Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo

Flaviane Alves de Pinho

Patogênese da pancitopenia na leishmaniose visceral canina e murina

Tese apresentada ao Instituto de
Medicina Tropical da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Doutora em
Ciências

Área de concentração: Doenças Tropicais e
Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

São Paulo
2014

Flaviane Alves de Pinho

Patogênese da pancitopenia na leishmaniose visceral canina e murina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para a
obtenção de título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Hiro Goto

SÃO PAULO

2014

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Pinho, Flaviane Alves de

Patogênese da pancitopenia na leishmaniose visceral canina e murina / Flaviane Alves de Pinho. – São Paulo, 2014.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientadora: Hiro Goto

Descritores: 1. LEISHMANIOSE VISCERAL. 2. MEDULA ÓSSEA.
3. FATORES DE CRESCIMENTO. 4. CÃES. 5. CAMUNDONGOS.
6. PANCITOPENIA.

USP/IMTSP/BIB-10/2014.

*“O que torna o sonho impossível, não é o sonho em si,
é a incapacidade do sonhador”.*

Autor desconhecido

À minha mãe, Terezinha de Jesus Alves e aos meus irmãos, Fabiane Alves de Pinho e Daniel Alves Leão, pelo amor incondicional, e à minha afilhada Isadora Marçal que veio para fortalecer ainda mais a união da nossa família.

Essa conquista é nossa!!

AGRADECIMENTOS

À DEUS pela vida e fé em um bem maior.

À minha orientadora Profa. Dra. Hiro Goto por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa e pela confiança creditada em mim para realização desse projeto. Agradeço também pelos ensinamentos e parceria durante toda a pesquisa, com aconselhamentos relevantes para o meu crescimento científico. Não posso deixar de citar que a sua amizade e apoio me deram forças para enfrentar todos os obstáculos inerentes da pesquisa e vida pessoal. Espero que a nossa parceria ainda perdure por longos anos. Muito obrigada!!!

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa (*in memoriam*) que foi meu pai científico e disponibilizou seu laboratório para a realização do meu projeto em Teresina, Piauí. As suas atitudes como profissional e pessoa sempre foram exemplos de inspiração. Certamente, todos os seus ensinamentos foram à base para a realização dos meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Paul Kaye por ter oferecido uma oportunidade ímpar de desenvolver em seu laboratório o meu doutorado sanduíche. A sua colaboração foi essencial para a minha formação como pesquisadora.

A todos os professores do Laboratório de Soroepidemiologia do IMT/USP: Prof. Dr. Angelo Laulleta Lindoso, Profa. Dra. Thema Okay e Prof. Paulo Cotrim pela disponibilidade do laboratório e aconselhamentos.

À banca examinadora da minha qualificação composta pelo Prof. Dr. Heitor Andrade, Profa. Dra. Mitika Hagiwara e Profa. Dra. Sandra Gualandro pela relevância das sugestões que foram primordiais para o andamento do projeto.

A todos os alunos e funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia do IMT/USP: Aline Martins, Ariane Leal, Amanda Rodrigues, Ive Maíra, Ms. Beatriz Celeste, Camila Sato, Carole Mansour, Dra. Célia Vendrame, Ms. Christiane Ozaki, Daiane Barros Dias, Dr. Eduardo Sanchez, Ms. Marcela, Dra. Juliana, Egon, Guilherme Barssotti, Jucene, Dra. Luiza Reis, Renata Elen, Ms. Julio, Simone Petri, Ariane Sanchez, Ms. Edite Kanashiro, Dra. Carmem Arroyo, Dra. Guita Elephant, Jhonatan, Dra. Kelly, Ligia, Mussya Rocha, pela companhia.

Ao grupo de coleta do Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí, pela ajuda e amizade: Ms. Lucilene dos Santos Silva, Ms. Dayane Francisca

Higino Miranda, Elis Rosélia de Freitas Siqueira Silva, Dra. Karina Oliveira Drumond e Micherlene da Silva Carneiro. Aos funcionários Eduardo Braz e Manoel de Jesus, técnicos do Laboratório de Histopatologia do Centro de Ciências Agrárias da UFPI pelo processamento de material.

À Gerência de Zoonoses de Teresina/PI pelo apoio e dedicação dos funcionários no fornecimento de animais para a realização da pesquisa.

A todos os alunos e funcionários do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Paul Kaye, particularmente, Dra. Naj Brown, Dra. Jane Dalton, Dra. Lynette Beattie, Ana Pinto e Olivier Preham pela ajuda e orientação na execução dos experimentos. E aos funcionários do departamento de tecnologia pelos treinamentos.

A Profa. Dra Mitika Hagiwara e Dra. Samantha Ive Miyashiro da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade São Paulo pelo treinamento e disponibilidade do laboratório para a realização dos exames.

À Polícia Militar de São Paulo, principalmente, ao Mv. Ms. Maurício Marquezi, por disponibilizar os animais para a coleta de material.

Ao laboratório de Imunopatologia do Prof. Dr. Thales de Brito e a funcionária Ms. Ana Maria, por disponibilizarem o microscópio de análise de imagem.

Aos professores da Pós-graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo.

À funcionária da Pós-graduação, Eliane Araújo, sempre prestativa.

Aos meus colegas de Pós-graduação, pela amizade e momentos de descontração.

Aos cães e camundongos sacrificados para a realização do meu projeto.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização do meu projeto e crescimento pessoal.

À FAPESP pela bolsa de doutorado (Processo Nº 2010/16257-2) e a CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche (BEX 2021/13-7).

RESUMO

Pinho FA. Patogênese da pancitopenia na leishmaniose visceral canina e murina (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2014.

Pancitopenia é uma manifestação frequente na leishmaniose visceral (LV) cuja patogenia não é esclarecida. Neste estudo, a patogenia foi analisada em cão e camundongo com LV. Cães com LV, naturalmente infectados, sem coinfeção com erliquiose, foram classificados de acordo com as alterações hematimétricas em: pancitopenia, bicitopenia, citopenia e sem alterações hematológicas. O mielograma revelou um aumento na proporção mielóide:eritróide nos cães infectados em relação ao grupo controle. Havia mudanças no padrão morfológico e quantitativo nas células sanguíneas, particularmente na série eritróide em cães pancitopênicos. Na contagem diferencial, notou-se a diminuição da porcentagem de linfócitos, plasmócitos e monócitos que tinham correlação com a gravidade das alterações hematológicas. No exame histopatológico da medula óssea, observaram-se aumento na celularidade, hiperplasia megacariocítica, proliferação macrófagica e degeneração e/ou necrose. No estudo de fatores de crescimento e citocinas, o aumento da expressão de IFN- γ , GM-CSF, IL-7 e TNF- α parece assumir um papel importante nos cães bicitopênicos, e IL-3 nos cães com citopenia. A expressão de IGF-I, em contraste, estava diminuída significativamente em cães pancitopênicos em relação aos demais grupos. Os dados sugerem, portanto, a ocorrência de uma dishematopoiese com a diminuição da expressão de IGF-I na doença severa. Em camundongos C57BL/6 infectados por via intravenosa com *L. (L.) donovani*, as alterações hematológicas foram analisadas com 28 dias pós-infecção quando vimos o desenvolvimento de um quadro pancitopênico. O mielograma revelou displasia celular, aumento na proporção mielóide:eritróide e do índice de maturação mielóide, bem como, uma hipoplasia eritróide. Além disso, observamos um aumento significativo na porcentagem de linfócitos e macrófagos nos animais infectados. No exame histopatológico havia um aumento significativo da celularidade com infiltrado e/ou proliferação de células mononucleares similares a macrófagos. Na caracterização dessas células por microscopia confocal, estas expressavam F4/80, um marcador típico de macrófagos residentes e/ou estromais. Por citometria de fluxo, constatamos um aumento significativo na porcentagem de células F4/80+ em proliferação. Além disso, utilizamos outros marcadores expressos em macrófagos como CD169 e CD11b, e vimos que a população F4/80+CD169+CD11b+ estava diminuída nos camundongos infectados. Com base nesses dados, consideramos o camundongo C57BL/6 infectado por *L. (L.) donovani* um bom modelo para o estudo da dishematopoiese na LV e que os macrófagos estromais devam ter um papel importante, o que merece estudos futuros mais aprofundados.

Descritores: Leishmaniose visceral. Medula óssea. Fatores de crescimento. Cães. Camundongos. Pancitopenia.

ABSTRACT

Pinho FA. Pathogenesis of pancytopenia in the canine and murine visceral leishmaniasis (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2014.

