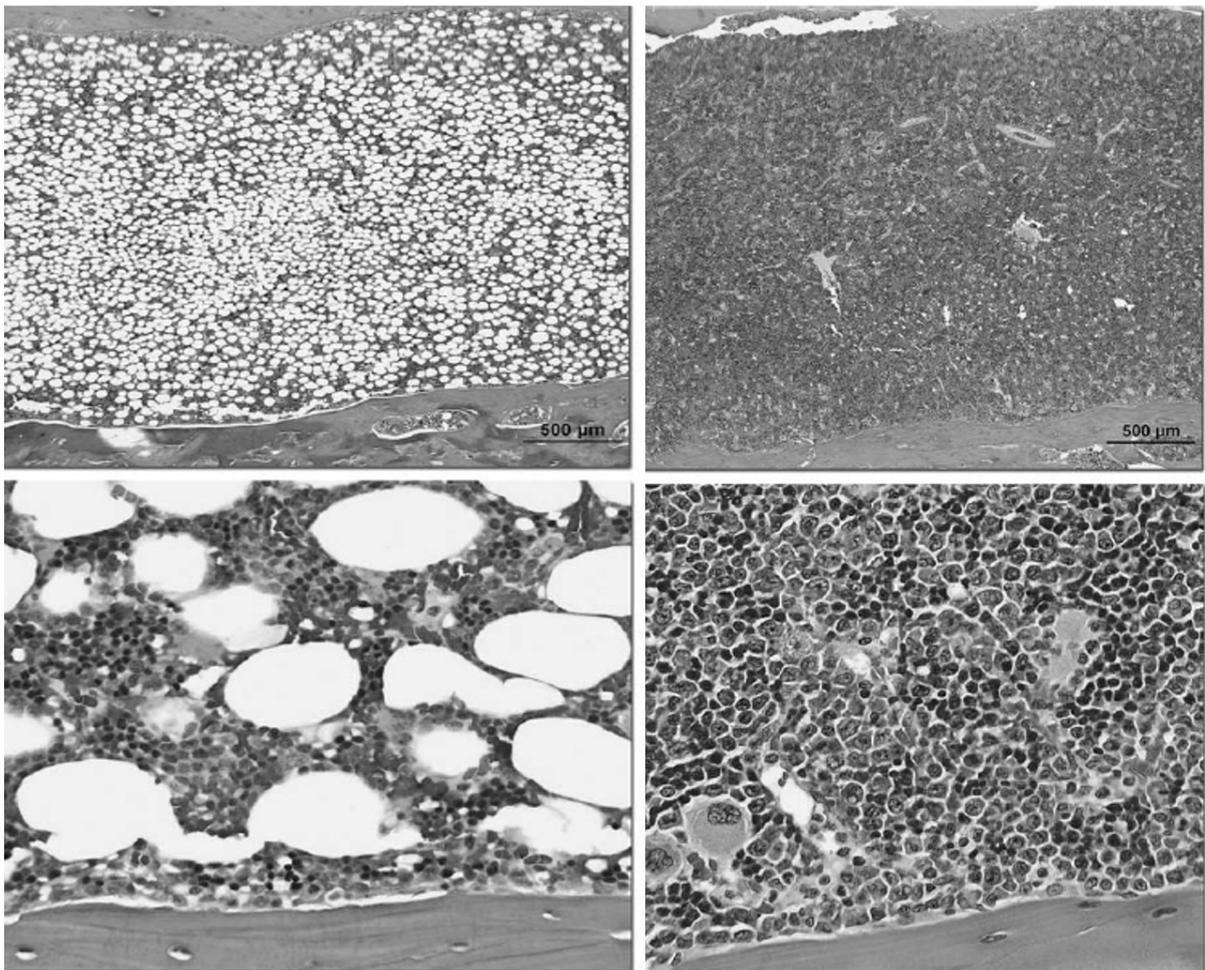
## 2.6.2 Patologia da medula óssea

As alterações da medula óssea podem ser divididas nas seguintes categorias: hipoplasia aplástica, hiperplasias, displasias, alterações estromais e inflamatórias (WEISS, 1986).

### 2.6.2.1 Distúrbios no crescimento (*hiperplasias*)

O aumento na quantidade de células em secções histológicas da medula óssea normalmente indica uma resposta ao aumento na demanda de células sanguíneas (WEISS, 1986). Esta alteração é denominada hiper celularidade

(também é referida como hiperplasia de células hematopoiéticas ou proliferação de células hematopoiéticas) e sua detecção é realizada ao calcular a porcentagem da quantidade de células hematopoiéticas na cavidade medular em relação à quantidade de adipócitos como pode ser visto na Figura 10 (WEISS, 1986; TRAVLOS, 2006). Em cães adultos, hiper celularidade medular deve ser considerada quando as células hematopoiéticas ocupam mais do que 75% da cavidade medular (WEISS, 1986).



**Figura 10:** Presença de adipócitos nas imagens do lado esquerdo. Exemplos de hiper celularidade nas imagens da direita (TRAVLOS, 2006 – Traduzido e adaptado).

A medula óssea pode tornar-se hiper celular quando um ou mais tipos de células exibem aumento da proliferação em resposta a necessidades do sangue periférico, tais como ocorre em resposta à anemia (hiperplasia eritróide) ou em inflamações (hiperplasia granulocítica) (HARVEY, 2001).

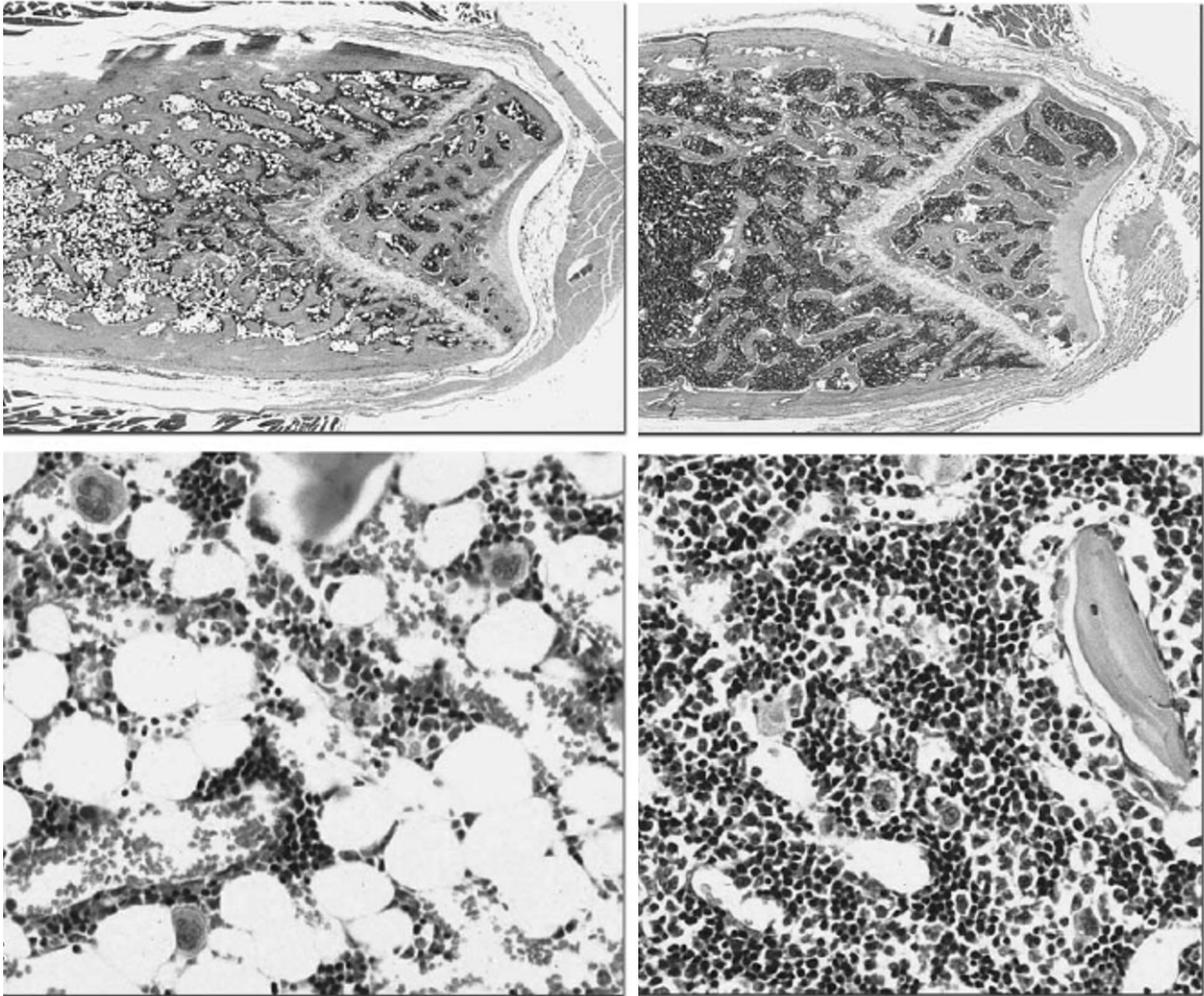
A hiperplasia pode envolver todas as linhas celulares, sendo conhecida como panhiperplasia, ou pode envolver linhagens celulares individuais (WEISS, 1986). Normalmente não ocorre alteração na morfologia das células, no entanto, com o aumento das taxas de produção podem ser observadas células atípicas (WEISS, 1986). Hiperplasia eritróide indica uma resposta a anemia associado ao aumento do volume globular (PETERSON; RANDOLPH, 1982).

A proporção celular mielóide/eritróide (M:E) é calculada por análise de 500 células e dividindo o número de células granulocíticas pelo número de células eritróides nucleadas (HARVEY, 2001). Dependendo da linhagem celular afetada, pode haver alteração na proporção mielóide/eritróide (M:E) (TRAVLOS, 2006b). Uma hiperplasia eritróide diminuiria a proporção M:E, por exemplo. Outros elementos celulares da medula óssea, tais como mastócitos e megacariócitos também podem sofrer hiperplasia (MACKENZIE; EUSTIS, 1990 citado por TRAVLOS, 2006b).

Hiperplasia granulocítica, aumento na quantidade de granulócitos no microambiente medular, frequentemente está associada à uma doença inflamatória (WEISS, 1986). Na inflamação aguda, neutrófilos segmentados podem ser esgotados devido ao aumento na liberação destas células pela medula, sendo assim, deve ocorrer compensação na reposição e diferenciação dessa linhagem celular no microambiente medular (WEISS, 1986). Histologicamente, pode-se observar na histopatologia da medula óssea um aumento na proporção M:E, no entanto, a sincronia da maturação celular não é afetada (WEISS, 1986; TRAVLOS, 2006b).

Na maioria das espécies, a hiperplasia eritróide (Figura 11) geralmente está associada a uma resposta medular em alguns tipos de anemia, como por exemplo, casos de hemorragias e anemias hemolíticas (TRAVLOS, 2006b). Há aumento na diferenciação de células da linhagem eritróide, normalmente este fato ocorre sem afetar a sincronização da maturação. Desta forma, ocorre uma diminuição na proporção M:E em função do aumento do número de células eritróides no microambiente medular (TRAVLOS, 2006b). A hiperplasia

eritróide também pode ser observada na policitemia primária e secundária em cães, por exemplo (TRAVLOS, 2006b).



**Figura 11:** Medula óssea femoral controle (imagens da esquerda) comparada a um aumento na eritropoiese em resposta à anemia em ratos (imagens da direita). (TRAVLOS, 2006b).

A avaliação da hiperplasia megacariocítica é subjetiva uma vez que existe um pequeno número destas células no microambiente medular. Esta alteração é geralmente associada com o alto consumo ou destruição de plaquetas. Além disso, podemos encontrar aumento de megacariócitos em muitas condições de anemia (WEISS, 1986). Enquanto a proporção M:E não se altera, uma maior percentagem de megacariócitos pode ser detectado nas contagens de células da medula óssea diferencial em casos de hiperplasia megacariocítica (TRAVLOS, 2006b).

O aumento nas células linfóides da medula óssea seria difícil identificar a partir de cortes histológicos corados em H&E, exceto em casos de linfoma (TRAVLOS, 2006b).

#### 2.6.2.2 *Distúrbios no crescimento (hipoplasias)*

Uma biópsia de medula óssea canina pode ser denominada hipocelular se apresentar uma ocupação de células hematopoiéticas menor que 25% do espaço medular (WEISS, 1986).

A diminuição na quantidade de células em secções de medula óssea foi identificada por vários termos, tais como, depleção de células hematopoiéticas, hipocelularidade, hipoplasia e atrofia. Pode envolver uma única linhagem celular ou todas as linhagens celulares, neste último caso a alteração é denominada pan-hipoplasia (TRAVLOS, 2006b).

Importante destacar que as amostras de medula óssea que aparecem como “normo” ou hiper celular, podem ser “hipoplásicas” com relação a uma determinada linhagem celular. Nestes casos, deve-se indicar a linhagem celular envolvida na alteração, hipoplasia eritróide, por exemplo (TRAVLOS, 2006b).

Uma variedade de doenças que não envolvem diretamente a medula óssea pode causar hipoplasia eritróide. Dentre elas, podem-se destacar as doenças inflamatórias crônicas, neoplasias, hipotireoidismo, hipoadrenocorticismo, doença renal crônica e doença hepática crônica (WEISS, 1986). Na anemia detectada em doenças inflamatórias, a medula óssea é geralmente normocelular e hipoplasia eritróide pode estar levemente presente ou ausente (FELDMAN; KANEKO, 1981).

A anemia na doença crônica, também chamada anemia da inflamação, é caracterizada pela hipoferremia por conta do sequestro de ferro que, eventualmente, resulta em eritropoiese com restrição de ferro (GANZ; NEMETH, 2009).

Normalmente a maior parte do ferro entregue ao plasma é fornecido por macrófagos envolvidos na reciclagem de eritrócitos senescentes, uma outra fração menor é proveniente da absorção de ferro no duodeno, com quantidades variáveis adicionais entregues a partir de ferro armazenado nos hepatócitos (GANZ; NEMETH, 2009).

Pesquisas indicam que inflamações ou infecções resultam em acumulação de ferro nos macrófagos ("sistema retículo-endotelial") (NOYES et al., 1960; GANZ; NEMETH, 2009). Este sequestro de ferro induzido pela inflamação explica a hipoferremia da inflamação, no entanto, as vias moleculares envolvidas nesses mecanismos ainda não estão muito bem esclarecidas (GANZ; NEMETH, 2009).

O tecido hematopoiético também é sensível a influências externas e pode tornar-se reprimido em resposta a restrição dietética, desnutrição, desordens proliferativas e neoplásicas (LUND, 2000; TRAVLOS, 2006).