Pancytopenia is a common manifestation in visceral leishmaniasis (VL) that may contribute to lethality. We assessed the factors involved in the pathogenesis of pancytopenia in canine and murine VL. We selected dogs with VL but without erlichiosis that were classified according to hematological alterations in: pancytopenia, bicytopenia, cytopenia and dogs infected without hematological changes. The myelogram revealed an increase in the myeloid:erythroid cell ratio in infected dogs compared with healthy dogs and changes in the morphological and quantitative patterns in hematopoietic cells, particularly in erythroid series of the pancytopenic dogs. In differential cell count, decrease in the percentage of lymphocytes, plasma cells and monocytes correlated with the severity of hematological changes. In the histopathological examination of the bone marrow, the main alterations were the increase in cellularity, megakaryocytic hyperplasia, macrophage proliferation and degeneration and/or necrosis. Addressing the growth factors and cytokines, increased expression of IFN- γ , GM-CSF, IL-7 and TNF- α seemingly plays an important role in bicytopenic dogs, and the expression of IL-3 in dogs with cytopenia. In contrast, pancytopenic dogs had a significant decrease in the IGF-I expression compared with other groups. The data suggest a dyshematopoiesis with participation of IGF-I in severe stage of disease. In *L. (L.) donovani*-intravenously infected C57BL / 6 mice hematological changes were evaluated at 28 days post-infection when pancytopenia was established. The bone marrow examination showed cellular morphological changes, an increase in myeloid:erythroid ratio and myeloid maturation index, and erythroid hypoplasia. Moreover, we observed a significant increase in the percentage of lymphocytes and macrophages in infected animals. In histopathological examination, we observed a significant increase in the cellularity accompanied by infiltration and/or proliferation of mononuclear cells resembling macrophages. We characterized these cells as F4/80+ cells by confocal microscopy, a typical marker of residents and/or stromal macrophages. Using flow cytometry, we found a significant increase in the percentage of F4/80 in proliferation. In addition, we used other macrophage markers such as CD169 and CD11b, when a reduction in F4/80+CD169+CD11b+ population was shown in infected mice. Based on these data, we may consider *L. (L.) donovani*-infected C57BL/6 mouse a good model for the study of dyshematopoiesis in VL and that stromal macrophage may have important role in the in the hematopoiesis that deserve further studies .

Descriptors: Visceral leishmaniasis. Bone marrow. Growth factors. Dogs. Mice. Pancytopenia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Correlação entre os níveis séricos de proteína total, globulina e albumina sérica, e o grau das alterações hematológicas dos cães com LV.....	43
Figura 2 –	Correlação entre porcentagem de células eritróides nucleadas maduras e o número absoluto de hemácias nos cães infectados e saudáveis.....	44
Figura 3 –	Correlação do índice de maturação eritróide e porcentagem de células eritróides nucleadas jovens em relação o grau das alterações hematológicas em cães com LV.....	46
Figura 4 –	Correlação da porcentagem de linfócitos, plasmócitos e monócitos em relação o grau das alterações hematológicas em cães com LV.....	47
Figura 5 –	Aspirado de medula óssea de cão com LV.....	48
Figura 6 –	Correlação entre a celularidade e grau de alterações hematológicas em cães com LV.....	49
Figura 7 –	Histopatologia de medula óssea.....	51
Figura 8 –	Correlação da expressão de IGF-I em relação o grau de alterações hematológicas em cães com LV.....	54
Figura 9 –	Correlação entre o nível de expressão de TNF- α e os níveis de expressão de GM-CSF e IL-3.....	55
Figura 10 –	Níveis séricos de IGF-I em cães infectados e cães saudáveis.....	55
Figura 11 –	Frequência de distribuição relativa dos níveis séricos de IGF-I em cães conforme perfil hematológico e cães saudáveis.....	56
Figura 12 –	Carga parasitária em medula de óssea de cães com LV conforme a gravidade das alterações hematológicas.....	57
Figura 13 –	Estratégia de <i>gate</i> utilizada para contagem de eritrócitos, reticulócitos e plaquetas.....	72
Figura 14 –	Estratégia de <i>gate</i> utilizada para contagem diferencial dos leucócitos de sangue periférico.....	75
Figura 15 –	Estratégia de <i>gate</i> utilizada para identificação e contagem de macrófagos estromais da medula óssea.....	79
Figura 16 –	Mielograma de camundongos infectados por <i>L. (L.) donovani</i>	82
Figura 17 –	Histopatologia do úmero de camundongos saudáveis (A) e camundongos infectados com <i>L. (L.) donovani</i>	83
Figura 18 –	Histopatologia de medula óssea.....	84
Figura 19 –	Expressão de F4/80 em medula óssea de camundongo saudável (esquerda) e camundongo infectado com <i>Leishmania donovani</i>	85
Figura 20 –	Distribuição de <i>L. (L.) donovani</i> em medula óssea de camundongo C57BL/6.....	85
Figura 21 –	Análise da expressão de F4/80, CD169, CD11b e Ki67 em macrófagos da medula óssea.....	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Sequência dos <i>primers</i> com tamanho do produto, número de acesso e temperatura de anelamento.....	35
Tabela 2 –	Perfil hematológico dos cães infectados por <i>L. (L.) infantum</i> e cães controles.....	39
Tabela 3 –	Perfil clínico de 24 cães com LV agrupados conforme quadro hematológico.....	40
Tabela 4 –	Perfil bioquímico dos cães infectados por <i>L. (L.) infantum</i> e cães controles.....	42
Tabela 5 –	Mielograma dos cães com LV conforme perfil hematológico e cães sadios.....	45
Tabela 6 –	Intensidade (escore) de alteração histopatológica de medula óssea de cães com LV com diferente perfil hematológico.....	50
Tabela 7 –	Expressão de fatores de crescimento e/ou citocinas em medula óssea de cães com LV conforme perfil hematológico e cães sadios.....	53
Tabela 8 –	Anticorpos utilizados na contagem de eritrócitos e plaquetas.....	70
Tabela 9 –	Anticorpos utilizados na contagem diferencial de leucócitos.....	74
Tabela 10 –	Anticorpos utilizados na identificação de macrófagos.....	77
Tabela 11 –	Alterações hematológicas observadas em camundongos infectados com <i>L. (L.) donovani</i>	80
Tabela 12 –	Mielograma dos camundongos sadios e camundongos infectados por <i>L. (L.) donovani</i>	81
Tabela 13 –	Porcentagem de macrófagos e suas subpopulações em medula óssea de camundongos sadios e camundongos infectados com <i>L. (L.) donovani</i>	86

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
	Leishmaniose visceral (LV).....	14
2.2	Leishmaniose visceral canina (LVC).....	16
2.3	Leishmaniose visceral em hamster e murina.....	18
2.4	Alterações hematológicas na LV.....	20
2.5	Alterações na medula óssea na LV.....	23
2.6	Hematopoiese e a participação de fatores de crescimento e/ou citocinas.....	24
2.7	Fator de crescimento insulina-símiles (<i>Insulin-like growth factor</i> – IGF).....	25
3	OBJETIVOS.....	29
4	PATOGÊNESE DA PANCITOPENIA EM CÃES COM LV.....	30
4.1	Objetivos específicos.....	30
4.2	Material e métodos.....	30
4.2.1	Animais.....	30
4.2.2	Considerações éticas.....	31
4.2.3	4.2.3 Diagnóstico diferencial de erliquiose por teste de imunofluorescência indireta (IFI).....	31
4.2.3.1	Reação de IFI	31
4.2.4	Exame hematimétrico.....	32
4.2.5	Exame bioquímico.....	32
4.2.6	Dosagem de IGF-I sérico.....	33
4.2.7	Mielograma.....	33
4.2.8	Exame histopatológico da medula óssea.....	33
4.2.9	Deteção e quantificação de mRNA de IGF-I, IL-7, IFN, TNF, IL-3 e GM-CSF.....	33
4.2.9.1	Purificação de RNA.....	34
4.2.9.2	Obtenção do cDNA.....	34
4.2.9.3	PCR em tempo real.....	35
4.2.10	Determinação da carga parasitária em medula óssea.....	35
4.2.10.1	Preparo das amostras.....	36
4.2.10.2	Construção da curva padrão para <i>Leishmania spp.</i>	36
4.2.10.3	Construção da curva-padrão com células mononucleares do sangue periférico de cães.....	37
4.2.11	Análise estatística.....	37
4.3	Resultados.....	37
4.3.1	Classificação dos cães com LV conforme alterações hematológicas....	38
4.3.2	Manifestações clínicas em cães com LV com diferente perfil hematológico.....	40
4.3.3	Perfil bioquímico dos cães com LV com diferente perfil hematológico.....	40
4.3.4	Mielograma em cães com LV com diferente perfil hematológico.....	43
4.3.5	Exame histopatológico de medula óssea em cães com LV com diferente perfil hematológico	49