#### 2.6.2.3 Alterações inflamatórias da medula óssea

Lesões inflamatórias agudas na cavidade medular canina consistem de exsudados fibrinosos que pode ou não pode conter células inflamatórias (RYWAIIN, 1978 citado por WEISS, 1986). A presença de exsudato predominantemente neutrofílico é denominado como mielite aguda, enquanto acumulação de fibrina por si só tem sido denominado como mielite fibrinosa (RYWAIIN, 1978 citado por WEISS, 1986).

Os monócitos e os seus precursores representam uma pequena parte (<3%) de células presentes na medula óssea. Aumento do número de precursores dos monócitos podem estar presentes em respostas a condições inflamatórias (HARVEY, 2001).

Os macrófagos, normalmente, não ultrapassam 1% das células nucleadas totais presentes na medula óssea de animais normais. Fagocitose de eritrócitos nucleados e/ou anucleados por macrófagos pode ocorrer em casos de anemias imunomediadas primárias ou secundárias (HOLLOWAY et

al., 1990), histiocitose maligna e síndrome hemofagocítica (WALTON et al., 1996).

Leucofagocitose é uma alteração rara, mas pode ser visto em casos de neutropenia imunomediada (BLOOM et al., 1988) e quando existe um aumento na quantidade de apoptose no microambiente medular, como ocorre nas desordens mieloproliferativas (RAZA et al., 1995).

Na medula óssea, os macrófagos podem fagocitar células danificadas ou mortas que não estejam revestidas com anticorpo ou partículas do sistema complemento (HARVEY, 2001).

O aumento na quantidade de macrófagos na medula óssea (histiocitose), pode ocorrer em condições inflamatórias e neoplásicas. Agentes infecciosos podem estar presentes nos casos de algumas doenças tais como leishmaniose, histoplasmose e erliquiose (HARVEY, 2001).

Emperipolese de células hematopoiéticas em desenvolvimento dentro de megacariócitos, principalmente da linhagem granulocítica, tem sido associado com a hiperplasia medular relacionadas com perda de sangue crônica ou inflamação (LEE, 1989; MEZZA, et al., 1991). Nestes casos, na microscopia, as células se apresentam com citoplasmas separados por um espaço pericelular estreito (LEE, 1989). Na microscopia eletrônica, as células presentes no interior dos megacariócitos são localizadas no sistema canalicular aberto. As membranas celulares de ambas células se apresentam intactas, sem fusão de membranas celulares ou formação de fagossoma nos megacariócitos (LEE, 1989).

Alterações reativas na medula óssea incluem hiperplasia de monócitos-macrófagos, linfócitos, proliferação de plasmócitos e eritrofagocitose. A presença de macrófagos ativados na medula óssea implica um aumento de morte celular dentro do ambiente medular (LEWIS; REBAR, 1979 citado por WEISS, 1986), assim como também, a presença de muitos macrófagos ativados (histiocitose) pode resultar em eritrofagocitose (LEWIS; REBAR, 1979 citado por WEISS, 1986) (Figura 15). Os linfócitos podem ser encontrados no microambiente medular de cães saudáveis, no entanto, estes podem apresentar

um aumento difuso de pequenos linfócitos e plasmócitos após uma estimulação imunológica crônica (WEISS, 1986).

Avaliação das secções da medula óssea canina fornece informações inalcançáveis por avaliação de esfregaços de sangue e aspirados de medula. As secções permitem uma avaliação da celularidade da medula e distúrbios estromais incluindo necrose, inflamação, alterações vasculares e mielofibrose (WEISS, 1986).

## 2.7 HEMATOLOGIA E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS

### 2.7.1 Anemia

A anemia é uma redução da quantidade de eritrócitos presentes no sangue (JACKSON, 2007), o que resulta em diminuição na capacidade do sangue em transportar  $O_2$  para os tecidos e conseqüentemente no surgimento de sinais clínicos (STOCKHAM et al., 2011). Na doença inflamatória grave, causa mais comum de anemia não regenerativa na medicina veterinária, a diminuição dos eritrócitos é causada pela combinação da redução na disponibilidade de ferro para eritropoiese, diminuição da vida dos glóbulos vermelhos, e diminuição da capacidade de resposta da linhagem eritróide à eritropoietina (EPO) (JACKSON, 2007). Estes efeitos são devido à elevação na quantidade de citocinas tais como IL-1, TNF, TGF- $\beta$ , e IFN- $\gamma$  no organismo (JACKSON, 2007).

### 2.7.2 Trombocitopenia

A Trombocitopenia é caracterizada pela diminuição da quantidade de plaquetas no sangue periférico em relação aos valores referenciais. Indica um processo patológico com potencialização dos sangramentos quando as concentrações de plaquetas estão acentuadamente reduzidas (STOCKHAM et al., 2011). Desta forma, os animais com tal alteração podem apresentar petéquias, equimoses, sangramento em mucosas, epistaxe, hematúria, hifema e hemorragia prolongada após traumatismo acidental ou intencional (p. ex., venopunção) (STOCKHAM et al., 2011).

### 2.7.3 Alterações dos leucócitos

#### 2.7.3.1 *Leucocitose*

A leucocitose pode ser fisiológica, reativa e proliferativa (autônoma). As alterações na quantidade total de leucócitos podem envolver anormalidades de produção, liberação, distribuição intravascular, vida média e transmigração destas células para os tecidos (LOPES et al., 2007). Uma demanda funcional imediata de neutrófilos é feita primeiro pela mobilização das células do *pool* marginal e circulante, seguida pela reserva da medula óssea e finalmente pelo aumento da granulopoiese e liberação acelerada das células provenientes da medula óssea. Assim, a quantidade de células nos compartimentos marginais, no sangue periférico, reserva e capacidade proliferativa da medula óssea, são fatores importantes na resposta dos leucócitos às doenças (LOPES et al., 2007).

#### 2.7.3.2 *Leucopenia*

A leucopenia, em muitos animais, ocorre por neutropenia e linfopenia. A leucopenia acontece frequentemente em casos de infecções virais e algumas vezes são seguidas por leucocitose devido à uma infecção bacteriana secundária. Como exemplo pode-se citar a linfopenia presente em casos de cinomose devido a atrofia e necrose do tecido linfóide, causada pelo vírus. Ambos os linfócitos T e B estão reduzidos e a imunidade humoral e celular estão suprimidas nos animais enfermos o que pode favorecer o surgimento de infecções secundárias (LOPES et al., 2007).

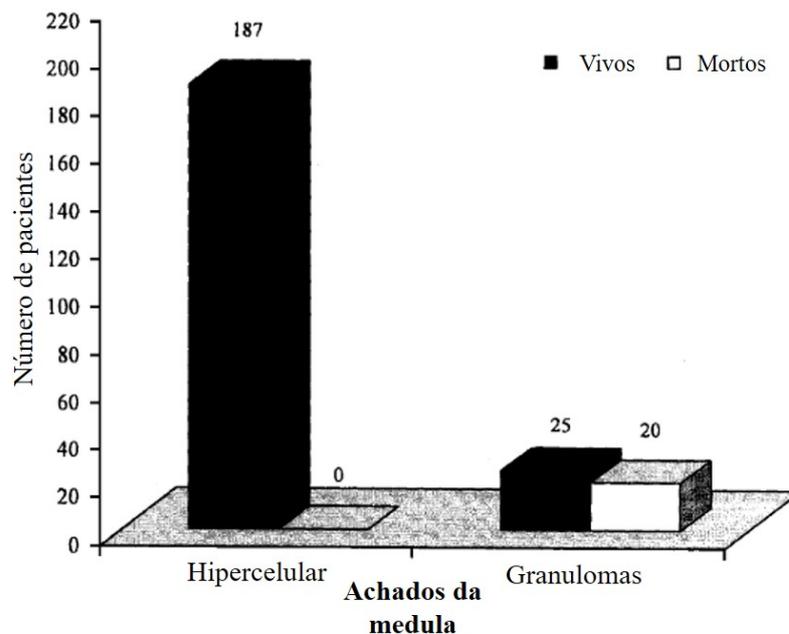
## 2.8 MEDULA ÓSSEA NA LEISHMANIOSE VISCERAL

Como visto nos tópicos anteriores, as células sanguíneas são oriundas de microambientes anatômicos especializados na medula óssea (FUCHS et al.,

2004; LI; XIE, 2005), onde recebem o suporte adequado para manter a auto-renovação e a capacidade de se diferenciarem (ARAI et al., 2004; FUCHS et al., 2004; LI; XIE, 2005). Nesta localização, as células pluripotentes estão protegidas de várias formas de agressões (ARAI et al., 2004).

A medula óssea é um órgão-alvo de estabilização e proliferação de *L. infantum* que se disseminam pelo organismo do hospedeiro através da via linfática ou sanguínea (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010).

Um estudo realizado por Kumar e colaboradores (2007), acompanharam pacientes humanos com LV para averiguar as alterações da medula óssea frente ao prognóstico apresentado por estes. Foi possível verificar que os pacientes com medula hipercelular e nódulos linfóides benignos permanecem vivos e respondem bem ao tratamento com glucantime. Por outro lado, aqueles que apresentaram granulomas na medula óssea não respondem bem ao tratamento com glucantime, porém, respondem ao tratamento com anfotericina B. Já aqueles que apresentaram fibrose e necrose da medula óssea morreram e eram resistentes a qualquer tipo de terapia (Figura 12).



**Figura 12:** Comparação do prognóstico com as alterações encontradas durante as análises na biópsia da medula óssea de pacientes com LV. (Fonte: KUMAR et al., 2007).

Por fim, concluíram que os resultados da biópsia de medula óssea podem ser bastante úteis para avaliar o prognóstico de pacientes com LV (KUMAR et al., 2007).

Hiper celularidade, plasmocitose (DHINGRA et al., 2010; CHANDRA et al., 2013), histiocitose, hiperplasia eritróide e hemofagocitose são alterações comuns encontradas na medula óssea de pacientes com LV (CHANDRA et al., 2013).

A presença de granulomas na medula óssea, mielofibrose, mielodisplasia e transformação gelatinosa da medula devem advertir a busca por amastigotas de *Leishmania* nestes pacientes (DHINGRA et al., 2010).

A verificação das alterações medulares é útil para o diagnóstico precoce da LV, especialmente em áreas não endêmicas onde a suspeita clínica para tal enfermidade é baixa (CHANDRA et al., 2013).

As principais alterações na medula óssea de seis pacientes com LV na Tailândia foram hemofagocitose ativa com o aumento na proliferação de células da linhagem linfóide e presença de amastigotas (WIWANITKIT, 2011). Em pacientes com LV associada à hemofagocitose, os esfregaços de medula óssea se mostram hiper celulares com hiperplasia eritróide (MOKHTARI; KUMAR, 2013). Alterações megaloblásticas e macrófagos ativados com vacúolos citoplasmáticos também são detectados (MOKHTARI; KUMAR, 2013). Estes mesmos autores sugerem que a leishmaniose visceral deve ser considerada como uma etiologia da síndrome hemofagocítica (HPS), particularmente em regiões endêmicas.

Três pacientes com LV, moderadamente anêmicos, apresentaram medulas ósseas hiper celulares com hiperplasia eritróide e eritroblastos com alterações diseritropoiéticas em uma análise realizada por Wickramasinghe e colaboradores (1987). Adicionalmente, foi possível identificar durante as análises da medula óssea desses pacientes algumas células anormais e eritroblastos fagocitados por histiócitos. Estes autores sugerem que a diseritropoiese e consequente eritropoiese ineficaz tem um papel fundamental na patogênese da anemia na LV (WICKRAMASINGHE et al., 1987).

### 2.8.1. Medula óssea na LVC

A histopatologia da medula óssea de cães infectados por *L. infantum* ainda não foi muito bem explorada no meio científico, no entanto, exames citológicos identificaram que a presença do parasita no microambiente medular interfere no processo de diferenciação celular (MANZILLO et al, 2006; DE ABREU et al, 2011; NICOLATO et al, 2013).

As alterações citológicas presentes nas amostras de medula óssea de cães com LV podem atingir a linhagem eritrocitária, leucocitária (MANZILLO et al., 2006) e trombocitária, contribuindo assim com o surgimento de distúrbios hemostáticos que podem ocorrer devido a disfunção plaquetária (CIARAMELLA et al., 2005).

A infecção por *L. infantum* causa supressão eritróide, linfocitose, plasmocitose e surgimento de mitoses atípicas na medula óssea de cães naturalmente infectados (DE TOMMASI et al., 2014).

A progressão da LV tem sido relacionada com uma inflamação granulomatosa na medula óssea acompanhado por um aumento da quantidade relativa de linfócitos e plasmócitos, assim como também a presença de hipoplasia eritróide e megacariocítica (MAIA; CAMPINO, 2008).

As características patológicas mais comuns da medula óssea de cães com LV são as displasias megacariocíticas, hematofagocitoses, displasias eritróides e emperipoleses (MANZILLO et al., 2006).

Em uma outra pesquisa sobre as alterações medulares na LVC, as lesões mais importantes foram a presença de granulomas, displasia megacariocítica e aplasia medular (MOMO et al., 2014). Estes mesmos autores sugeriram que a displasia da medula óssea pode surgir devido a presença de muitos macrófagos ativados e parasitados neste órgão (MOMO et al., 2014).

Suspeita-se de que as displasias megacariocíticas e eritróides provavelmente estão relacionadas com o aumento do número de histiócitos produzindo altos níveis de TNF e IFN- $\gamma$  (MANZILLO et al., 2006).

Em um estudo utilizando Golden Hamsters para investigar os efeitos da infecção por *L. donovani* na eritropoiese, foi possível verificar que a infecção causa alteração na quantidade de células progenitoras e na expressão de genes eritróides produzidos na medula óssea dos hamsters (LAFUSE et al., 2013). Os mesmos autores sugerem que a infecção tem um efeito negativo sobre a diferenciação dos eritroblastos (LAFUSE et al., 2013).

Os níveis de IFN- $\gamma$  na medula óssea dos hamsters esteve muito aumentado na infecção por *L. donovani* (LAFUSE et al., 2013). A expressão do ligante indutor de apoptose relacionados com TNF (TRAIL) também estava elevada (LAFUSE et al., 2013). Estes autores sugerem que a infecção por *L. donovani* inibe a eritropoiese na medula óssea por apoptose de eritroblastos mediada por citocinas (LAFUSE et al., 2013).

Alguns estudos relatam o aumento na expressão de citocinas como TNF e IFN- $\gamma$  na medula óssea de cães naturalmente infectados com e sem sinais clínicos e correlação positiva entre a gravidade da doença com a expressão de IL-4 (QUINNELL et al., 2001).