4.3.6	Expressão de mRNA de fatores de crescimento e/ou citocinas em cães com LV com diferente perfil hematológico.....	52
4.3.7	IGF-I sérico em cães com LV com diferente perfil hematológico.....	55
4.3.8	Carga parasitária em cães com LV com diferente perfil hematológico	57
4.4	Discussão.....	57
4.5	Conclusão.....	68
5	PATOGÊNESE DA PANCITOPENIA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS POR <i>L. (L.) donovani</i>	69
5.1	Objetivos específicos.....	69
5.2	Material e métodos.....	69
5.2.1	Animais, infecção e coleta de amostras.....	69
5.2.2	Dosagem de hemoglobina.....	70
5.2.3	Contagem de eritrócitos, reticulócitos e plaquetas por citometria de fluxo.....	70
5.2.4	Contagem de leucócitos totais por microscopia óptica.....	72
5.2.5	Mielograma.....	76
5.2.6	Histopatologia de medula óssea.....	76
5.2.7	Identificação dos macrófagos estromais em medula óssea.....	76
5.2.8	Análise estatística.....	79
5.3	Resultados.....	79
5.3.1	Avaliação hematológica.....	79
5.3.2	Mielograma.....	81
5.3.3	Exame histopatológico.....	83
5.3.4	Identificação dos macrófagos estromais em medula óssea.....	84
5.4	Discussão.....	88
5.5	Conclusão.....	94
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96
	APENDICE.....	113
	ANEXO.....	115

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade infecciosa grave, que acomete o sistema fagocítico mononuclear e que pode ser letal ao hospedeiro, causada essencialmente por protozoários das espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*, esta última prevalente no Brasil. A pancitopenia é uma manifestação importante na LV e que pode contribuir na letalidade. Classicamente, o hiperesplenismo é a principal causa atribuída a essa alteração, no entanto, alguns estudos já vêm demonstrando que a mesma pode estar relacionada a mudanças de proliferação e/ou diferenciação de células hematopoiéticas na medula óssea em decorrência da infecção.

A medula óssea é o principal órgão hematopoiético e que pode ser acometido pela infecção por *L. (L.) infantum*. Mesmo que a pancitopenia seja caracterizada como consequência do hiperesplenismo, não se sabe ao certo que mecanismos estão relacionados a esse achado durante a hematopoiese. Tanto em humanos e cães com LV observaram-se alterações mielodisplásicas na medula óssea na série mielóide e eritróide. Em modelo murino, observou-se a expansão mielóide na medula óssea e baço associada ao aumento da expressão de TNF- α , IFN- γ , GM-CSF e IL-3.

Um grupo de fatores de crescimento e citocinas, produzidos pelas células estromais, são cruciais para a proliferação e diferenciação dos precursores celulares hematopoiéticos, tais como os fatores estimuladores de colônia (*colony-stimulating factors-CSFs*), IL-3, IL-4, IL-11 e IL-7. No entanto, outros fatores de crescimento também podem participar ativamente desse processo como o fator de crescimento insulina-símile-I (*Insulin-like growth factor-I – IGF-I*).

Evidências sugerem que IGF-I afeta a homeostasia do sistema imune por aumentar linfopoiese, granulopoiese, proliferação celular e sobrevivência celular. O IGF-I tem se mostrado um importante promotor do crescimento de células hematopoiéticas *in vitro*, mas o papel de IGF-I endógeno na hematopoiese ainda não está claro.

Com base no exposto, a proposta do meu projeto de doutorado foi estudar a patogênese da pancitopenia na LV canina focando inicialmente na análise das alterações hematológicas e da medula óssea e a possível contribuição de várias citocinas e fatores de crescimento, com ênfase no IGF-I no quadro pancitopênico. Além disso, essa mesma

abordagem aplicada em modelo murino com ênfase na caracterização das células estromais da medula óssea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose visceral (LV)

As leishmanioses são consideradas umas das principais causas de doenças infecciosas parasitárias, ocupando a nona posição no ranque mundial (Hotez et al., 2004; Hotez et al., 2006). Várias espécies do protozoário *Leishmania* spp. causam a infecção e mantêm seu ciclo biológico no inseto vetor e no hospedeiro mamífero (Kaye e Scott, 2011). Algumas espécies de *Leishmania* spp. causam doenças restritas a pele e mucosas, conhecidas como leishmaniose cutânea, mucocutânea e/ou cutânea disseminada (Goto e Lauletta Lindoso, 2012). Já outras espécies de *Leishmania* spp. atingem outros órgãos como fígado, baço e medula óssea causando a LV (Tafuri et al., 2001; Malla e Mahajan, 2006). São endêmicas em 90 países e três territórios, em cinco continentes, sendo um total de casos notificados em torno de 58.000 de LV e de 220.000 de leishmaniose cutânea, por ano (Alvar et al., 2012).

A LV ocorre em mais de 70 países dos cinco continentes com exceção da Austrália e Antártica, sendo que 90% dos casos concentram-se em cinco países: Índia, Bangladesh, Brasil, Nepal e Sudão (Alvar et al., 2012). Em 1913 foi reportado o primeiro caso de LV no Brasil em um paciente de Boa Esperança, Mato Grosso (Migone, 1913). A doença era considerada predominantemente rural, mas desde a década de 80, a LV vem se expandido para grandes centros urbanos, atingindo mais de 1.200 municípios em 21 estados brasileiros (Werneck, 2010).

Entre 1980 a 2008, mais de 70.000 casos foram registrados no Brasil, com 3.800 mortes. A média de número de casos por ano aumentou de 1.601 (1985-1989) para 3.630 (2000-2004), com estabilização até o presente. Até a década de 90, 90% dos casos concentravam-se na região Nordeste, mas em 2007 a proporção declinou para 50%. A primeira epidemia em um centro urbano foi na cidade de Teresina, Piauí, depois outros casos foram registrados em Natal (Rio Grande do Norte) e São Luis (Maranhão) (Werneck, 2010). Entre 1999 a 2009, 1.369 casos foram registrados em Teresina com uma prevalência de 16,34 casos/100.000 habitantes (Drumond e Costa, 2011).

As primeiras descrições dos sinais clínicos da LV surgiram a partir de 1835 na Grécia (Gkolfinopoulou et al., 2013), mas foi somente em meados de 1900 que identificou-se o agente causador denominando-o como *Leishmania donovani* (Ross,

1903). Atualmente, sabe-se que a LV é uma doença sistêmica causada essencialmente por duas espécies de *Leishmania* spp, *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (Mauricio et al., 2000; Lukes et al., 2007). Em situações excepcionais, ocorre visceralização de outras espécies causadoras de leishmaniose cutânea, sendo os casos mais frequentes aqueles promovidos por *Leishmania tropica* no Oriente Médio, e *Leishmania amazonensis* na América do Sul (van Griensven e Diro, 2012).

A transmissão da *Leishmania* ocorre durante o repasto sanguíneo realizado pela fêmea do flebotomíneo do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Lainson e Shaw, 1987). Com base nas características de transmissão, esta pode ser de dois tipos: zoonótica ou antroponótica. A forma zoonótica acontece no Mediterrâneo, China, Oriente Médio e América do Sul, sendo o cão considerado o principal reservatório da doença no ambiente urbano, e a espécie causadora, *L. (L.) infantum*. Já a forma antroponótica, transmitida homem-homem, é encontrada principalmente no Leste da África, Bangladesh, Índia e Nepal sendo causada por *L. (L.) donovani* (Lainson e Shaw, 1987; Lukes et al., 2007). Entretanto, em situações esporádicas, outros fatores são apontados na transmissão da *Leishmania* como transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita e acidentes de laboratório (Meinecke et al., 1999; Cruz et al., 2002; Dey e Singh, 2006; Antinori et al., 2008).

A *Leishmania* spp apresenta-se sob duas formas distintas durante o seu ciclo biológico: promastigota e amastigota. A forma promastigota é encontrada no inseto vetor e a forma amastigota é encontrada intracelularmente no hospedeiro mamífero, sendo estas originárias das formas promastigotas inoculadas pelo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (Killick-Kendrick, 1990). Os parasitos infectam células, principalmente, aquelas pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear acometendo vários órgãos como baço, medula óssea, fígado e linfonodos (Michel et al., 1988; Tafuri et al., 2001). Na patogênese da LV, os fatores determinantes da progressão da doença após a infecção primária parecem estar relacionados a virulência parasitária, estado nutricional, idade e fatores genéticos (Badaro et al., 1986) e alterações de níveis de lipoproteínas (Carvalho et al., 2014).

A média do período de incubação após a infecção primária, até o aparecimento dos primeiros sintomas, é em torno de dois a seis meses, podendo variar de semanas a

anos. Alguns estudos relatam em áreas de alta endemicidade na Índia, que na maioria dos casos a doença não se manifesta em até 30% dos indivíduos e, mas no Brasil pode chegar em 90%. Aqueles que desenvolvem LV em sua forma plena, em geral, apresentam febre, perda de peso e organomegalia por meses, sendo que quando não tratada é quase sempre fatal (Badaro et al., 1986; Herwaldt, 1999; van Griensven e Diro, 2012).

Diferentes mecanismos estão envolvidos na resposta imune na LV. Na LV humana foi reportado níveis plasmáticos elevados de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IFN- γ e TNF- α (Ansari et al., 2006; Kurkjian et al., 2006). Foi visto que as células mononucleares do sangue periférico geralmente não proliferam ou não produzem IFN- γ em resposta a antígenos de *Leishmania* (Sacks et al., 1987; White et al., 1992). Mas, níveis elevados de mRNA de IFN- γ tem sido encontrado em baço e medula óssea durante a fase aguda da infecção (Nylen e Sacks, 2007). Outra citocina implicada na patogênese da LV é a IL-10, a qual pode ser detectada em culturas de sangue total de humanos com LV quando estimulados com antígenos de *Leishmania* (Ansari et al., 2011). A IL-10 tem sido implicada na regulação negativa da resposta imune por inibir a atividade leishmanicida exercida pelo macrófago (Ghalib et al., 1995; Nylen et al., 2007).

O diagnóstico da LV baseia-se em exame parasitológico, sorológico e/ou molecular. O exame padrão-ouro consiste na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp em aspirados de medula óssea, linfonodos e/ou baço (Sundar, 2002). Atualmente, dois testes sorológicos vem sendo aplicados para uso no campo: o teste de aglutinação direta (*direct agglutination test* - DAT) e o teste imunocromatográfico usando o antígeno rK39 (Boelaert et al., 2004). Para o tratamento de LV as drogas mais utilizadas são antimoniais pentavalentes e anfotericina B. O grande problema do uso dessas drogas está relacionado ao custo, toxicidade, duração do tratamento, via de inoculação e/ou desenvolvimento de resistência parasitária (Roberts, 2005). A produção de uma vacina efetiva seria uma alternativa para o controle de LV, no entanto, mesmo com diferentes estudos abordando os diferentes aspectos imunológicos ainda não se conseguiu desenvolver um protótipo vacinal com ênfase na profilaxia e/ou terapêutica que seja eficiente no combate dessa doença (Kumar e Engwerda, 2014).

2.2 Leishmaniose visceral canina (LVC)

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica e altamente prevalente, em torno de 63-80% na população canina (Berrahal et al., 1996; Solano-Gallego et al., 2001; Leontides et al., 2002). O cão tem um papel importante na cadeia epidemiológica sendo considerado o principal reservatório da doença no ambiente peri-urbano e urbano, por ser susceptível e apresentar alto parasitismo cutâneo (Molina et al., 1994; Giunchetti et al., 2006). Estima-se que em torno de 2,5 milhões de cães estejam infectados no sudoeste da Europa, e na América do Sul, o número também é estimado em milhões com uma alta taxa de infecção em áreas da Venezuela e do Brasil (Moreno e Alvar, 2002; Ferroglio et al., 2005; Werneck, 2010).

A LVC foi primeiramente descrita na Tunísia em 1908, onde demonstrou-se a importância do cão como reservatório (Nicolle e Comte, 1908). No Brasil, a detecção do parasito na pele de cão foi em 1955, sendo que o seu papel na transmissão da *Leishmania (L.) infantum* foi comprovada quando se revelou índices de 75% de infecção em *Lutzomyia Longipalpis* que se alimentaram de cães doentes (Deane e Deane, 1955; deane e Deane, 1962). A prevalência da LVC no território brasileiro é alta em áreas endêmicas, chegando a atingir 63-80% da população canina (Berrahal et al., 1996; Solano-Gallego et al., 2001; Leontides et al., 2002). Em Teresina, Piauí, cidade endêmica para LV, entre 1999 e 2009 foram registrados 20.969 casos de cães infectados, com prevalência de 19,27 casos/1000 cães (Drumond e Costa, 2011).

O espectro patológico da LVC é semelhante à da doença humana, o que torna seu estudo relevante para compreensão da patogenia das diversas manifestações no homem. Alguns trabalhos relatam que o desenvolvimento da doença em cães depende da raça, idade e fatores genéticos. Por exemplo, algumas raças de cães como Boxer, Cocker Spaniel, Rottweiler e German Sheperd são mais susceptíveis a infecção, enquanto que outras raças como Ibizaian Hound quase nunca desenvolvem sinais clínicos de LVC (Solano-Gallego et al., 2000; Franca-Silva et al., 2003).

De acordo com o grupo europeu LeishVet, a análise conjunta dos parâmetros clínico-laboratoriais e o título de anticorpos são essenciais para definição do prognóstico dos cães com LV (Solano-Gallego et al., 2011). Em geral, os sinais mais frequentes na LVC são: febre, dermatopatias, esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatias, e, na fase final da infecção ocorrem, em geral, paraparesia, caquexia, inanição e óbito do animal. Dentre as alterações laboratoriais têm-se as alterações

hematológicas, principalmente, anemia na maioria dos casos, hiperglobulinemia e lesões renais e/ou hepáticas (Ciaramella et al., 1997; Almeida et al., 2005; Reis et al., 2006).

A imunopatogênese da LVC é dependente do perfil de resposta imunológica associada ao perfil celular Th1/Th2. Foi visto que cães infectados apresentam uma falha na resposta linfoproliferativa e uma redução no número de células T CD4⁺ (Bourdoiseau et al., 1997; Moreno et al., 1999; Guarga et al., 2000). Além disso, os macrófagos infectados desses animais são deficientes em moléculas co-estimulatórias, o que leva a um comprometimento da interação com as células T e consequente inibição de uma resposta imune efetora com produção de IFN- γ que induz a ativação macrofágica (Pinelli et al., 1999). Outro elemento importante é a participação de linfócitos T CD8⁺ que parecem atuar na resposta protetora contra a infecção (Reis et al., 2006).

O controle da LV canina é essencial para combater a expansão da doença, mas ainda representa um grande desafio para as autoridades sanitárias, pela complexidade do diagnóstico da LVC, particularmente, na fase mais precoce da infecção. Existe uma grande variedade de métodos para diagnóstico da LVC, no entanto, o Ministério da Saúde recomenda o uso dos seguintes testes sorológicos: DPP® (teste imunocromatográfico que contém os antígenos recombinantes rK39) como triagem, e teste imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay* = ELISA) utilizando antígenos totais de *Leishmania major-like* como teste confirmatório, ambos produzidos pelo Instituto de Biotecnologia Bio-Manguinhos. Atualmente, somente o rK39 está sendo disponibilizado. Na rotina clínica veterinária, o exame parasitológico constitui-se ainda no padrão-ouro para o diagnóstico da LVC (Faria e Andrade, 2012).

No Brasil, duas vacinas foram registradas para uso nos cães, mas sem aplicação em saúde pública. São elas a Leishmune® e a Leish-Tec®, sendo que atualmente, somente a Leish-Tec® tem autorização oficial para comercialização. Além de não se conhecer ainda a eficácia da proteção vacinal a longo prazo, um dos grandes problemas no uso dessas vacinas é a impossibilidade da distinção dos testes sorológicos positivos resultantes de vacinação ou de infecção natural. A falta de uma terapêutica comprovadamente eficaz e de uma vacina aplicável à saúde pública ainda são um dos grandes problemas para o combate da doença (Brasil, 2011; Grimaldi et al., 2012).

2.3 LV em hamster e murina

A leishmaniose visceral experimental tem sido largamente utilizada para o estudo dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na resistência e/ou susceptibilidade, durante a infecção por *L. (L.) donovani* e/ ou *L. (L.) infantum* (Kumar e Nylen, 2012). O cão é um dos modelos animais mais relevantes nesse tipo de abordagem, entretanto, devido a custo elevado e até mesmo questões éticas, muitos trabalhos são desenvolvidos em roedores como hamsteres e camundongos (Alvar et al., 2004).

Os hamsteres são animais que desenvolvem um quadro patológico similar ao homem e cão, no entanto, existem algumas limitações no uso desse modelo animal pela carência de marcadores essenciais para a análise dos componentes imunológicos. Além disso, os hamsteres apresentam uma susceptibilidade inata que limita quando se quer avaliar a resposta imune protetora. No entanto, é um modelo extremamente relevante, principalmente, para testes de drogas (Kumar e Nylen, 2012). No hamster com LV, o parasito atinge baço, fígado e medula óssea causando alterações graves, e assimcaminhar para um quadro fatal. Assim como em humanos, a presença em hamsteres de níveis elevados de TGF- β e de IL-10 contribui para a sobrevivência e persistência do parasito (Melby et al., 2001) com produção diminuída de óxido nítrico (Perez et al., 2006).