Neste trabalho serão apresentadas avaliações hematológicas e da medula ossea de cães com leishmaniose visceral ativa com cultura esplênica positiva e com forma grave da doença confirmada pela desorganização do tecido linfóide do baço. Para isso, foram avaliados os hemogramas, os achados histopatológicos, parasitismo, e a expressão gênica de citocinas envolvidas na resposta imune e hematopoese, na medula ossea de cães naturalmente infectados e residentes em uma área endêmica para leishmaniose visceral.

### **3 JUSTIFICATIVA**

---

Pacientes (seres humanos e cães) com LV apresentam uma variedade de sinais clínicos hematológicos. A patogênese dessas alterações ainda não está muito bem elucidada. O estudo histológico das alterações medulares que ocorrem em cães com LV pode contribuir na compreensão dos mecanismos envolvidos no surgimento e progressão dos distúrbios hematológicos.

As análises do baço de cães com LVC como, positividade na cultura esplênica e desorganização do tecido linfóide esplênico, servem como marcadores de progressão da doença, desta forma, pode-se averiguar as alterações hematológicas e medulares em destaque na LV grave.

As expressões das citocinas analisadas neste estudo são comumente alteradas durante a infecção por *L. infantum*, assim como também, possuem importante papel na sinalização e diferenciação de células hematopoiéticas em desenvolvimento na medula óssea. Com a presença de *L. infantum* no ambiente medular, se faz importante verificar as possíveis interferências causadas pelas mudanças nas expressões destas citocinas durante a diferenciação celular e na liberação das células hematopoiéticas para circulação periférica.

#### **4 HIPÓTESE**

---

A resposta imunológica direcionada à presença de *Leishmania infantum* no microambiente medular influencia na homeostase da medula óssea interferindo a hematopoiese, o que contribui no surgimento dos distúrbios hematológicos presentes na leishmaniose visceral canina.

## 5 OBJETIVOS

---

### 5.1 OBJETIVO GERAL

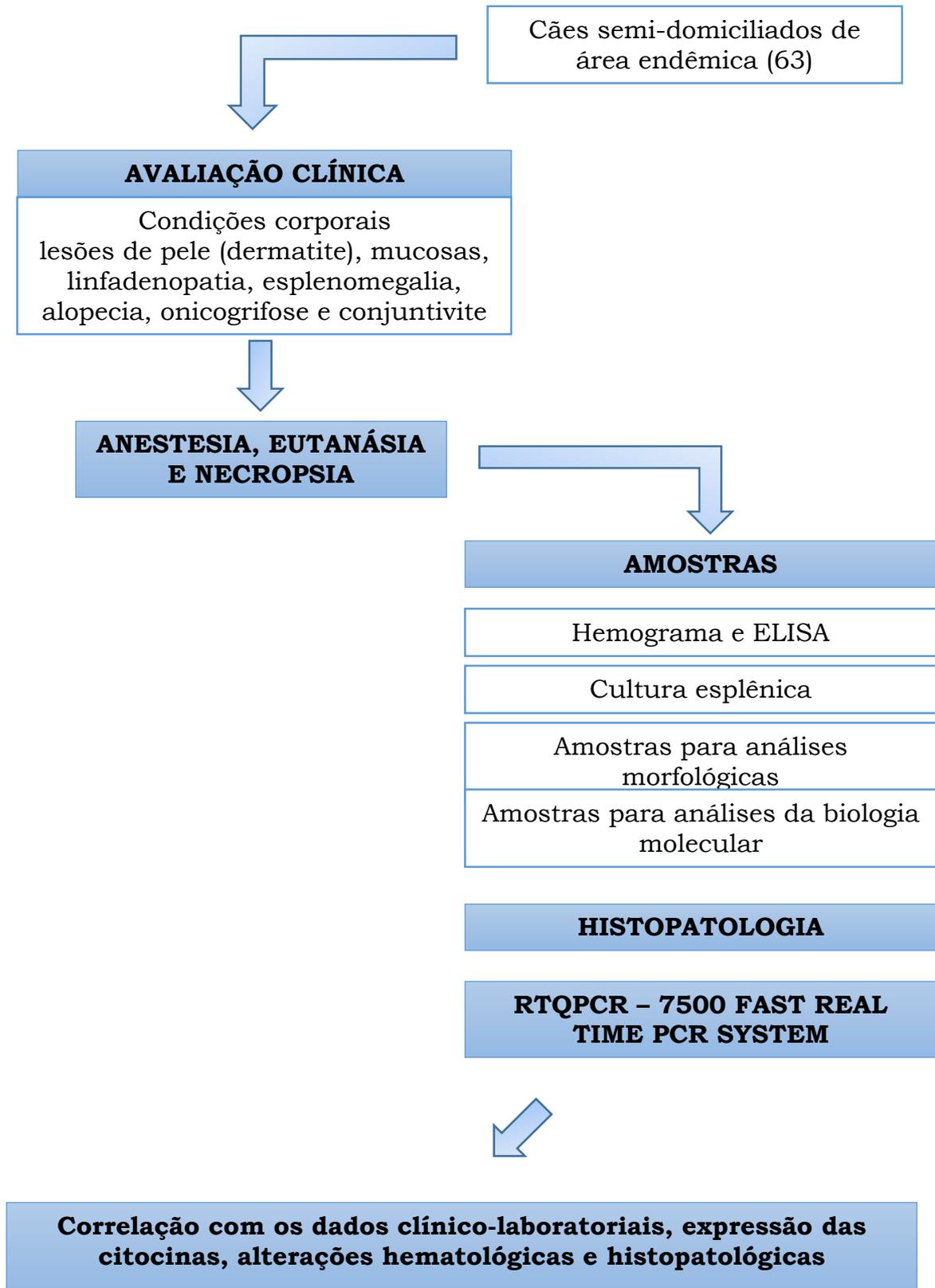
Identificar alterações na medula óssea de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* que se associam aos distúrbios hematológicos e gravidade da doença.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (I) Avaliar a distribuição dos microambientes de diferenciação e *homing* celular na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum*;
- (II) Avaliar os perfis de expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF, relacionadas à hematopoiese e diferenciação celular na medula óssea de cães com leishmaniose visceral naturalmente adquirida;
- (III) Correlacionar as alterações observadas na medula óssea dos cães infectados com evidências clínico-laboratoriais de leishmaniose visceral e com os potenciais mecanismos de progressão e gravidade da doença.

## 6 DESENHO EXPERIMENTAL

---



## **7 MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 7.1 DECLARAÇÃO DE ÉTICA

Os procedimentos realizados durante todos os experimentos envolvendo os animais foram conduzidos de acordo com a Lei Federal Brasileira de Experimentação Animal (Lei 11.794 [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato20072010/2008/lei/111794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20072010/2008/lei/111794.htm)), com as diretrizes da Fundação Oswaldo Cruz para pesquisa com animais (<http://sistemas.cpqam.fiocruz.br/ceua/hiceuaw000.aspx>) e com o manual para a vigilância e controle da leishmaniose visceral. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética para a utilização de animais em pesquisa (CPqGM-FIOCRUZ. Ceua, licença N.040/2005).

### 7.2 ANIMAIS

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de 63 cães semi-domiciliados com diferentes raças e idades que foram recolhidos na cidade de Jequié (Bahia, Brasil, zona endêmica de leishmaniose visceral) em colaboração com o Programa de Vigilância das Doenças Endêmicas do Serviço de Saúde do Estado, como parte de um programa de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Os cães resgatados foram mantidos em canil por um período entre 5 e 15 dias, com livre acesso a água e ração.

### 7.3 EXAME CLÍNICO

Após a identificação, os cães foram examinados clinicamente por pelo menos dois Médicos Veterinários, considerando a presença de lesões de pele (dermatite), condições corporais, mucosas, linfadenopatia, esplenomegalia, alopecia, onicogribose e conjuntivite, onde, em seguida, foram coletadas amostras de sangue (em torno de 3,5mL) por venopunção da veia cefálica para realização dos exames laboratoriais. Os animais foram classificados como assintomáticos quando não apresentavam nenhum sinal clínico, oligossintomático quando apresentavam pelo menos dois sinais clínicos e

polissintomático quando apresentavam três ou mais sinais clínicos de leishmaniose visceral.

#### 7.4 ELISA

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro foi determinada por ELISA como descrito anteriormente (BALEEIRO et al., 2006; DOS SANTOS et al., 2008).

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com antígeno bruto obtido a partir de *L. infantum* na concentração de 3.125 µg/µL diluído em tampão carbonato (0,06 M, pH 9,6) em 100 µL adicionados nas placas de 96 poços. As reações inespecíficas foram bloqueadas com PBS-0,05% Tween 20 (PBST) e 4mg/mL de albumina bovina sérica (BSA) por 1h a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBST, foram acrescentados 100 µL das amostras de soros caninos diluídos de 1:800 em PBST contendo BSA (4mg/mL) e incubadas por 1 h a 37°C.

Após três lavagens com PBST, foram incubadas com solução de anticorpo conjugado [Peroxidase AffiniPure Rabbit Anti-Dog IgG (H+L), Jackson Immunoresearch] na diluição de 1:10.000 por 1 hora a 37°C. A reação foi revelada no escuro com 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB - Sigma Aldrich) na presença do substrato peróxido de hidrogênio a 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Por fim, a reação foi parada com a adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em 4M. A densidade óptica foi lida no comprimento de onda de 450nm no espectrofotômetro (SpectraMax 340PC, Molecular Devices).

O ponto de corte foi calculado para cada placa utilizando a média dos valores de absorbância + 2 desvios padrão dos resultados utilizando soros de cães oriundos de regiões endêmicas e não endêmicas.

#### 7.5 ANESTESIA, EUTANÁSIA E COLETA DE MATERIAIS

Os cães soropositivos e aqueles não exigidos pelos proprietários foram sacrificados e submetidos a necropsia. Os animais foram sedados com

acepromazina (0,1 mg/kg IV, Acepram 1%, Vetnil, Brasil) e tiopental sódico (15 mg/kg IV, Thiopentax 1g, Cristália, Brasil) e sacrificados utilizando uma solução hipersaturada de cloreto de potássio (2 mL/kg, IV).

Imediatamente após a eutanásia, aspirados de baço e medula óssea foram coletados, diluídos em criotubos contendo Trizol e acondicionados em nitrogênio líquido para posteriormente serem utilizados nas análises de biologia molecular. Uma outra porção do aspirado esplênico foi reservada para realização da cultura esplênica. Em seguida, fragmentos ósseos (costela ou esterno) e de baço foram coletados e fixados em formalina para as análises histológicas.

Em um trabalho publicado pelo nosso grupo, observou-se que os cães com leishmaniose visceral associada a desorganização do baço apresentam um quadro mais grave da doença (LIMA et al., 2014). Desta forma, os fragmentos esplênicos foram coletados para o acompanhamento da progressão da doença nos animais.

## 7.6 CULTURA ESPLÊNICA

As amostras para cultura esplênica foram coletadas por punção do baço utilizando uma seringa estéril de 20mL com uma agulha 18G x 38mm.

Os aspirados esplênicos foram cultivados em um meio bifásico ágar-sangue-Schneider, suplementado com 10% de soro fetal de bovino (PARANHOS-SILVA et al., 2003).

Os cultivos foram examinados semanalmente para identificação de promastigotas. As culturas foram acompanhadas durante um período de 2 meses, se elas permanecessem negativas.

Como a cultura esplênica é o teste mais confiável para determinação da infecção ativa por *Leishmania infantum*, foram comparados os parâmetros hematológicos entre os animais com cultura esplênica positiva frente aos com cultura esplênica negativa.

## 7.7 GRUPOS DE COMPARAÇÕES

Os cães do estudo foram comparados com relação à detecção da presença de *L. infantum* detectada por PCR, pela presença de parasitismo esplênico detectada pela cultura esplênica e também foram comparados pelo grau de organização esplênica para conhecermos o ponto de gravidade da doença além dos sinais clínicos apresentados pelos mesmos.

## 7.8 HEMATOLOGIA

As amostras de sangue foram imediatamente condicionadas em tubos EDTA-2Na (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) e tubos de coleta de sangue (BD Vacutainer ®; Becton, Dickinson and Co.), onde procedeu-se com as análises no mesmo dia em que foram coletadas. As contagens celulares foram realizadas com o auxílio de um contador de células automatizado (Pentra contador 80, ABX Diagnostics, Montpellier, France).

O soro obtido após a centrifugação das amostras de sangue foi mantido em tubos de coleta e acondicionados à -20°C.

## 7.9 ANÁLISES HISTOLÓGICAS DO BAÇO E MEDULA ÓSSEA

Os fragmentos de osso foram descalcificados em ácido nítrico a 7%. As amostras foram embebidas em parafina, e, posteriormente foram cortadas em uma espessura de quatro a cinco micrômetros, aproximadamente, e corados com hematoxilina-eosina para serem examinadas por microscopia óptica convencional.

Os cortes de baço foram fixados em formalina ácida, inclusos em parafina e cortados na espessura de 4µ, posteriormente, foram processados e corados com hematoxilina-eosina (H-E) para também serem analisados sob microscopia óptica convencional.

### 7.9.1 Análises da medula óssea

Sob orientação de uma hematopatologista (Dra. Iguaracyra Araujo, FMB-UFBA), foram analisadas a organização estrutural, densidade celular, proporção dos nichos de diferenciação celular e distribuição relativa das linhagens celulares da medula óssea (Ex: eritróide, mielóide, trombocitária). Todas as amostras foram analisadas sem conhecimento prévio dos resultados das outras análises.

A densidade celular da medula óssea foi determinada após leitura de toda a lâmina, avaliando qualitativamente a porcentagem da quantidade de células hematopoiéticas na cavidade medular em relação à quantidade de adipócitos (WEISS, 1986; TRAVLOS, 2006).

Hiper celularidade celular foi considerada quando, após análise da lâmina, mais do que 75% da cavidade medular estava ocupado por células hematopoiéticas, destacando sempre a linhagem prevalecente (WEISS, 1986).

Hipoplasia da medula óssea hipoplásica foi considerada quando a ocupação de células hematopoiéticas foi inferior a 25% do espaço medular ou quando determinada linhagem esteve em uma proporção inferior às demais linhagens (WEISS, 1986).

A proporção dos nichos de diferenciação celular e distribuição das linhagens celulares eritróide e mielóide foi verificada ao analisar qualitativamente alterações na proporção mielóide/eritróide (M:E) (HARVEY, 2001; TRAVLOS, 2006b). Normalmente, a relação normal é de 2 células mielóide para uma célula eritróide, desta forma, estas linhagens eram analisadas ao verificar a manutenção desta proporção e suas devidas alterações.