O camundongo é um modelo animal largamente utilizado em diversos estudos na LV. Nesses animais, o quadro patológico pode resultar em cura e/ou progressão da doença, dependendo da linhagem estudada. Por exemplo, já foi demonstrado que camundongos CBA têm um gene *Slc11a1* funcional que codifica um componente fagossomal que promove o controle inicial do crescimento do parasito independente dos mecanismos imunológicos adquiridos (Crocker et al., 1984; Blackwell et al., 1989). Esse perfil não é observado em linhagens suscetíveis como C57BL/6 e BALB/c que tem uma mutação nesse gene. Vale destacar, que mesmo nessas linhagens suscetíveis após 3-4 semanas pós-infecção, esses animais são capazes de controlar a infecção por resposta imune adquirida determinada por haplótipos do complexo principal de histocompatibilidadede classe II (Blackwell, 1983; Crocker et al., 1984; Vidal et al., 1995).

Em camundongos quando infectados por *L. (L.) donovani* ou *L. (L.) infantum* observa-se uma resposta imune compartimentalizada, como já bem caracterizada em fígado e baço (Kumar e Nylen, 2012). Assim, os camundongos quando desafiados, os

parasitos se multiplicam rapidamente no fígado em poucas semanas, sendo que na fase mais tardia da infecção, esse órgão desenvolve uma resposta imune celular eficiente com formação de granulomas funcionais tornando-se resistentes inclusive a reinfecções (Murray et al., 1987). No baço, a resposta imune é limitada com persistência do parasitismo resultando em esplenomegalia e remodelamento da arquitetura esplênica com atrofia de folículos linfóides. A infecção também é controlada no baço, mas o parasito é mantido a níveis constantes e por um período de infecção maior quando comparado à infecção no fígado (Engwerda et al., 2004).

A utilização dos modelos animais na LV dependerá da abordagem do estudo considerando todos os elementos imunológicos que determinam a suscetibilidade e/ou resistência à infecção.

2.4 Alterações hematológicas na LV

Na LV, as alterações hematológicas são frequentes tanto em pacientes, como cães e hamsteres (Biswas et al., 1992; Ciaramella et al., 1997; Varma e Naseem, 2010). Muitos trabalhos apontam a anemia como o achado mais importante, no entanto, a trombocitopenia e a leucopenia podem surgir durante a progressão da doença, levando ao quadro pancitopênico. A gênese das alterações hematológicas ainda não é muito bem compreendida, apesar de terem descrições clássicas na literatura (Cartwright et al., 1948; al-Jurayyan et al., 1995).

A anemia normocítica normocrômica aparece desde a fase inicial da infecção, em torno de 50-70% na LVC e em até 90% dos casos na LV ativa humana (Amusategui et al., 2003; Queiroz et al., 2004). Vários fatores têm sido implicados na sua patogênese, em pacientes. Alguns estudos descrevem que o sequestro esplênico e alterações na permeabilidade da membrana do eritrócito podem levar a destruição das hemácias. Outros relatos que avaliaram a sobrevivência das hemácias e a cinética do ferro sugerem que a hemólise seja a principal causa da anemia na LV. A hiperplasia reticuloendotelial com retenção de ferro nos macrófagos, aumento da sensibilidade ao complemento e produção de hemolisina pelo parasito também podem estar envolvidos na anemia (Woodruff et al., 1972; Pippard et al., 1986). Em cães, estudos relatam que hemólise, sequestro de eritrócitos no baço, hemorragias, diminuição da fluidez lipídica da membrana dos eritrócitos e/ou mudanças nos mecanismos de citoaderência nos

receptores ligantes de eritrócitos no baço, eritropoiese inefetiva, falha renal crônica, perda de sangue e mecanismos auto-imunes podem participar da anemia severa na LVC (Keenan et al., 1984; Koutinas et al., 1999; De Luna et al., 2000). Além disso, investigações em hamsteres infectados com *L. (L.) donovani* demonstraram que a anemia pode ser devida à inibição da eritropoiese em decorrência de citocinas que induziam apoptose dos eritroblastos (Lafuse et al., 2013).

A leucopenia é considerada uma alteração importante na LV humana. Vários estudos demonstraram que 75% dos pacientes tem diminuição no número de leucócitos no sangue periférico, mas a maioria deles não deixa claros os mecanismos envolvidos na gênese dessa citopenia (Marwaha et al., 1991). Em geral, a principal causa da leucopenia tem sido atribuída ao hiperesplenismo (Cartwright et al., 1948). O oposto é observado na LVC, a leucopenia é um evento menos frequente, sendo que os poucos trabalhos que descrevem essa alteração em cães com LV citam uma leucopenia branda em 22% dos casos (Ferrer, 1992; Slappendel, 1988; Binhazim et al., 1993) e uma inversão da contagem de leucócito, devido a um aumento de linfócitos e uma queda no número de neutrófilos (Binhazim et al., 1993). Segundo Alvar et al. 2004, a leucopenia em cães com LV tem causas multifatoriais como disfunção medular com diminuição na hematopoiese ou recrutamento de leucócitos para outros órgãos afetados pela infecção. Além disso, citocinas supressoras também podem ter um papel importante nessa alteração (Pinelli et al., 1994, 1995).

A trombocitopenia é vista tanto em pacientes e cães, mas com uma frequência variável entre as espécies. Na LV humana observa-se em até 65-90% dos pacientes com LV ativa, e em cães em torno de 29,3% dos casos (Marwaha et al., 1991; Ciaramella et al., 1997; Petanides et al., 2008). Em humanos com LV, o sequestro esplênico é considerada a principal causa da diminuição de plaquetas no sangue periférico (Varma e Naseem, 2010), sendo que o hiperesplenismo e a deficiência na formação de plaquetas também podem levar a esse quadro hematológico (Dameshek e Miller, 1946). Na LVC, a plaquetopenia pode ser resultado de alterações no endotélio pela vasculite, esplenomegalia, alterações na trombocitopoiese ou um aumento na destruição plaquetária e/ou falha renal e hepática (Ferrer, 1992; Ciaramella et al., 2005).

A pancitopenia é uma redução global das células no sangue periférico que quando presente nos casos ativos de LV pode contribuir para o agravamento da doença, levando a alterações no sistema imune, deficiência na suplementação de oxigênio e

consequente disfunção sistêmica (Kar e Ghosh, 2002). Na Índia, em pacientes com LV, a pancitopenia é bem descrita tendo uma frequência em torno 57,8-88% dos casos (Marwaha et al., 1991; Agrawal et al., 2013). No Brasil, parece ser uma alteração importante, mas não encontramos nenhum dado consolidado centrado em casos humanos com pancitopenia, embora alguns trabalhos demonstrem que em torno de 90% dos pacientes desenvolvem anemia, 85% leucopenia e 68,4% trombocitopenia (Queiroz et al., 2004). Em cães, a anemia e a trombocitopenia são as alterações mais frequentes. (Ciaramella et al., 1997).

Na LV, uma das principais teorias sobre a causa da pancitopenia é o hiperesplenismo e este caracteriza-se por hiperplasia do sistema fagocítico mononuclear, acompanhada de anemia, leucopenia, trombocitopenia e hiperplasia da medula óssea (Cartwright et al., 1948). No entanto, outros estudos relatam que mielodisplasia e hemofagocitose podem ser fatores responsáveis pela manifestação pancitopênica (Yarali et al., 2002).

A mielodisplasia não clonal pode estar relacionada a uma alta produção de TNF- α , e que pode ser a responsável pela pancitopenia juntamente com hiperesplenismo, hemólise e hiperplasia reticuloendotelial com retenção de ferro na LV (Yarali et al., 2002). Outros estudos demonstram em pacientes com LV que, além de TNF- α , IFN- γ pode contribuir para essa alteração medular (Zoumbos et al., 1991; Kitagawa et al., 1997; Stasi et al., 1997). Em cães, observam-se altos níveis de TNF- α e IFN- γ relacionados possivelmente a síndromes mielodisplásicas, em conjunto com outras citocinas proapoptóticas (Walton et al., 1996).

Khodke et al. (2001) avaliando 50 pacientes com pancitopenia, observaram que 14% dos doentes estavam com LV e todos com estoque de ferro normal e sem evidências de hiperesplenismo.

Shahriar et al. (1998) sugerem que o decréscimo na linfopoiese e da série granulocítica na LV estejam relacionados a liberação de um fator supressor de GM-CSF liberado durante o rompimento do vacúolo parasitóforo de macrófagos infectados por *Leishmania*. A lise ocorre pela ação de uma cisteína proteinase que age no conteúdo granular levando a essas alterações, assim, induzindo a síndrome pancitopênica.

As possíveis causas da pancitopenia estão, aparentemente, relacionadas a desregulação do processo hematopoiético. As alterações na hematopoiese são comuns em doenças infecciosas experimentais em geral, entretanto, poucos estudos têm

direcionado aos mecanismos envolvidos nas alterações da função hematopoiética ou avaliação da ação direta de agentes infecciosos nas células que regulam esse processo (Cotterell et al., 2000).

2.5 Alterações na medula óssea na LV

As alterações hematológicas são descritas há muitos anos na LV (Cartwright et al., 1948), sendo estas consideradas importantes marcadores na detecção dos casos mais avançados da doença (Reis et al., 2006). Muitos fatores já foram relatados na literatura como responsáveis pelas citopenias periféricas, no entanto, poucos trabalhos exploram o principal órgão relacionado ao processo hematopoiético, a medula óssea. Somente nos últimos anos, pesquisadores vêm despertando interesse nesse órgão, seja em pacientes, cães ou em modelos experimentais com LV (Lafuse et al., 2013; Nicolato et al., 2013; Momo et al., 2014; Temiz et al., 2014).

Sabe-se que a medula óssea é um órgão hematopoiético primário e um alvo para a proliferação de leishmânias. Logo, a infecção por este parasito pode causar perturbações na homeostasia do processo hematopoiético que consequentemente pode induzir alguma citopenia periférica (Tropia de Abreu et al., 2011). Na LV humana, estudos focados na análise de aspirados de medula óssea revelaram que os achados mais comuns são: hiperplasia eritróide, aumento de plasmócitos e fagócitos mononucleares (Daneshbod et al., 2010). As células eritróides podem apresentar megaloblastose moderada a severa, e na série granulocítica e megacariocítica, alguns autores viram em alguns casos um aumento no número das células imaturas, mas sem alterações morfológicas (Kumar et al., 2007). Em contrapartida, um estudo realizado por (Yarali et al., 2002) e (Kopterides et al., 2003) mostra alterações displásicas tanto em células mielóides quanto em megacariócitos. Além disso, graus variáveis de eritrofagocitose e leucofagocitose, e reação granulomatosa têm sido descritas (Kumar et al., 2007; Chandra et al., 2013). Em geral, estudos relatam diseritropoiese e mielodisplasia em medula óssea de pacientes com LV. No exame histopatológico os principais achados foram hipercelularidade, presença de granulomas, fibrose, nódulos linfóides e necrose (Dhingra et al., 2010).

Em cães com LV, alguns estudos vêm demonstrando alterações patológicas no mielograma como hiperplasia mielóide com aumento de precursores de neutrófilos e

granulócitos, aumento de macrófagos, monócitos, plasmócitos e células de Mott, alterações envolvendo a série vermelha (eritrofagocitose, hipoplasia eritróide e displasia) e displasia megacariocítica (Anosa e Idowu, 1983; Yamaguchi et al., 1983; Foglia Manzillo et al., 2006). Outros pesquisadores demonstraram ainda que a hipoplasia eritróide em cães sintomáticos com LV foi decorrente da diminuição da quantidade de eritroblastos ortocromáticos (Tropia de Abreu et al., 2011). Por fim, um estudo recente demonstrou a importância das alterações na medula óssea e no hemograma nos cães com LV, o qual revelou uma diminuição da linhagem eritróide e diminuição de eosinófilos na medula óssea levando a anemia e leucopenia observada no sangue periférico desses animais (Nicolato et al., 2013). Na análise histopatológica, a presença de granulomas, displasia megacariocítica e aplasia medular foram os principais achados descritos na literatura em cães com LV (Momo et al., 2014).

2.6 Hematopoiese e a participação de fatores de crescimento e/ou citocinas

A hematopoiese consiste em processo responsável pela formação das células sanguíneas, onde há a necessidade de um microambiente capaz de reconhecer e reter células-tronco hematopoiéticas e fornecer os fatores de crescimento e/ou citocinas, necessários para apoiar a proliferação, diferenciação e maturação das células (Travlos, 2006).

Para que a produção de células sanguíneas aconteça adequadamente, diferentes fatores de crescimento e/ou citocinas participam desse processo (Metcalf, 1993). Os fatores estimuladores de colônia (*colony-stimulating factors*-CSFs) formam um grupo de citocinas de baixo peso molecular (18-90 kDa) que regulam a proliferação e diferenciação de células progenitoras da linhagem mielóide, *in vitro* e *in vivo* (Donahue et al., 1986; Metcalf, 1986; Metcalf et al., 1987). Os CSFs podem ser fatores estimuladores de granulócitos (G-CSF), macrófagos (M-CSF) ou ambos (GM-CSF). Outros conhecidos como multi-CSF (IL-3, IL-13) induzem a formação de colônias contendo células de diferentes linhagens (Cheers et al., 1988). Funcionalmente, CSFs são conhecidos por desencadear ou ativar respostas imunes que incluem aderência, quimiotaxia, atividade da explosão respiratória, citotoxicidade e aumento na síntese de várias citocinas como interferon, TNF- α e IL-1 (Grabstein et al., 1986; Warren e Ralph, 1986; Metcalf et al., 1987; Heidenreich et al., 1989).

Outras citocinas também podem participar da hematopoiese como IL-4, IL-7 e IL-11. A IL-4 pode ter função reguladora múltipla por atuar na proliferação e diferenciação das células progenitoras sinergicamente com outros fatores de crescimento como G-CSF, M-CSF e eritropoietina (Broxmeyer et al., 1988; Vellenga et al., 1990). No entanto, pode ter ação antagônica à formação de colônias dependente de IL-3 (Rennick et al., 1987; Vellenga et al., 1990) e formação de colônias de macrófagos estimuladas por IL-3 e M-CSF (Sonoda et al., 1990), por GM-CSF (Vellenga et al., 1990) ou por M-CSF (Jansen et al., 1989). IL-7 é uma citocina que tem um papel central na linfopoiese por agir como fator de crescimento e ter efeito antiapoptótico (Hofmeister et al., 1999). No entanto, alguns estudos em camundongos vêm demonstrando que IL-7 pode induzir mielopoiese e eritropoiese (Aiello et al., 2007). IL-11 é um fator de crescimento derivado do estroma da medula óssea e que pode estimular células murinas mielóides e linfóides tanto *in vitro* como *in vivo*. Keller et al. (1993) observaram que em medula óssea de humanos, IL-11 estimula mais a diferenciação, embora multipotencial, de células progenitoras.

A participação dessas citocinas na patogênese das alterações hematológicas na LV ainda não está clara, particularmente, na LV canina. Alguns estudos em modelos murinos com *L. (L.) donovani* mostram que a atividade hematopoiética está aumentada no baço e medula óssea devido à regulação desse processo por fatores de crescimento e/ou citocinas. Observou-se que ocorre nesses órgãos um aumento de células precursoras associado a um aumento na produção de GM-CSF, M-CSF e G-CSF, dependente de células T (Cotterell et al., 2000a). Outros estudos demonstraram que macrófagos estromais medulares infectados por *Leishmania* aumentam seletivamente a mielopoiese por uma produção excessiva de GM-CSF e TNF- α (Cotterell et al., 2000b). Além disso, o aumento da mielopoiese nos estágios tardios da infecção por *Leishmania major* em camundongos BALB/c provavelmente ocorra em consequência da alta produção de IL-3 produzida por células do perfil Th2 (Mirkovich et al., 1986; Lelchuk et al., 1988).

2.7 Fator de crescimento insulina-símiles (*Insulin-like growth factor* – IGF)

O fator de crescimento insulina-símile (*Insulin-like growth factor* – IGF)-I tem se mostrado um importante promotor do crescimento de células hematopoiéticas *in vitro*

e *in vivo* (Ratajczak et al., 1994), mas o seu papel endógeno na hematopoiese ainda não está claro (Welniak et al., 2004).

Os IGFs são polipeptídeos filogeneticamente bem preservados, com massa molecular de 7,5 kDa, sendo conhecidas duas formas principais: IGF-I e -II, que apresentam 60% de similaridade na sequência de resíduos de aminoácidos. Estão presentes na circulação e na maioria dos tecidos; são sintetizados pela maioria das células, mas, principalmente, pelos hepatócitos. No soro e nos tecidos a maior parte desses fatores encontra-se ligada às proteínas ligantes de IGF (“IGF-binding proteins” = IGF-BPs). IGF-I e -II interagem com receptores de superfície (IGF-IR e IGF-IIR), presentes nas células da maioria dos tecidos. O IGF-IR é o que apresenta funções mais definidas e importantes no processo biológico (Humbel, 1990; Jones e Clemmons, 1995).

Embora IGF-I seja considerado um regulador sistêmico do crescimento tecidual, alguns trabalhos vêm demonstrando o seu papel local no crescimento celular (Yakar et al., 1999). De acordo com Rodriguez-Tarduchy et al. (1992), IGF-I pode induzir a sobrevivência e proliferação de precursores hematopoiéticos dependentes de IL-3 *in vitro* na ausência de IL-3. Welniak et al. (2004) ao avaliarem o papel sistêmico de IGF-I, viram em camundongos *knockout cre-lox* para IGF-I no fígado, que ocorre uma diminuição de precursores mielóides no baço ao contrário do observado na medula óssea e, que, ao administrar IGF-I exógeno essa diminuição é restaurada. Assim, mostrando que o IGF-I sistêmico tem um papel importante na hematopoiese esplênica ao contrário da medula óssea.