A histiocitose foi classificada quando os macrófagos representavam ao menos 5% da celularidade das amostras analisadas (HOLLOWAY et al., 1990).

A avaliação dos megacariócitos foi realizada ao verificar de maneira padronizada (contagem por campo) e pelas porcentagens presentes nas amostras de medula óssea (TRAVLOS, 2006b).

### 7.9.2 Análises histológicas do baço

Os tecidos esplênicos foram classificados em 3 tipos (1, 2 e 3), conforme a organização estrutural da polpa branca, utilizando critérios descritos anteriormente (SANTANA, et al. 2008), sendo examinadas por dois patologistas para conferência dos achados histopatológicos.

Em resumo, o baço tipo 1 foi considerado quando o tecido esplênico esteve bem organizado, com presença bem definida da bainha peri-arteriolar de linfócitos, centro germinativo, zona do manto e zona marginal. O baço tipo 2 foi considerado quando a estrutura esplênica esteve levemente desorganizada, com alterações hiperplásicas ou hipoplásicas que levava perda de definição dos limites entre as regiões da polpa branca. E, por fim, o baço tipo 3 foi considerado quando o tecido esplênico se apresentava desorganizado, onde a polpa branca era evidente, mas havia impossibilidade de distinção entre suas regiões ou quando a estrutura folicular esteve mal definida com relação à polpa vermelha e áreas de células T.

## 7.10 BIOLOGIA MOLECULAR DA MEDULA ÓSSEA

A detecção da infecção por *Leishmania* na medula óssea dos cães foi realizada por PCR convencional. A estimativa da expressão gênica das citocinas do microambiente medular foi realizada por RTqPCR. A carga parasitária presente na medula óssea foi verificada por qPCR em tempo real.

### 7.10.1 Extração do material genético

A extração do RNA foi realizada utilizando o *SV-Total RNA Isolation System* (Promega Corporation, EUA), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Todos os materiais utilizados durante os procedimentos de biologia molecular estavam livres de endonucleases para evitar degradação do material genético. O RNA extraído foi mantido à -80°C até o momento de sua utilização.

A obtenção do DNA foi realizada a partir de 100µl do aspirado de medula óssea armazenada em Trizol® e foi procedida através da técnica com fenol-

clorofórmio (MAIZELS et al., 1991). O DNA obtido foi ressuspenso em água destilada estéril e mensurado por leitura espectrofotométrica a 260 nm (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, EUA).

#### 7.10.2 Detecção de *Leishmania infantum* por Nested-PCR

A detecção do parasita foi realizada por PCR específica para o gênero *Leishmania*, técnica que apresenta grande sensibilidade e alta especificidade. O alvo para a amplificação foi a região variável do gene que codifica o RNA de uma subunidade do ribossomo. Os *primers* utilizados na reação foram projetados por Van Eys et al. (1992) e sintetizados por Sigma (Sigma-Genosis, Reino Unido).

As reações foram realizadas com reagentes Biotools (Biotools B&M Laboratories, Espanha) e o termociclador *GenAmp PCR Sistem 2700* (PE Applied Biosystems, EUA). Os *primers* utilizados na primeira reação foram o R221, específico para protozoários cinetoplastídeos, e o R332 específico para o gênero *Leishmania* e *Crithidia*. Para a segunda reação, foram usados os *primers* R223 e R333, ambos específicos para *Leishmania*. Os produtos obtidos na amplificação possuíam 603 pares de bases (pb) e 353 pb, respectivamente. Os reagentes e as programações utilizadas no Nested-PCR se encontram na tabela 02 e 03.

**Tabela 02:** Reagentes para as reações de Nested-PCR

|                                      | <b>COMPOSIÇÃO</b>  | <b>1ª PCR</b> | <b>2ª PCR</b>     |
|--------------------------------------|--|---------------|-------------------|
| Tampão de reação 10x                 | 75 mM Tris HCl pH 9.0, 50 mM KCl,<br>20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 5µl           | 2.5µl             |
| MgCl <sub>2</sub> 50mM<br>dNTPs 10mM | -<br>dATP, dTTP, dGTP, dCTP  | 2mM<br>200µM  | 2mM<br>200µM      |
| Primer R221                          | 5´ GGTTTCCTTTTCCTGATTTACG 3´   | 15 pmol       | -                 |
| Primer R332                          | 5´ GGCCGGTAAAGGCCGAATAG 3´   | 15 pmol       | -                 |
| Primer R223                          | 5´ TCCCATCGCAACCTCGGTT 3´  | -             | 7.5 pmol          |
| Primer R333                          | 5´ AAAGCGGGCGCGGTGCTG 3´   | -             | 3.75 pmol         |
| <i>Tth</i> DNA Polimerase 1U/ml      |  | 1.4U          | 0.7U              |
| DNA                                  |  | 10µl          |                   |
| Água destilada estéril               |  | Até 50µl      | 10 µl<br>Até 25µl |

**Tabela 03:** Programações para as reações de Nested-PCR

|        | <b>Hot start</b>      | <b>Nº de ciclos: 30</b><br>Desnaturalização / Alinhamento / Extensão | <b>Extensão final</b> |
|--------|-----------------------|--|-----------------------|
| 1ª PCR | 80°C 2min / 94°C 5min | 94°C 30s / 60°C 30s / 72°C 30s                                       | 72°C 5min             |
| 2ª PCR | 80°C 2min / 94°C 5min | 94°C 30s / 65°C 30s / 72°C 30s                                       | 72°C 5min             |

Após o término da primeira reação de amplificação, 25µl do produto obtido foram diluídos em 1mL de água destilada estéril e, posteriormente, 10µl foram retiradas dessa diluição para proceder com a segunda reação de PCR. Os produtos de amplificação de ambas as reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-acetato 0,04mM, EDTA 1µM, pH 8,0), corado com BrEt (Bioluminescence resonance energy transfer) (1µl de uma solução a 10 mg/mL por 100mL de gel) e transiluminação com luz ultravioleta (Gel Doc 2000, Bio-Rad, EUA).

### 7.10.3 Quantificação do DNA de *Leishmania sp* por qPCR

A carga parasitária presente na medula óssea foi determinada por PCR quantitativo (qPCR). Para isso, foi utilizado o termociclador de alta performance *LightCycler* (Roche Diagnostics, Espanha) e o kit *LightCycler*

*FastStart DNA Master SYBR Green I* (Roche Diagnostics, Espanha). Os *primers* específicos para o gênero *Leishmania* utilizados para as reações da qPCR foram os R223 e R333 (Tabela 02) (VAN EYS et al. 1992; CRUZ et al., 2006; CRUZ et al., 2013).

#### 7.10.4 Quantificação da expressão gênica das citocinas na medula óssea

A metodologia para realização da estimativa das citocinas expressas na medula óssea dos cães deste estudo se encontram a seguir.

##### 7.10.4.1 *Extração do RNA*

A extração do RNA foi realizada com um kit comercial SV-Total RNA Isolation System (Promega Corporation, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de medula óssea, previamente armazenadas em Trizol, foram mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para utilização das mesmas, as amostras foram acondicionadas em gelo até iniciar os procedimentos das extrações. Após serem descongeladas as amostras foram centrifugadas (13000g, 10 minutos,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e os sobrenadantes foram transferidos para um novo tubo onde foi acrescentado 200 $\mu\text{L}$  de etanol 95%. Após lavagem utilizando um kit comercial, os sobrenadantes foram incubados com a enzima DNase para eliminação do DNA genômico presente na amostra.

O RNA foi ressuspendido em água ultrapura, quantificado em espectrofotômetro (ND-1000 UV-V Spectrophotometer, NanoDrop Technology, USA), até que atingisse uma concentração de 5ng/mL para serem armazenados à  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

##### 7.10.4.2 *Expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ e TNF por RTqPCR*

A expressão gênica das citocinas foi determinada com condições, sondas e *primers* previamente publicados (FUJIWARA et al., 2003) (Tabela 04). As

reações de transcrição reversa (RT) e PCR foram realizadas no mesmo tubo, com reagentes TaqMan PCR Reagent Kit principal (PE Applied Biosystems, EUA) e utilizando o modelo 7500 Fast Real time System (PE Applied Biosystems, EUA).

**Tabela 04:** *Primers* e sondas para as análises de expressão gênica da medula óssea canina por RTqPCR

| <b>Gene</b> | <b>Primer/sonda</b> | <b>Sequência (5' - 3')</b>          | <b>Gene bank</b> | <b>Pb</b> |
|-------------|---------------------|-------------------------------------|------------------|-----------|
| β-actina    | Direto              | GACCCTGAAGTACCCATTGAG               | Z70044           | 81        |
|             | Reverso             | TTGTAGAAGGTGTGGTGCCAGAT             |                  |           |
|             | Sonda               | CGTCACCAACTGGGACGACATGGA            |                  |           |
| IL-1β       | Direto              | TCTCCCACCAGCTCTGTAACAA              | Z70047           | 80        |
|             | Reverso             | GCAGGGCTTCTTCAGCTTCTC               |                  |           |
|             | Sonda               | CTGAGGCATTTCGTGTCAGTCATTGTAGC<br>TT |                  |           |
| IL-4        | Direto              | CATCCTCACAGCGAGAAACG                | AF05483<br>3     | 83        |
|             | Reverso             | CCTTATCGCTTGTGTTCTTTGGA             |                  |           |
|             | Sonda               | CATGGAGCTGACTGTCAAGGACGTCTTC<br>A   |                  |           |
| IL-10       | Direto              | CGCTGTCACCGATTTCTTCC                | U33843           | 78        |
|             | Reverso             | CTGGAGCTTACTAAATGCGCTCT             |                  |           |
|             | Sonda               | TGAGAATAAGAGCAAGGCGGTGGAGC          |                  |           |
| IFN-γ       | Direto              | GCGCAAGGCGATAAATGAAC                | AF12624<br>7     | 82        |
|             | Reverso             | CTGACTCCTTTTCCGCTTCTC               |                  |           |
|             | Sonda               | TGATGAATGATCTCTCACCAAGATCCAAC<br>C  |                  |           |
| TNF-α       | Direto              | GAGCCGACGTGCCAATG                   | Z70046           | 79        |
|             | Reverso             | CAACCCATCTGACGGCACTA                |                  |           |
|             | Sonda               | CGTGGAGCTGACAGACAACCAGCTG           |                  |           |
| TGF-β       | Direto              | CAGAATGGCTGTCCTTTGATGTC             | L34956           | 79        |
|             | Reverso             | AGGCGAAAGCCCTCGACTT                 |                  |           |
|             | Sonda               | CTGGAGTCGTGAGGCAGTGGCTGAG           |                  |           |

Os *primers* foram sintetizados pela Sigma (Sigma-Genosis, Reino Unido) e as sondas pela Applied Biosystems.

Os componentes para a realização das reações de RTqPCR estão especificadas na Tabela 05.

**Tabela 05:** Componentes para a realização dos procedimentos da RTqPCR.

| <b>Componentes</b>     |           |
|------------------------|-----------|
| dNTPs                  | 2.5 mM    |
| MgCl <sub>2</sub>      | 5 mM      |
| <i>Primer</i> direto   | 200 nM    |
| <i>Primer</i> reverse  | 200 nM    |
| Sonda                  | 100 mM    |
| Inibidor de RNase      | 10 U      |
| <i>AmpliTaq Gold</i>   | 0.625 U   |
| <i>MultiScribe</i>     | 6.25 U    |
| RNA                    | 50 ng     |
| Água destilada estéril | Até 25 µl |

#### 7.10.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio dos programas estatísticos Excel 2016, STATA e Graph Pad Plus. Os dados são mostrados em tabelas e gráficos. Os testes utilizados foram: Shapiro-wilk, Mann-Whitney, *t* de Student e o qui-quadrado. A verificação da significância nos resultados obtidos foi estabelecida quando  $p < 0,05$ .

## 8 RESULTADOS

### 8.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS CÃES

A maioria dos animais presentes no estudo eram de porte médio com idade entre 2 a 6 anos e apresentavam ao menos dois sinais clínicos compatíveis com LVC. Não houve diferença estatística em relação ao sexo dos cães estudados (tabela 06).

A infecção por *Leishmania* foi detectada por ELISA em 47/58 (81,0%) e por cultura esplênica em 18/57 (31,6%). Quinze animais foram positivos em ambos os testes, destes, apenas um com cultura esplênica positiva foi negativo no ELISA. Dos 63 cães estudados, foi possível coletar o aspirado de medula óssea de 50 cães, dos quais 39 foram negativos e 11 foram positivos para *L. infantum* na medula óssea por PCR. As características dos cães estudados neste trabalho estão resumidas na tabela 06.

**Tabela 06:** Características gerais dos cães semi-domiciliados capturados na cidade de Jequié, BA, Brasil (área endêmica de leishmaniose visceral) em 2010.

| PARÂMETROS   | FREQUÊNCIA | %    |
|--|------------|------|
| N  | 63         | 100  |
| Macho  | 34/63      | 54.0 |
| Fêmea  | 29/63      | 46.0 |
| <b>Tamanho:</b>                                    |            |      |
| Pequeno  | 19/63      | 30.2 |
| Médio  | 38/63      | 60.3 |
| Grande   | 06/63      | 9.5  |
| <b>Idade estimada (anos):</b>                      |            |      |
| 6 meses a 2 anos                                   | 17/63      | 27.0 |
| >2 a 6 anos  | 38/63      | 60.3 |
| >6 anos  | 08/63      | 12.7 |
| <b>Deteccão de infecção por <i>Leishmania</i>:</b> |            |      |
| <u>Com infecção confirmada (total):</u>            | 51/63      | 81.0 |
| ELISA (soro)                                       | 47/58      | 81.0 |
| Cultura esplênica                                  | 18/57      | 31.6 |
| ELISA / Cultura esplênica                          | 15/37      | 40.5 |
| PCR - medula óssea                                 | 11/50      | 22.0 |

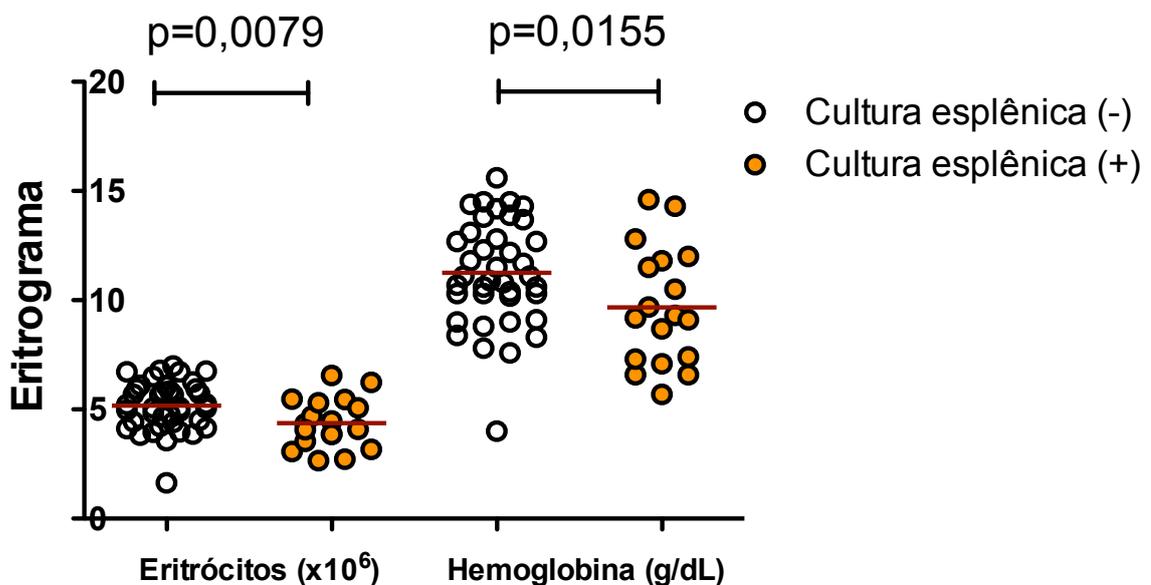
#### **Categoria clínica:**

|  |       |      |
|--|-------|------|
| Oligosintomáticos (2 ou 3 sinais clínicos)       | 24/63 | 38.1 |
| Polisintomáticos (mais do que 3 sinais clínicos) | 39/63 | 61.9 |

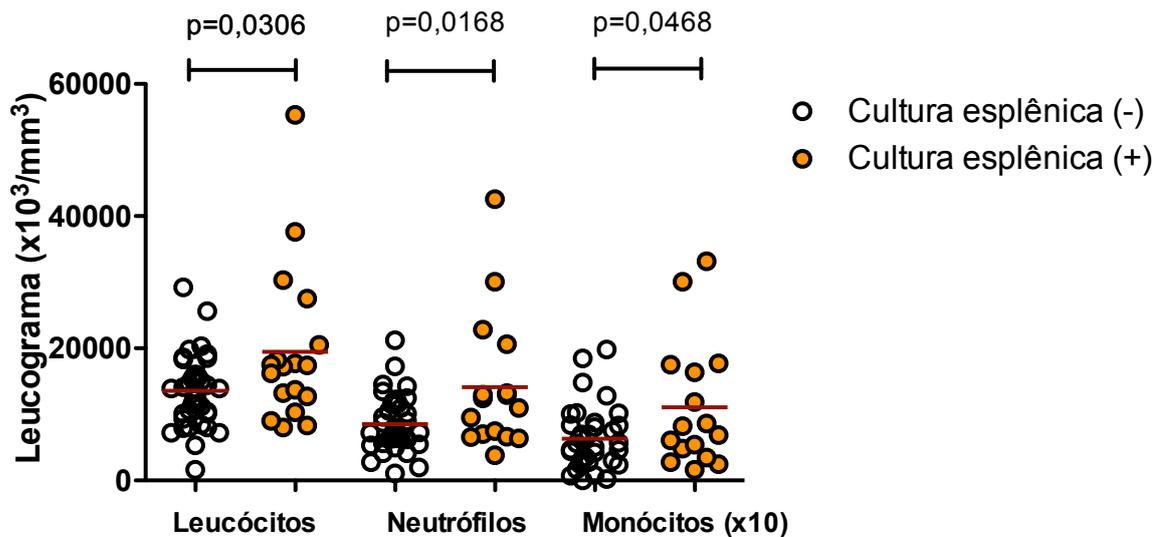
## 8.2 CULTURA ESPLÊNICA POSITIVA PARA *LEISHMANIA* E ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Os cães com cultura esplênica positiva apresentaram menor contagem de células vermelhas do sangue ( $4,4 \pm 1,1$ ), hematócrito ( $28,2 \pm 8,2$ ) e hemoglobina ( $9,7 \pm 2,7$ ) em relação aos animais com cultura esplênica negativa ( $5,2 \pm 1,1$ ), ( $33,8 \pm 7,4$ ) e ( $11,3 \pm 2,4$ ), respectivamente, teste *t* de student (Figura 13).

Os animais com cultura esplênica positiva tiveram maior quantidade de leucócitos circulantes ( $19477,8 \pm 11863,3$ ) acompanhado pelo aumento de neutrófilos ( $14124,4 \pm 10308,9$ ) e monócitos ( $1106,3 \pm 960,1$ ) quando comparados com os animais que apresentaram cultura esplênica negativa ( $13554,4 \pm 5405,0$ ), ( $8583,5 \pm 4212,8$ ) e ( $609,5 \pm 456,8$ ), respectivamente (Figura 14).



**Figura 13:** Alterações no hemograma apresentadas pelos cães com cultura esplênica positiva para *L. infantum*. Teste *t* de student.

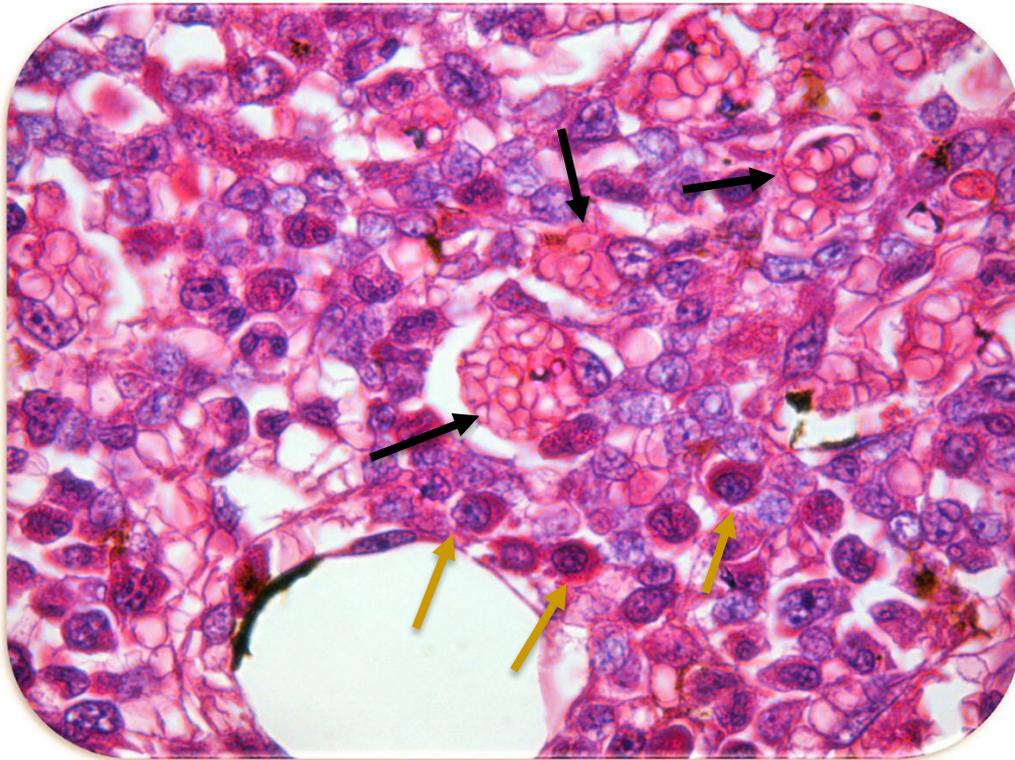


**Figura 14:** Alterações do leucograma apresentadas pelos cães com cultura esplênica positiva para *L. infantum*. Teste Mann-Whitney.

### 8.3 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM CULTURA ESPLÊNICA POSITIVA

A maioria dos cães com cultura esplênica positiva apresenta detecção do DNA de *L. infantum* na medula óssea (p=0,0004) (teste qui-quadrado). Aproximadamente 92% dos cães com cultura esplênica positiva também apresentaram histiocitose (aumento de macrófagos na medula óssea) o que foi estatisticamente diferente da quantidade dos casos de histiocitose em cães com cultura esplênica negativa (47%) (p=0,0046) (teste qui-quadrado).

Cães com histiocitose apresentaram uma maior quantidade de leucócitos na circulação periférica (17617,9 ± 9870,6) do que os animais sem a alteração (12958,9 ± 5832,9, p=0,0360, teste Mann-Whitney). Na figura 15, pode-se observar um exemplo da atividade eritrofagocítica dos histiócitos e presença de plasmócitos no ambiente medular de um cão com cultura esplênica positiva e detecção do DNA de *L. infantum* na medula óssea.



**Figura 15:** Animal com linfocitose hemofagocítica associado à LVC. Cão com cultura esplênica positiva e detecção do DNA de *L. infantum* na medula óssea. **Setas pretas:** Presença de histiócitos fagocitando eritrócitos (eritrofagocitose). **Setas amarelas:** Aumento na quantidade de plasmócitos no ambiente medular. (H&E - Aumento 40x)

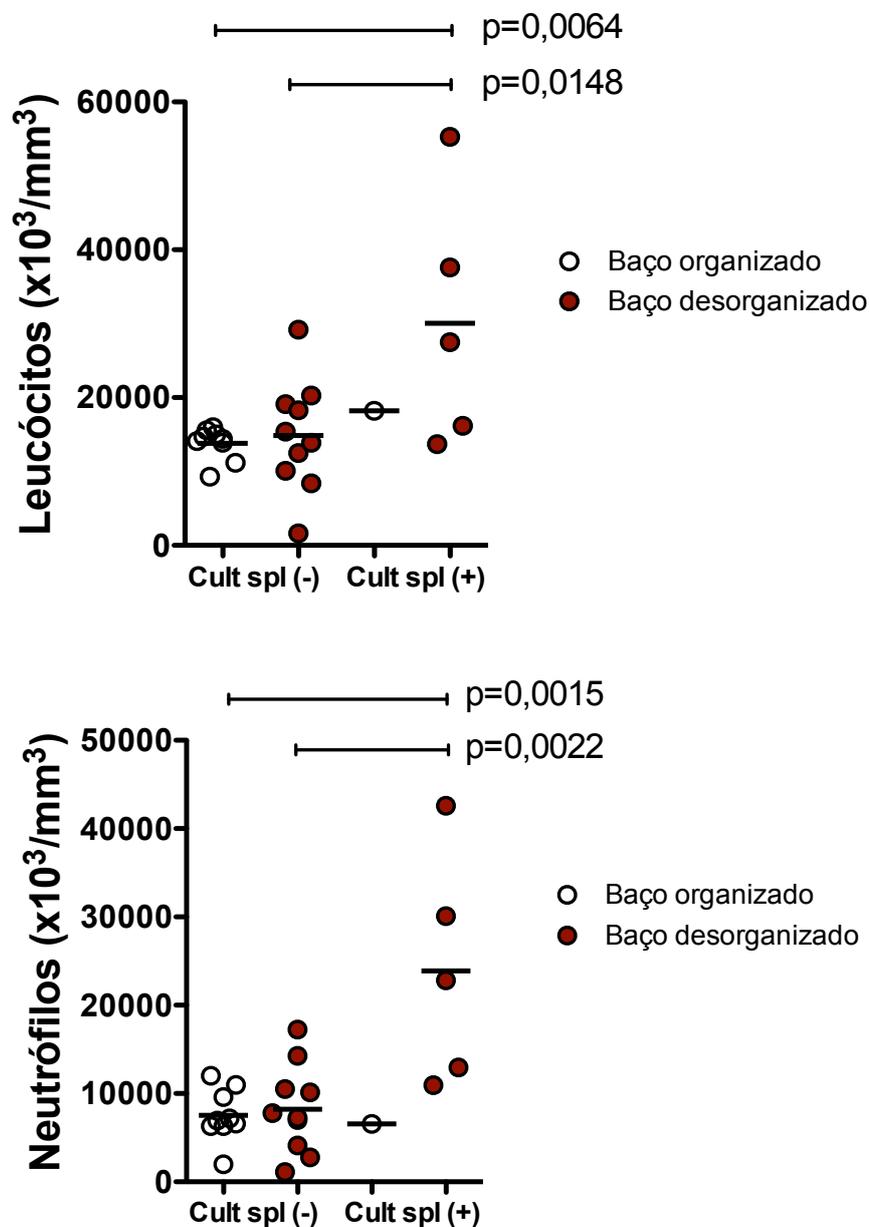
#### 8.4 DISTÚRBIOS HEMATOLÓGICOS E ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NA MEDULA ÓSSEA DOS CÃES COM CULTURA POSITIVA E DESORGANIZAÇÃO ESPLÊNICA

Em trabalho anterior publicado pelo nosso grupo, observou-se que os cães com leishmaniose visceral associada a desorganização do baço possuem um quadro mais grave da doença (LIMA et al., 2014). Dessa forma, examinamos a potencial associação entre a desorganização esplênica, a hematopoiese e distúrbios hematológicos apresentados pelos animais do presente estudo.

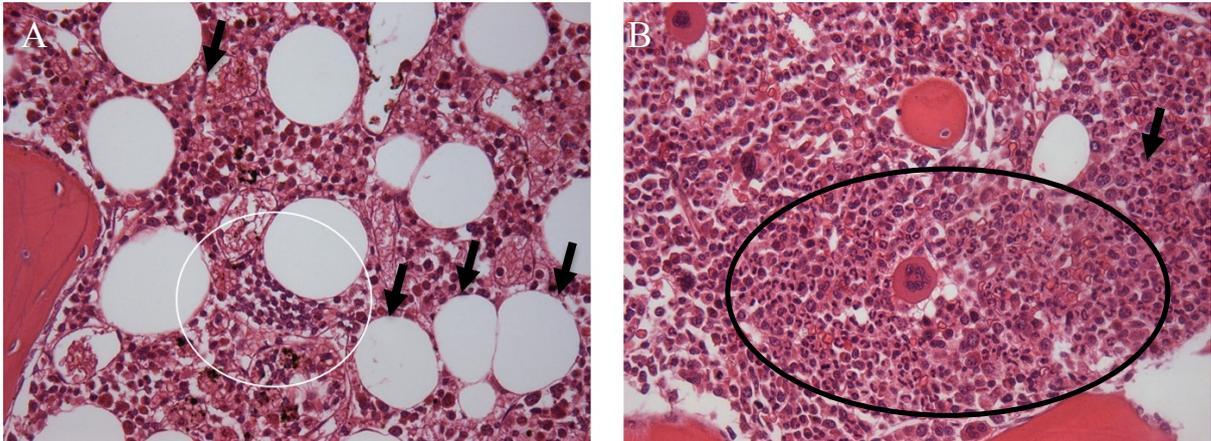
Os cães com cultura positiva e desorganização estrutural do baço apresentaram uma importante diminuição na quantidade de hemácias ( $3,5 \pm 1,1$ ) quando comparado aos com cultura negativa e sem desorganização esplênica ( $5,3 \pm 1,2$ ) ( $p=0,0066$ ) (Figura 16). Os animais positivos que apresentavam desorganização, também possuíam menor quantidade de



Adicionalmente, ocorreu uma elevação significativa na quantidade de leucócitos circulantes ( $30060,0 \pm 17030,9$ ) acompanhado por neutrofilia ( $23881,2 \pm 12994,7$ ) nos cães com cultura esplênica positiva e baço desorganizado quando comparado aos negativos com baço bem estruturado ( $13800,0 \pm 2173,7$ ) e ( $7548,3 \pm 2988,2$ ) ( $p=0,0064$  e  $p=0,0015$ ), respectivamente (Figuras 18 e 19). Apenas um animal com cultura esplênica positiva apresentou a arquitetura do baço organizado, sendo assim, não foi possível fazer a comparação deste animal com os demais grupos.