Alguns trabalhos demonstram que o eixo GH/IGF estimula a eritropoiese (Halvorsen e Bechensteen, 2002), em particular quando os níveis de eritropoietina estavam baixos ou ausentes (Boyer et al., 1992). Em pacientes que sofrem da síndrome de Laron (insensibilidade primária ao GH) e recebem IGF-I, observou-se um forte efeito estimulatório na eritropoiese (Sivan et al., 2003). A linhagem monocítica é também influenciada pelo eixo GH/IGF, observando-se *in vitro* uma proliferação de macrófagos derivados da medula óssea quando da administração exógena de IGF-I (Long et al., 1998).

Além disso, tem-se mostrado que IGF-I sinergiza com IL-1 para aumentar a proliferação celular em precursores de células da linhagem mielóide e linfócito pró-B, (Soon et al., 1999), bem como com IL-7 induzindo a proliferação de células pró-B

(Gibson et al., 1993). Nesses mesmos precursores de células da linhagem mielóide, uma vez ativado o receptor de IGF-I, em algumas condições, pode ocorrer diferenciação granulocítica similar sob a ação do fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) (Valentinis et al., 1999).

O sistema IGF é bastante complexo pelas suas ações biológicas exercidas em diferentes tipos celulares e os diferentes mecanismos que modulam a sua função seja ela sistêmica ou local (Cohick e Clemmons, 1993). Tem-se demonstrado que citocinas como TNF- α e IFN- γ agem no processo regulatório do IGF-I, particularmente, na expressão de seus ligantes e dos seus receptores (Arkins et al., 1995; Fan et al., 1995). Shalita-Chesner et al. (2001) demonstraram que ambas citocinas TNF- α e IFN- γ , em linhagem celular tumoral (sarcoma osteogênico), suprimem a expressão de IGF-IR resultando em uma diminuição significativa nos níveis de mRNA do IGF-IR e a proteína. A regulação da expressão do IGF-IR tanto a nível transcricional quanto pós-transcricional pode ser um mecanismo potencial em que TNF- α e IFN- γ tenham efeito na proliferação celular (Shalita-Chesner et al., 2001).

IGF-I vem sendo bastante estudado pelo grupo da profa. Hiro Goto, particularmente em infecções experimentais.

Nas leishmanioses, comparando as concentrações de IGF-I no soro de pacientes com as formas cutânea, muco-cutânea e disseminada, foi observado que nesses indivíduos dos dois últimos grupos, os níveis de IGF-I eram significativamente menores em relação ao grupo controle. De modo semelhante, também, foi observado que pacientes com LV ativa apresentavam níveis séricos de IGF-I significativamente diminuídos em relação a LV curada e ao grupo controle (comunicação pessoal Goto, H.). Além disso, quando avaliou-se a expressão quantitativa (*real time* PCR) de mRNA de IGF-I em pele, fígado, baço e linfonodo de cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*, observou-se uma maior expressão nos primeiros e baixa no último (Pinho et al., 2013). Como atribui-se a IGF-I papel promotor de crescimento de células hematopoiéticas, esses níveis baixos de IGF-I na LV ativa podem ter um papel na pancitopenia.

Neste trabalho propomos o estudo da patogenia da pancitopenia na LV, no qual realizamos estudos em cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* e camundongos C57BL/6 infectados experimentalmente por *L. (L.) donovani*. No cão com LV, caracterizamos as alterações no mielograma e na histopatologia da medula

óssea relacionando-os com perfis hematológicos distintos. Além disso, avaliamos a expressão de IGF-I e de outros fatores de crescimento/citocinas na medula óssea. Em camundongos C57BL/6 infectados por *L. (L.) donovani*, caracterizamos o perfil hematológico e as alterações na medula óssea aprofundando na fenotipagem das células estromais. Desta forma, a exposição dos dados da tese será dividida em duas seções abordando: patogênese da pancitopenia em cães com LV e patogênese da pancitopenia em camundongos C57BL/6 infectados por *L. (L.) donovani*.

3 OBJETIVOS

- a) Estudo da patogênese da pancitopenia em cães com LV;
- b) Estudo da patogênese da pancitopenia em camundongos C57BL/6 infectados por *L. (L.) donovani*.

4 PATOGÊNESE DA PANCITOPENIA EM CÃES COM LV

4.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar as alterações hematimétricas de cães com LV;
- b) Avaliar as características do mielograma e exame histopatológico de medula óssea de cães com LV;
- c) Avaliar a expressão de IGF-I em medula óssea de cães com LV;
- d) Avaliar a expressão de GM-CSF, TNF- α , IL-3, IFN e IL-7 na medula óssea em cães com LV;
- e) Avaliar a carga parasitária em medula óssea de cães com LV.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Animais

Na triagem dos animais com LV, examinamos 288 cães, machos e fêmeas, de diferentes idades e raças, em área endêmica Teresina-PI, provenientes da Gerência de Zoonoses com sorologia positiva para *Leishmania*. Para o nosso estudo, como critério de inclusão selecionamos apenas cães com exame parasitológico positivo em aspirados de linfonodos e/ou medula óssea, sendo que excluímos todos aqueles coinfectados com *Ehrlichia canis* diagnosticados por exame sorológico (imunofluorescência indireta).

Para a seleção de cães saudáveis, foram examinados 10 cães provenientes de área não endêmica, São Paulo/SP, pertencentes ao Canil da Polícia Militar de São Paulo. Além disso, conseguimos avaliar três cães saudáveis de área endêmica, Teresina-PI, provenientes da Gerência de Zoonoses de Teresina-PI.

Após a seleção dos animais conforme exame parasitológico, coletamos 5 mL de sangue periférico por punção venosa em tubo contendo EDTA (BD Vacutainer®) para exame hematológico para classificação dos animais infectados de acordo com o perfil hematimétrico. Além disso, obtivemos mais 10 mL de sangue periférico por punção venosa em tubo seco (BD Vacutainer®). Este foi destinado para análise bioquímica (proteínas totais, albumina, globulinas, transaminase pirúvica glutâmica -TGP, uréia e

creatinina), bem como para dosagem de IGF-I. Em adição, em todos os cães foi realizada anamnese para avaliação das manifestações clínicas da doença conforme descrito no Apêndice I.

Para a coleta de amostras de medula óssea esternal para o mielograma, determinação da carga parasitária e avaliação de IGF-I e outros fatores de crescimento/citocinas, os animais foram sedados com associação de acepromazina (0,05 mg/kg – IM) e meperidina (2 mg/kg – IM). Para a obtenção de amostra de biópsia de medula óssea da região da crista ilíaca, fragmentos foram coletados imediatamente após a eutanásia do cão, com auxílio de agulha para biópsia modelo Jamshidi. Este procedimento foi realizado com overdose de tiopental sódico (33%, da dose de 5 ml/kg, IV).

4.2.2 Considerações éticas

Os procedimentos envolvendo cães naturalmente infectados, realizados neste estudo, foram aprovados pelo Comitê de Pesquisa e Ética do IMT-USP (CPE-IMT 2010/077) – Anexo I. Os animais sadios foram doados pela Gerência de Zoonoses de Teresina-PI, os quais pertenciam ao grupo de animais errantes capturados para o controle da raiva urbana.

4.2.3 Diagnóstico diferencial de erliquiose por teste de imunofluorescência indireta (IFI)

O diagnóstico diferencial de erliquiose monocítica canina foi realizada pela reação de imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpo anti-*Ehrlichia canis* no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.2.3.1 Reação de IFI

A IFI foi realizada utilizando células DH82 (linhagem de células monocíticas canina) infectadas com o isolado de Jaboticabal de *Ehrlichia canis*. As mesmas foram fixadas em lâminas de fluorescência, como descrito por (Ristic et al., 1972). Os soros dos cães foram diluídos a 1:40 a 1:320 em salina tamponada com fosfato 0,01M pH 7,2

(*phosphate buffered-saline* = PBS) com albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* = BSA) (0,01g/mL). Após diluição, o soro foi aplicado nas lâminas com antígeno fixado e incubado por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Posteriormente, seguiu-se a lavagem de 10 minutos com PBS. Após a secagem a temperatura ambiente, foi adicionado conjugado de anticorpo policlonal de coelho anti-IgG de cão conjugado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) na diluição de 1:1000. Novamente as lâminas foram incubadas a 37°C por 30 minutos e lavadas conforme descrição acima. Logo após a secagem, aplicou-se glicerina tamponada pH 8,5 em cada lâmina e estas foram examinadas em microscópio de epifluorescência OLIMPUS®. As amostras consideradas positivas foram as que reagiram na diluição 1:80 (ponto de corte). Os soros controles, positivo e negativo, foram provenientes de um estudo de infecção experimental com o isolado de Jaboticabal (Hasegawa, 2005).