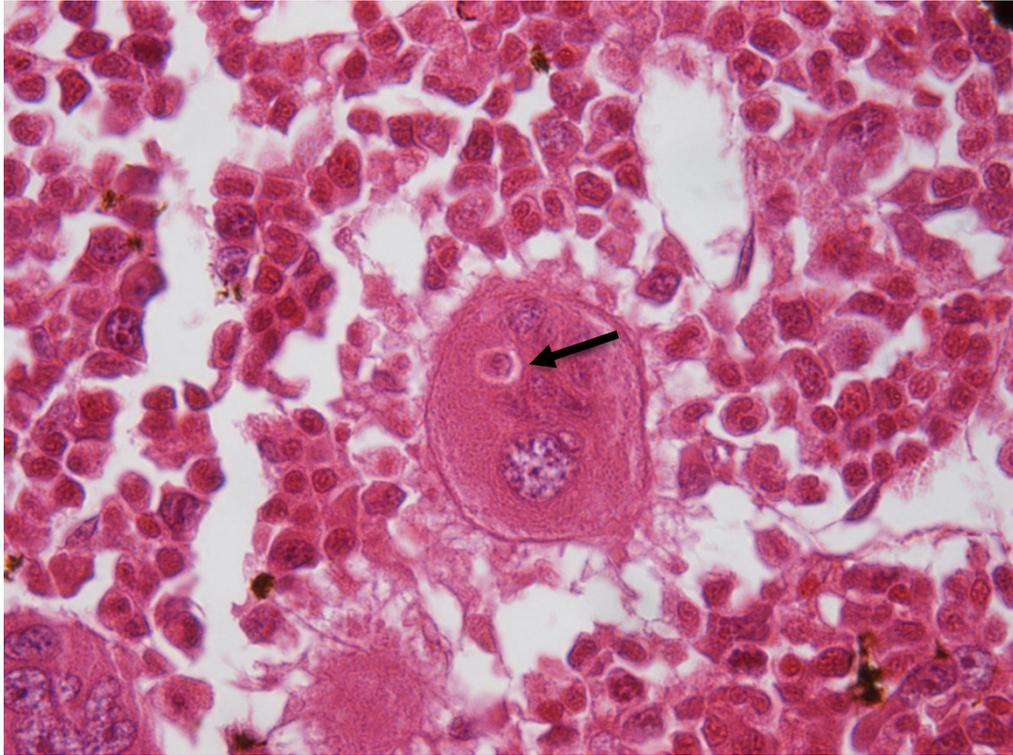
**Figuras 18 e 19:** Alterações no leucograma dos cães com cultura esplênica positiva para *Leishmania* associada a desorganização esplênica (teste estatístico Mann-Whitney).



**Figura 20:** A – Exemplo da histologia de medula óssea de um cão negativo para cultura de *Leishmania* e com baço organizado. Notar presença razoável de adipócitos (setas pretas) e dos nichos de células eritróides no círculo branco. B - Cão com cultura esplênica positiva e baço desorganizado, notar diminuição da quantidade de adipócitos (setas pretas) caracterizando hiperplasia medular, ausência de nichos eritróides e presença de hiperplasia granulocítica (círculo preto). (H&E - Aumento 10x).

#### 8.5 OUTRAS ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ENCONTRADAS NA MEDULA ÓSSEA DOS CÃES NO PRESENTE ESTUDO.

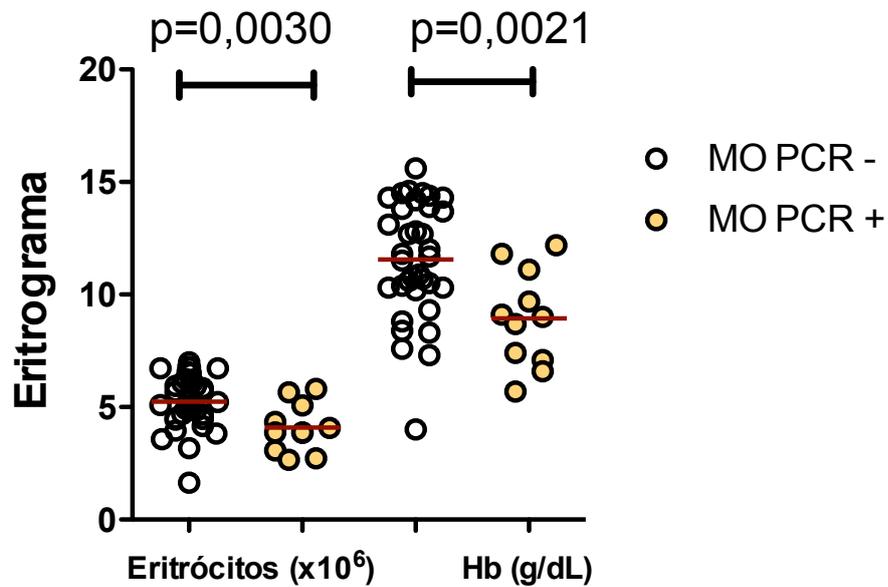
Hiperplasia granulocítica (98%), plasmocitose (96%), hiperplasia megacariocítica (62%), histiocitose (60%), congestão sinusoidal (36%), emperipolesse (30%) (Figura 21) e edema intersticial (8%) foram observadas nos animais deste estudo independentemente da cultura esplênica positiva.



**Figura 21:** Presença de emperipolesse de célula hematopoiética no interior de megacariócito. Observar citoplasmas separados por um espaço pericelular estreito (branco) indicado pela seta preta. (H&E – Aumento 10x)

#### 8.6 DIMINUIÇÃO DA QUANTIDADE DE HEMÁCIAS CIRCULANTES DE CÃES QUE TIVERAM PRESENÇA DE PARASITOS NO MICROAMBIENTE MEDULAR DETECTADA POR NESTED PCR

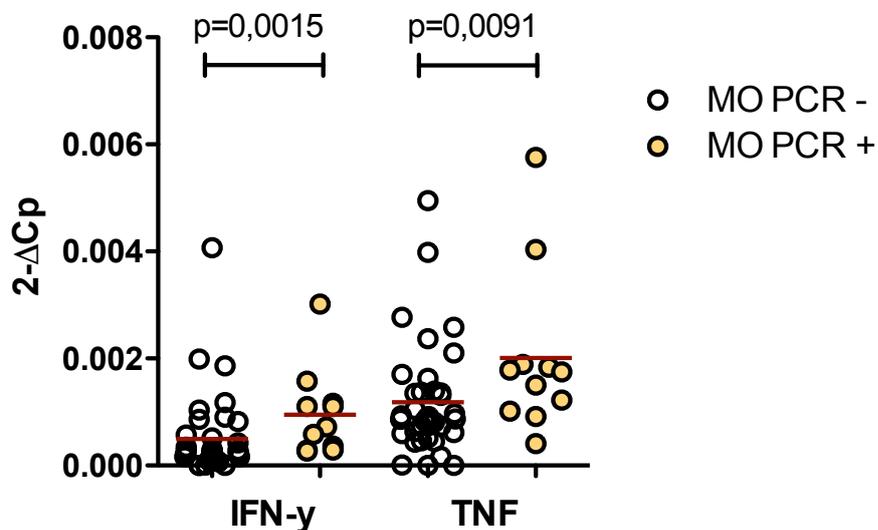
Da população de cães estudados, 22% tiveram *L. infantum* detectada na medula óssea por Nested PCR e apresentaram diminuição na quantidade de hemácias circulantes ( $p=0,0030$ ) e hemoglobina ( $p=0,0021$ ) (Figura 22).



**Figura 22:** Cães com presença de *Leishmania infantum* no microambiente medular possuíam uma menor quantidade de eritrócitos e hemoglobina (Teste estatístico: *t* de student).

### 8.7 ELEVAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IFN- $\gamma$ E TNF EM CÃES QUE TIVERAM PRESENÇA DE PARASITOS NO MICROAMBIENTE MEDULAR DETECTADA POR NESTED PCR

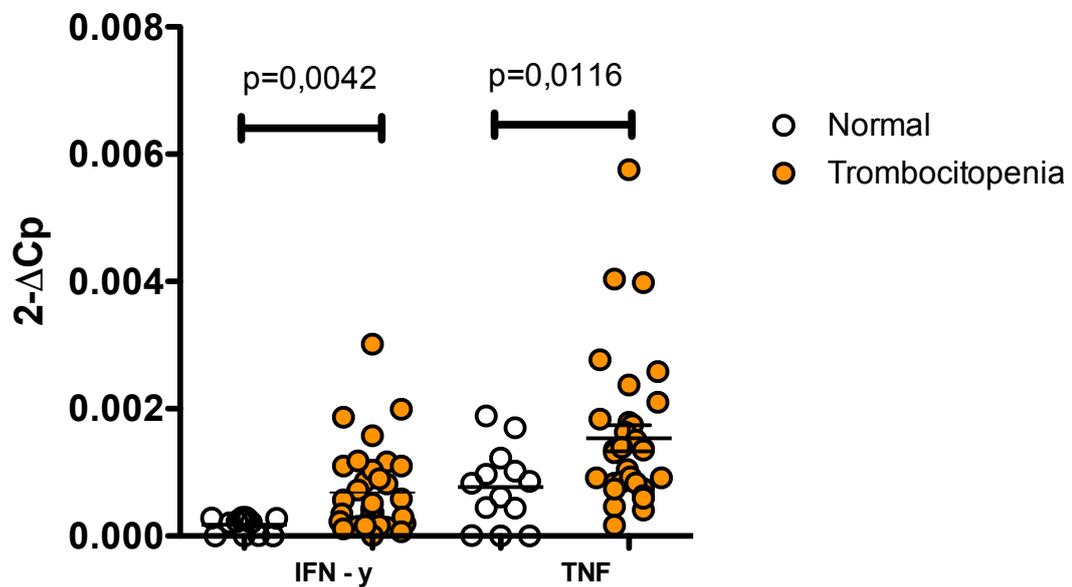
Cães que apresentaram *L. infantum* detectada na medula óssea tiveram uma maior expressão de IFN- $\gamma$  ( $p=0,0015$ ) e TNF ( $p=0,0091$ ) quando comparados às expressões dos animais negativos para a presença do parasito (Figura 23).



**Figura 23:** A presença de *Leishmania infantum* no microambiente medular eleva a expressão gênica de IFN- $\gamma$  e TNF na medula óssea de cães naturalmente infectados (Teste estatístico: Mann-Whitney).

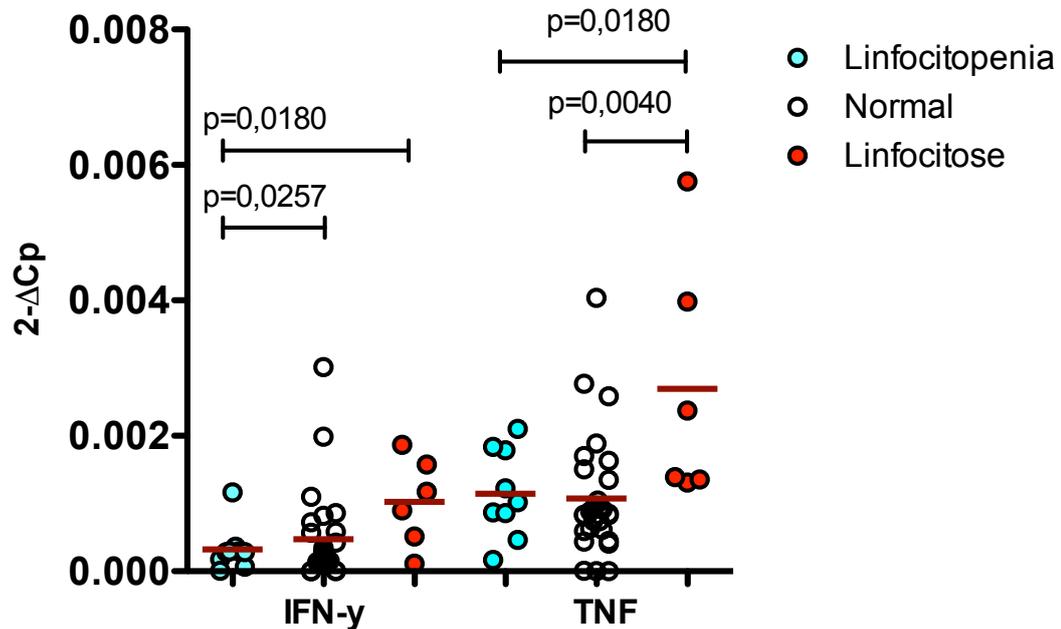
## 8.8 ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS APRESENTADAS PELOS ANIMAIS COM ELEVAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE IFN- $\gamma$ E TNF NA MEDULA ÓSSEA

Cães com trombocitopenia apresentam elevação na expressão gênica de IFN- $\gamma$  e TNF na medula óssea em relação aos animais com quantidade normais de plaquetas circulantes (Figura 24).



**Figura 24:** Elevação da expressão gênica de IFN- $\gamma$  e TNF no ambiente medular dos cães com trombocitopenia comparados aos que apresentaram quantidades normais de plaquetas circulantes (Teste estatístico: Mann-Whitney).

Os animais que apresentaram neutrofilia com desvio para esquerda, tiveram maior expressão de IFN- $\gamma$  na medula óssea ( $p=0,0480$ ). O mesmo ocorreu com os cães que tiveram linfocitose, que, apresentaram maiores expressões de IFN- $\gamma$  e TNF na medula óssea em relação aos cães com quantidades normais de linfócitos e/ou com linfocitopenia (Figura 25).



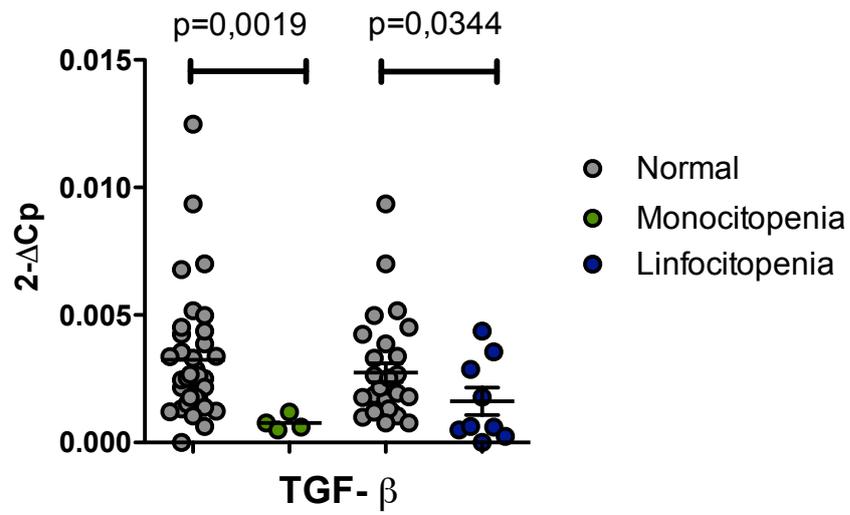
**Figura 25:** Cães que apresentaram linfocitose mostraram aumento na expressão de IFN- $\gamma$  e de TNF na medula óssea em relação aos cães com quantidade normais de linfócitos e/ou linfocitopenia.

### 8.9 EXPRESSÃO GÊNICA DE IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 E TGF- $\beta$ NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *L. INFANTUM*

A presença de *L. infantum* na medula óssea ou no baço não influenciou a expressão de TGF- $\beta$  na medula óssea dos cães deste estudo. A expressão de IL-1 $\beta$  e IL-10 no microambiente medular também permaneceram inalteradas nos cães do presentes estudo.

A citocina IL-4 não foi detectada na medula óssea por RTqPCR em nenhum dos cães analisados. Para confirmar a eficiência da técnica para detecção da IL-4, um controle positivo composto por esplenócitos estimulados com concanavalina foi criado e, no entanto, apenas este controle amplificava nas reações.

A expressão de TGF- $\beta$  foi semelhante entre os grupos estudados em relação à quantidade de eritrócitos, hemoglobina, bastões e plaquetas. No entanto, cães com monocitopenia e linfocitopenia apresentaram uma menor expressão de TGF- $\beta$  em relação aos cães com celularidade normal (Figura 26).



**Figura 26:** Redução na expressão de TGF-β em cães monocitopênicos e linfocitopênicos em relação aos que possuíam quantidades normais de monócitos e linfócitos circulantes.

## 9 DISCUSSÃO

---

A porcentagem de cães positivos na cultura esplênica do presente trabalho correspondem as encontradas anteriormente em outros estudos (FRAGA et al., 2012; LIMA et al., 2014). A prevalência de cães que apresentaram DNA de *L. infantum* por PCR da medula óssea foi similar (SOLANO-GALLEGU et al., 2001) ou um pouco menor quando comparado as detecções obtidas por qPCR (SOLCÀ et al., 2014). As diferenças podem ocorrer por conta dos distintos procedimentos, reagentes e técnicas utilizadas entre os trabalhos.

A diminuição na quantidade de hemácias circulantes, hemoglobina e hematócrito apresentadas pelos cães com cultura esplênica positiva são condizentes com leishmaniose visceral (BISWAS et al., 1992; HERWALDT, 1999; VARMA; NASEEN, 2010; NICOLATO et al., 2013). No entanto, foi visto no presente trabalho que esta alteração é mais expressiva nos animais que, além de apresentarem positividade na cultura esplênica, também possuíam desestruturação na arquitetura da polpa branca do órgão. Como publicado anteriormente, a associação entre a severidade da LVC e a desorganização esplênica é mais evidente quando os animais apresentam cultura esplênica positiva (LIMA et al., 2014).

Os cães com cultura esplênica positiva e desorganização estrutural do baço apresentaram anemia mais grave em relação aos demais. Estes, também possuíam menor quantidade de nichos para diferenciação de células da linhagem eritróide na medula óssea em relação aos com cultura negativa e baço organizado. A progressão da infecção por *Leishmania* também tem sido relacionada com inflamação granulomatosa na medula óssea acompanhada por hipoplasia eritróide e megacariocítica (MAIA; CAMPINO, 2008).

Em um estudo conduzido por Nicolato e colaboradores (2013), também foi visto que hipoplasia da série eritroblástica constituiu a principal alteração no mielograma de cães sintomáticos com LV. Adicionalmente, esta alteração esteve associada com as diminuições das hemácias na circulação periférica

dos animais. Nesse estudo, apresentamos alterações adicionais que podem explicar os motivos pelos quais a eritropoiese é afetada.

Foi observado neste estudo que os animais trombocitopênicos também apresentaram elevação na expressão das citocinas IFN- $\gamma$  e TNF. De Bruin e colaboradores (2013) afirmam que o IFN- $\gamma$  interfere na regulação da megacariopoiese por induzir a expressão da integrina CD41. Desta maneira, alterações nesta citocina também interfere na diferenciação dos megacariócitos e conseqüentemente na liberação de plaquetas para o sangue periférico.

Os cães que possuíam *L. infantum* no microambiente medular, apresentaram uma menor quantidade de eritrócitos circulantes. Hamsters experimentalmente infectados por *L. donovani*, apresentaram diminuições nas expressões de genes relacionados com a diferenciação eritróide ( $\alpha$ -globina,  $\beta$ -globina, ALAS2), no entanto, os níveis de RNAm dos receptores eritróides (c-kit, EpoR) e dos fatores de transcrição (GATA1, GATA2, FOG1) não foram afetados pela infecção. Isto sugere que a infecção tem um efeito negativo sobre a diferenciação dos eritroblastos (LAFUSE et al., 2013).

Com relação ao leucograma, os animais com cultura esplênica positiva apresentaram maior quantidade de leucócitos circulantes, acompanhado por neutrofilia e monocitose. Esta última alteração também foi verificada anteriormente (TRYPHONAS et al., 1977), no entanto, outros trabalhos sugerem que a diminuição no número absoluto de monócitos circulantes pode estar relacionada com o alto parasitismo em cães (GUERRA et al., 2009).

Foi observada redução na expressão de TGF- $\beta$  em cães monocitopênicos e linfocitopênicos em relação aos que possuíam quantidades normais de monócitos e linfócitos circulantes. Porém, como a presença de *L. infantum* na medula óssea não interferiu na expressão da referida citocina, este achado não foi relacionado à leishmaniose visceral canina.

O aumento da quantidade dos neutrófilos nos animais do presente estudo pode ter ocorrido porque são células massivamente recrutadas para o local de inoculação da *Leishmania*, enquanto os macrófagos, provenientes dos monócitos, posteriormente se tornam a população celular dominante no

infiltrado inflamatório (CHARMOY et al., 2010). O aumento na quantidade de neutrófilos circulantes em cães sintomáticos com LV também foi verificado em outros estudos (NICOLATO et al., 2013).

Cães semi-domiciliados habitantes em regiões endêmicas podem eventualmente ser reinfetados e serem novamente desafiados por novos parasitos e/ou infecções secundárias, assim como ocorre em humanos (GUERREIRO et al., 1985; PASYAR et al., 2012). Juntos, estes fatos podem acarretar no aumento na demanda de leucócitos para os novos sítios inflamatórios e explicar a elevação na quantidade dessas linhagens celulares na circulação periférica dos cães com cultura esplênica positiva no estágio grave da leishmaniose visceral.

A maioria dos cães com cultura esplênica positiva apresentou detecção do DNA de *L. infantum* por PCR na medula óssea e histiocitose. Em algumas ocasiões, pôde-se também observar a atividade eritrofagocítica dos histiócitos e presença de vários plasmócitos no ambiente medular, o que caracteriza um quadro de linfocitose associada à LV semelhante ao observado em diversos casos de leishmaniose visceral humana (GAGNAIRE et al., 2000; AGARWAL et al., 2006; RAJAGOPALA et al., 2008; BODE et al., 2014).

A progressão da infecção por *Leishmania* tem sido relacionada com uma inflamação granulomatosa na medula óssea acompanhado por um aumento da percentagem de linfócitos e plasmócitos, assim como também a presença de hipoplasia eritróide e megacariocítica (MAIA; CAMPINO, 2008). Histiocitose e hipoplasia eritróide foram as alterações mais evidentes na medula óssea dos cães com LV grave no presente estudo. O aumento de histiócitos no microambiente medular é fundamental para a formação de um granuloma neste órgão, no entanto, não foi observado formação de granulomas nos exames histológicos das amostras de medula óssea dos cães do presente estudo.

Estudos citológicos da medula óssea de cães com LV marcam alterações nas linhagens eritrocitária, leucocitária (MANZILLO et al., 2006) e trombocitária (CIARAMELLA et al., 2005). No presente estudo também foram encontradas alterações nestas linhagens celulares, porém, a linhagem

trombocitária não esteve de fato associado ao parasitismo medular e/ou esplênico nos cães analisados.

A presença de *L. infantum* interfere na expressão e produção de citocinas em diversos tecidos (FALEIRO et al., 2014), por exemplo, IFN- $\gamma$  e TNF são importantes citocinas sintetizadas e liberadas durante a resposta imune efetora na leishmaniose visceral canina (BANETH et al., 2008). A mudança nas expressões das citocinas também pode influenciar no processo de diferenciação celular que ocorre na medula óssea (DE BRUIN et al., 2013; DE BRUIN et al., 2014). Os cães do presente estudo apresentaram aumento nas expressões das citocinas e de fato, aqueles que obtiveram aumento na expressão de IFN- $\gamma$  possuíam menores quantidades de hemácias circulantes.

As displasias eritróides e megacariocíticas podem estar associadas ao aumento na produção de IFN- $\gamma$  e TNF devido à presença elevada de macrófagos na medula óssea dos cães com a enfermidade (MANZILLO et al., 2006). Desta maneira, pode-se esperar um prejuízo na liberação de eritrócitos maduros para circulação periférica.

O IFN- $\gamma$  é um redutor da atividade hematopoiética medular (SELLERI et al., 1996) e afeta consideravelmente a diferenciação da maioria das células progenitoras hematopoiéticas (DE BRUIN et al., 2014). Possivelmente, a elevação nas expressões de IFN- $\gamma$  e TNF influenciam negativamente na diferenciação das células de linhagem eritróide, justificando assim a diminuição na quantidade dos nichos eritróides na medula óssea e na gravidade da anemia apresentadas pelos cães com cultura esplênica positiva e detecção de *L. infantum* no aspirado de medula óssea do presente trabalho.

O fator de transcrição PU.1 pode interagir com o GATA-1 e inibir sua função na diferenciação eritróide (REKHTMAN et al., 1999). De Bruin e colaboradores (2014) postulam que o IFN- $\gamma$  eleva a atividade do fator de transcrição PU.1 resultando na inibição do GATA-1 e conseqüentemente interferindo na diferenciação das células eritróides.

Alguns outros estudos também relatam o aumento na expressão de citocinas como TNF e IFN- $\gamma$  na medula óssea de cães naturalmente infectados com e sem sinais clínicos (QUINNELL et al., 2001).

Existem diversos mecanismos pelos quais o IFN- $\gamma$  pode influenciar negativamente na concentração das hemácias. Nas doenças crônicas, o IFN- $\gamma$  afeta o metabolismo do ferro e limita este componente durante a eritropoiese (WEISS, 2009). Adicionalmente, esta citocina eleva a quantidade de macrófagos ativados que podem promover eritrofagocitose contribuindo na diminuição de eritrócitos circulantes (ZOLLER et al., 2011). Possivelmente, este fato explica o surgimento da linfocitose hemofagocítica encontrada em cães com cultura esplênica positiva e detecção de *L. infantum* na medula óssea do presente estudo, caracterizando assim um distúrbio na homeostasia da medula óssea destes animais.

O aumento na quantidade de linfócitos circulantes nos cães com cultura esplênica positiva e baço desorganizado também foi acompanhado pelo aumento na expressão de IFN- $\gamma$  e de TNF na medula óssea. Linfocitose periférica e medular também foi observada nos cães do estudo realizado por Nicolato e colaboradores (2013), assim como foi relatado em humanos com esplenomegalia (SOK, 1994; RAI et al., 2008). Varma e colaboradores (2010) relatam pacientes humanos que cursam com leucopenia e apresentam linfocitose relativa. Os mesmos autores ainda indicam que o principal motivo da leucopenia é o hiperesplenismo.

Alguns artigos demonstram que o TNF possui efeitos inibidores nas células tronco hematopoiéticas em camundongos (PRONK et al., 2011), assim como também em progenitores eritróides humanos (BFU-E e CFU-E) (ROODMAN et al., 1987). Sendo assim, diversas são as maneiras pelas quais o IFN- $\gamma$  e TNF podem influenciar na hematopoiese. A elevação na expressão destas citocinas desencadeada pela resposta inflamatória pela presença de *L. infantum* na medula óssea dos cães deste estudo, possivelmente seria um dos principais mecanismos envolvidos na patogênese da anemia apresentadas pelos mesmos.

## 10 CONCLUSÕES

---

- 1 – Cães com infecção ativa por *L. infantum* definida pela presença de cultura do aspirado esplênico positivo apresentam alterações de parâmetros hematológicos referentes a anemia e leucocitose com neutrofilia;
- 2 – Essas alterações do sangue periférico são acompanhadas de hipoplasia eritróide;
- 3 – As alterações hematológicas apresentadas pelos cães com LV são mais expressivas quando existe desorganização esplênica;
- 4 – E estão associadas a mudanças nas expressões de citocinas no microambiente medular, como o aumento de IFN- $\gamma$  e TNF.

## 11 REFERÊNCIAS

---

- ABBOUD, C. N.; LICHTMAN, M. A. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, B. S.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U. **Williams' Hematology**. 6th ed. McGraw-Hill: New York, 2001. p. 29-58.
- AGARWAL, S.; et al. Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 73, n. 5, p. 445-446, 2006.
- AGUT, A. et al. Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 153, n. 21, p. 648-652, 2003.
- ALENCAR, J. E.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONISI, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 706-717.
- ALEXANDRE-PIRES, G. et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, n. 3-4, p. 275-283, 2010.
- ALMEIDA, S. L. et al. Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p. 739-743, 2006.
- ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v.57, p. 1-88, 2004.
- ANSTEAD, G. M. et al. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4709-4718, 2001.
- ARAI, F. et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 149-161, 2004.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses, **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, 2000.

BALEEIRO, C. O. et al. Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniasis endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1-3, p. 21-28, 2006.

BANETH, G. et al. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BEHRINGER, D. et al. Cytokine and chemokine production by CD34+ haemopoietic progenitor cells: detection in single cells. **British Journal of Haematology**, v. 97, n. 1, p. 9-14, 1997.

BERN, C. et al. Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 7, p. 917-24, 2006.

BISWAS, T. et al. Anemia in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. **The Journal of Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 140-142, 1992.

BLOOM, J. C. et al. Cephalosporin induced immune cytopenia in the dog: demonstration of erythrocyte, neutrophil, and platelet associated IgG following treatment with cefazedone. **American Journal Of Hematology**, v. 28, n. 02, p. 71-8, 1988.

BODE, S. F. et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in imported pediatric visceral leishmaniasis in a nonendemic area. **The Journal of Pediatrics**, v. 165, n. 1, p. 147-153, 2014.

BRAZ, R. F. et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 4, p. 344-8, 2002.

BROXMEYER, H. E. et al. Biology and mechanisms of action of synergistically stimulated myeloid progenitor cell proliferation and suppression by chemokines. **Stem Cells**, v. 15, p. 69-77, 1997.

BURNS, J. M. JR. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 2, p. 775-779, 1993.

- CABRAL, M. et al. The immunology of canine leishmaniosis: strong evidence for a developing disease spectrum from asymptomatic dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 76, n. 3, p. 173-180, 1998.
- CARVALHO, E. M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 3, p. 535-40, 1992.
- CHAMIZO, C. et al. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1-2, p. 67-75, 2005.
- CHANDRA, H. et al. Visceral leishmaniasis with associated common, uncommon, and atypical morphological features on bone marrow aspirate cytology in nonendemic region. **Journal of Tropical Medicine**, p. 861032, 2013.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.
- CHARMOY, M. et al. The Prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine And Biotechnology**, p. 719361, 2010.
- CIARAMELLA, P. et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 141, p. 539-543, 1997.
- CIARAMELLA, P. et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 465-467, 2005.
- CORRÊA, A. P. et al. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 267-274, 2007.
- COSTA, D. J. et al. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study canine visceral leishmaniasis. **Plos One**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013.
- CRUZ, I. et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2343-2347, 2006.

CRUZ, I. et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis.

**Experimental Parasitology**, v. 134, n. 3, p. 281-289, 2013.

DA SILVA, M. R. et al. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 6, p. 811-814, 2005.

DE ABREU, T. R. et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **Plos One**, v. 6, n. 5, p. 1-9, 2011.

DEANE, L. M. Epidemiologia e profilaxia do Calazar Americano. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.10, p.431-449, 1956.

DE BRUIN, A. et al. Interferon- $\gamma$  impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. **Blood**, v. 121, n. 18, p. 3578-3585, 2013.

DE BRUIN, A. et al. Impact of interferon- $\gamma$  on hematopoiesis. **Blood**, v.124, n. 16, p. 2479-2486, 2014.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417-23, 1996.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p.305-318, 2004.

DE TOMMASI, A. S. et al. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. **Parasites & Vectors**, v. 7:534, p. 1-10, 2014.

DHINGRA, K. K. et al. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral kala azar: A review. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 96-100, 2010.

DOS SANTOS, W. L. et al. Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral leishmaniasis: Emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 251-259, 2008.

FALEIRO, R. J. et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, V. 8, n. 7, e2914, 2014.

FELDMAN, B. F.; KANEKO, J. J. The anemia of inflammatory disease in the dog. I. The nature of the problem. **Veterinary Research Communications**, v. 4, n. 4, p. 237-252, 1981.

FRAGA, D. B. et al. Temporal distribution of positive results of tests for detecting *Leishmania* infection in stray dogs of an endemic area of visceral leishmaniasis in the Brazilian tropics: a 13 years survey and association with human disease. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 591-594, 2012.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology**, v. 2, p. 11-19, 2012.

FUCHS, E. et al. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 769-778, 2004.

FUJIWARA, S. et al. Cytokine profiles of peripheral blood mononuclear cells from dogs experimentally sensitized to Japanese cedar pollen. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 93, p. 9-20, 2003.

GAGNAIRE, M. H. et al. Hemophagocytic syndrome: A misleading complication of visceral leishmaniasis in children - a series of 12 cases. **Pediatrics**, v. 106, n. 4, E58, 2000.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron sequestration and anemia of inflammation. **Seminars in Hematology**, v. 46, n. 4, p. 387-393, 2009.

GASPER, P. W. Hematopoietic microenvironment. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Lippincott, Williams and Wilkins: Philadelphia, 2000. p. 74-78.

GIUNCHETTI, R. C. et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, n. 2-3, p. 100-7, 2006.

GOSSAGE, S. M. et al. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027-1034, 2003.

GUERRA, L. L. et al. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 104, n. 3, p. 611-622, 2009.

- GUERREIRO, J. et al. Bacterial infection in patients with visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n. 4, p. 447-452, 1985.
- HARVEY, W. J. **Atlas of veterinary hematology – Blood and bone marrow of domestic animals**. Philadelphia, Pennsylvania, Saunden Company. p. 228, 2001.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, p. 1191–1199, 1999.
- HOLLOWAY, S. A. et al. Prednisolone and danazol for treatment of immune-mediated anemia, thrombocytopenia, and ineffective erythroid regeneration in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 197, n. 8, p. 1045-8, 1990.
- HOLZMULLER, P. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, v. 132, Suppl:S19-32, 2006.
- HOTEZ, P. J. et al. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 871-878, 2004.
- IQBAL, J. et al. Imported visceral leishmaniasis: diagnostic dilemmas and comparative analysis of three assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 475-9, 2002.
- JACKSON, M. L. **Veterinary clinical pathology – An introduction**. 1th, Blackwell Publishing Professional, 2007
- JÜTTNER, C. et al. Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis. **The Veterinary Record**, v. 149, n. 6, p. 176-179, 2001.
- KOUTINAS, A. F. et al. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376-383, 1999.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, Article. 251, 2012.
- KUMAR, R. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for recombinant K39 antigen in diagnosis and prognosis of Indian visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1220-1224, 2001.

KUMAR, P. V. et al. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. **American Society of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 29, n. 2, p. 77-80, 2007.

LAFUSE, W. P. et al. *Leishmania donovani* infection induces anemia in hamsters by differentially altering erythropoiesis in bone marrow and spleen. **Plos one**, v. 8, n. 3, p. 1-12, 2013.

LAGE, R. S. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 115, n. 1-2, p. 135-145, 2007.

LEE, K. P. Emperipolesis of hematopoietic cells within megakaryocytes in bone marrow of the rat. **Veterinary pathology**, v. 26, n. 06, p. 473-478, 1989.

LEWIS, H. B.; REBAR, A. H. **Bone Marrow Evaluation in Veterinary Practice**. St. Louis, Raiston Purine Co, 1979.

LI, L., XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 605-631, 2005.

LIMA, I. S. et al. Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **Plos One**, v. 9, n. 2, 2014.

LIMA, W. G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, n. 1, p. 43-53, 2004.

LOPES, A.T.S. et al. **Manual de Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria: Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais, UFSM, 2007.

LUND, J. E. Toxicologic effects on blood and bone marrow. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th ed. Williams and Wilkins: Philadelphia, PA. 2000. p. 44-50.

MACKENZIE, W. F.; EUSTIS, S. L. Bone marrow. In: BOORMAN, G. A.; EUSTIS, S. L.; ELWELL, M. R.; MONTGOMERY, C. A., MACKENZIE, W. F. : **Pathology of the Fischer Rat**. Academic Press, Inc., San Diego, 1990. p. 395-403.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of *Leishmania infantum* infection in the Dog. **The Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, ID 541571, p. 1-7, 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.

MAIZELS, R. M. et al. **Parasite antigens, parasite genes: a laboratory manual for molecular parasitology**. Cambridge University Press (Ed.), Nova York, USA. 1991.

MANZILLO, F. V. et al. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Record**, v. 158, n. 20, p. 690-694, 2006.

MARZOCHI, M. C. A. et al. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 80, n.1, p. 17-22, 1985.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 5, p. 188-199, 2000.

MEZZA, L. E.; OLESON, F. B.; KOWOLENKO, M. D. Megakaryocytic neutrophilic emperipolesis in the bone marrows of CD-1 mice. **Toxicologic Pathology**, v. 19, n. 4 Pt 2, p. 672, 1991.

MOKHTARI, M.; KUMAR, P. V. Visceral leishmaniasis-associated hemophagocytosis: a single center experience. **Archives of Iranian Medicine**, v. 16, n. 8, p. 471-473, 2013.

MOMO, C. et al. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, p. 1-5, 2014.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**. v. 366, p. 1561-1577, 2005.

NICOLATO, R. C. et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **Plos One**. v.8, n. 12, p. 1-9, 2013.

NIETO, C. G. et al. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 33-47, 1992.

NOYES, W. D.; BOTHWELL, T. H.; FINCH, C. A. The role of the reticulo-endothelial cell in iron metabolism. **British Journal of Haematology**, v. 6, p. 43-55, 1960.

PARANHOS-SILVA, M. et al. A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. **Veterinary parasitology**, v. 114, n. 2, p. 97-111, 2003.

PASYAR, N.; ALBORZI, A.; POULADFAR, G. R. Evaluation of serum procalcitonin levels for diagnosis of secondary bacterial infections in visceral leishmaniasis patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 01, p. 119-121, 2012.

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil-Médico**, v. 48, p. 949-950, 1934.

PERKINS, S. L. Examination of the blood and bone marrow. In: LEE, G. R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J. P.; Rodgers, G. M. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10th. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 1999. p. 9-35.

PETERSON, M. E.; RANDOLPH, J. F. Diagnosis of canine primary polycythemia and management with hydroxyurea. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 180, n. 4, p. 415-418, 1982.

PICKER, L. J.; SIEGELMAN, M. H. Lymphoid tissues and organs. In: PAUL, W. E. **Fundamental Immunology**. 4th. Lippincott-Raven: Philadelphia, PA. 1999. p. 479-531.

PRONK, C. J. et al. Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 8, p. 1563-1570, 2011.

QUINNELL, R. J. et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis, **Journal of Infectious Diseases**, v. 183, n. 9, p. 1421-1424, 2001.

RAI, M. E. et al. Haematological findings in relation to clinical findings of visceral Leishmaniasis in Hazara Division. **Journal of Ayub Medical College JAMC**, v. 20, n. 3, p. 40-43, 2008.

RAJAGOPALA, S. et al. Visceral leishmaniasis associated hemophagocytic lymphohistiocytosis -case report and systematic review. **The Journal of Infection**, v. 56, n. 5, p. 381-8, 2008.

RAZA, A. et al. Simultaneous assessment of cell kinetics and programmed cell death in bone marrow biopsies of myelodysplastics reveals extensive apoptosis as the probable basis for ineffective hematopoiesis. **American Journal of Hematology**, v. 48, n. 3, p. 143-154, 1995.

- REKHTMAN, N. et al. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. **Genes & Development**, v. 13, n. 11, p. 1398-1411, 1999.
- REIS, A. B. et al. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 341-349, 2010.
- REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.
- REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.
- REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.
- ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463-467, 2004.
- ROODMAN, G. D. et al. Tumor necrosis factor-alpha and hematopoietic progenitors: effects of tumor necrosis factor on the growth of erythroid progenitors CFU-E and BFU-E and the hematopoietic cell lines K562, HL60, and HEL cells. **Experimental Hematology**, v. 15, n. 9, p. 928-935, 1987.
- RYWAIN, A. M. **Histopathology of the Bone Marrow**. Boston, Little, Brown and Co, 1978.
- SACKS, D. L. et al. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. **The Journal of Immunology**, v. 138, n. 3, p. 908-913, 1987.
- SANCHEZ, M. A. et al. J. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 6, p. 618-624, 2004.
- SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v.30, n. 10, p.515-524, 2008.

SELLERI, C. et al. Interferon-gamma constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. **Blood**, v. 87, n. 10, p. 4149-4157, 1996.

SILVA, J. S. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PloS One**, v. 7, n. 1, e29103, 2012.

SINGH, R. K.; PANDEY, H. P.; SUNDAR, S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 331-344, 2006.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SOK, D. Peripheral lymphocytosis in tropical splenomegaly syndrome. **Malawi Medical Journal**, v. 10, n. 1, 1994.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 1, p. 7-12, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560-563, 2001.

SOLCÀ, M. S. et al. Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. **PloS One**, v. 9, n. 7, e103635, 2014.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2011. 729p.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 38, n. 4, p. 547-564, 2007.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958, 2002.

TRAVLOS, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 05, p. 548-565, 2006.

TRAVLOS, G. S. Histopathology of bone marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 566-598, 2006b.

TRYPHONAS, L. et al. Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 41, n. 01, p. 1-12, 1977.

VALLI, V. E. O., GENTRY, P. A. Hematopoietic system. In: JUBB, K. V. F., KENNEDY, P. C., PALMER'S, N. C. **Pathology of Domestic Animals**. 5th ed., Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. p. 107-324.

VAMVAKIDIS, C. D. et al. Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **The Veterinary Record**, v. 146, n. 24, p. 698-703, 2000.

VAN EYS, G. J. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 51, n. 1, p. 133-142, 1992.

VARMA, N.; NASEEM, S. Hematologic Changes in Visceral Leishmaniasis/Kala Azar. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, V. 26, n. 3, p. 78-82, 2010.

WALTON, R. M. et al. Bone marrow cytological findings in 4 dogs and a cat with hemophagocytic syndrome. **Journal Of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 1, p. 7-14, 1996.

WEISS, D. J. Histopathology of canine nonneoplastic bone marrow. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 15, n. 2, p. 7-11, 1986.

WEISS G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 7, p. 682-693, 2009.

WEISS, L.; GEDULDIG, U. Barrier cells: stromal regulation of hematopoiesis and blood cell release in normal and stressed murine bone marrow. **Blood**, v. 78, n. 4, p. 975-90, 1991.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil Introduction. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2937-2940, 2008.

WHITE, A. C. JR. et al. *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 2, p. 123-131, 1992.

WHO. World Health Organization, Fact sheet N°375 Updated February 2015. disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H.; KASILI, E. G. Ultrastructure of bone marrow in patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 40, n. 3, p. 267-275, 1987.

WIWANITKIT, V. Bone marrow leishmaniasis: a review of situation in Thailand. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 10, p. 757-759, 2011.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Tropical Medicine & International Health**, V. 6, n. 2, p. 108-113, 2001.

ZOLLER, E. E. et al. Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 6, p. 1203-1214, 2011.