4.2.4 Exame hematimétrico

As amostras de sangue periférico foram processadas utilizando-se uma técnica automatizada em equipamento *Vet ABC hematology analyzer* (Horiba, USA). Além disso, foi realizada contagem diferencial de leucócitos em esfregaço sanguíneo. Conforme os resultados obtidos no exame hematimétrico, aos grupos dos cães infectados foram atribuídos valores para semi-quantificar as alterações, sendo que estabelecemos os seguintes escores: cães com pancitopenia= 4, cães com bicitopenia= 3, cães com citopenia= 2 e cães com hemograma normal=1.

4.2.5 Exame bioquímico

Os parâmetros bioquímicos analisados foram proteínas totais, albumina e globulina, e outros relativos à função renal e hepática. Utilizamos kits LABTEST (Labtest Diagnóstica SA) para dosagem de transaminase glutâmica pirúvica – TGP (catálogo nº 198), albumina (catálogo nº 19), proteínas totais (catálogo nº 99), uréia (catálogo nº 27) e creatinina (catálogo nº 35), seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.6 Dosagem de IGF-I sérico

Para dosagem de IGF-I sérico, utilizamos o kit de ELISA para detecção de IGF-I sérico de cães (E90050Ca, USCN – Life Science Inc., USA) conforme as instruções do fabricante.

4.2.7 Mielograma

A amostra obtida de medula esternal foi destinada ao preparado de esfregaço na lâmina, após fixação em metanol, e o mesmo foi corado com May-Grunwald-Giemsa para análise citológica. Além disso, parte do material foi armazenada, em meio de congelamento, no nitrogênio líquido para posterior análise por reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) em tempo real.

As alterações medulares foram avaliadas por contagem diferencial de 500 células segundo Harvey, (2001). Destacamos que nesse exame, focamos na análise da proporção mielóide:eritróide e nos índices de maturação mielóide e eritróide, mas não exploramos detalhadamente as subpopulações das células jovens e/ou maduras mielóides e eritróides. Assim, adotamos o seguinte critério de contagem: células mielóides jovens (mieloblastos + promielócitos + mielócitos); células mielóides maduras (metamielócitos + bastonetes + segmentados); células eritróides nucleadas jovens (proeritroblastos + eritroblastos basófilos); células eritróides nucleadas maduras (eritroblastos policromáticos + eritroblastos ortocromáticos).

4.2.8 Exame histopatológico de medula óssea

Os fragmentos de biópsia de medula óssea foram fixados em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01 M pH 7,4 e processados por técnica de rotina, cortados com 3 a 4 µm de espessura, e corados com hematoxilina-eosina (H-E) para microscopia de luz. Os resultados do exame histopatológico foram analisados de forma semi-quantitativa, mensurando-se a localização, distribuição e intensidade da lesão, numa escala de 0 a 3 onde: 0= normal, 1= médio, 2= moderado, 3=severo.

4.2.9 Detecção e quantificação de mRNA de IGF-I, IL-7, IFN, TNF, IL-3 e GM-CSF

4.2.9.1 Purificação de RNA

Para obtenção de RNA total, 5×10^6 células/mL foram ressuspensas em 1 mL de reagente TRIZOL (Invitrogen, EUA) e processadas segundo as recomendações do fabricante. O RNA obtido foi ressuspensão em água livre de RNase e feita a dosagem por NanoDrop ND-1000 UV-Visespectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), com a integridade das amostras demonstrada pelo escore 260/280 (1,8-2,0 foram considerados aceitáveis).

4.2.9.2 Obtenção do cDNA

A transcrição reversa para a síntese do cDNA a partir do mRNA foi realizada nas seguintes condições: 1 µg de RNA total foram misturados com 10 µL de High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante.

4.2.9.3 PCR em tempo real

Para a determinação da expressão do mRNA de IGF-I e demais fatores de crescimento/citocinas utilizou-se a técnica de PCR em tempo real. Otimizou-se a reação em um volume final de 25 µL nas seguintes condições: 2 µL de cDNA, 10 µL de Sybr Green (2x) (Applied Biosystems), *primer* a 150 nM e 11,5 µL de água bidestilada estéril. A amplificação foi em termociclador Applied Biosystem StepOne Real Time PCR System e a reação submetida aos seguintes ciclos: 95° por 10 minutos; 95°C por 15 segundos; 58-61°C por 1 minuto, 70°C por 1 minutos, submetidos a 40 ciclos.

Foram utilizados iniciadores (*primers*) de amplificação para os controles internos, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) e *hypoxanthine phosphoribosyl transferase* (HPRT), para a quantificação relativa dos genes específicos segundo Pfaffl (2001). As seqüências dos *primers* para os genes específicos (Tabela 1) e controles internos foram construídos a partir de sequências do RNA mensageiro de cães para esses genes, obtidas da página WEB do NCBI (gene bank).

Tabela 1 – Sequência dos *primers* com tamanho do produto, número de acesso e temperatura de anelamento

Alvos	Sequencia do <i>primer</i>	Tamanho do produto (pb)	Número de Acesso	Temperatura de anelamento (°C)
IGF-I	5'GGGTTCTACTTCAACAAGCCCACA3' 5'GGGGTGCACAGTACATCTCTAGCC3'	127	L08254	61
IL-7	5'TCAGCATCAATGACTTGGACATCA3' 5'ATTGCTTCAACTTGTGAGCAGCAC3'	141	NM_001048138	58
GM-CSF	5'AAGTGGTCTCTGAAGTGTTTGACC3' 5'GGACAGTGCTGCTTATAGTGATTG3'	145	S49738.1	58
IL-3	5'CTGCCTAAGCAATACTTCACAATG3' 5'GTATCTTCCAGCAAGGTCTCTTTC3'	116	NM_001013835.1	58
TNF	5'CTCCAATAATCAGCCCTCTTG3' 5'GGGTTTGCTACAACATGAGCTACT3'	89	EU249361.1	58
GAPDH	5'GCTGGTGCTGAGTATGTTGTGGAG3' 5'CAGCAGAAGGAGCAGAGATGATGA3'	89	AB038240.1	58-61
HPRT	5'AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA3' 5'CAAACATGATTCAAATCCCTGA3'	135	NM_001003357.1	58-61

4.2.10 Determinação da carga parasitária em medula óssea

A determinação da carga parasitária em medula óssea foi realizada pela técnica de PCR tempo real quantitativo com base em curvas padrão utilizando quantidades conhecidas de moléculas da região ITS (*internal transcribed spacer*) e células mononucleares do sangue periférico de cão, para a quantificação de *Leishmania spp* e das células mononucleares de sangue periférico de cão, respectivamente.

4.2.10.1 Preparo das amostras

Para obtenção de células mononucleares, foi coletado 10 mL de sangue periférico em tubo vacutainer com anticoagulante EDTA de cães saudáveis e utilizado o meio de separação por gradiente Histopaque 1119 (Sigma-Aldrich, Alemanha), conforme indicações do fabricante. Utilizamos o QIAamp DNA mini kit (Qiagen) para extração de DNA de células mononucleares do sangue periférico e de medula óssea esternal, seguindo as recomendações do fabricante.

4.2.10.2 Construção da curva padrão para *Leishmania spp*

A curva padrão para a determinação da carga parasitária de *Leishmania spp* foi realizada por meio de diluições seriadas na razão de 1:10, partindo-se de 10^5 moléculas até 10 moléculas do clone ITS.

O clone ITS foi obtido por meio da clonagem da região de ITS de *Leishmania spp*, por PCR convencional utilizando *primers* específicos para o gene ITS. Na PCR foram utilizados 0,625 U de enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, EUA), 1,5mM $MgCl_2$, 1x Taq buffer, 0,2mM de dNTP (Invitrogen®, EUA), 400 nM de cada *primer* e água bidestilada estéril, sendo adicionado 50 ng de DNA de *Leishmania spp*. A amplificação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf (Alemanha) utilizando as seguintes etapas: 94°C por quatro minutos e posteriormente uma sequência de 40 ciclos: 94°C por quarenta segundos, de 52°C por um minuto e de 72°C por um minuto e, um ciclo final de quatro minutos a 72°C.

Após amplificação, o produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 1%, sendo purificado utilizando-se o QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). O fragmento obtido foi denominado ITS-FC12 e clonado no vetor de clonagem pGEM-T (Promega) utilizando-se 50 ng do vetor de clonagem pGEM, 11 ng do inseto ITS-FC12, 5 μ L de tampão de ligação 2X (Promega) e 1 μ L de T4 DNA Ligase (Promega) e água bidestilada estéril, totalizando um volume final de 10 μ L. A reação de ligação foi incubada a 4 °C, por 18 horas, sendo utilizada para a transformação de células de *Escherichia coli* DH5 α competentes por choque térmico. O plasmídio recombinante pGEM-ITS-FC12a foi obtido após extração plasmidial por meio do kit QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen). Após obtenção do plasmídio recombinante, este foi analisado por meio de análise de restrição utilizando as enzimas de restrição Apa I e Pst I, como também por meio de sequenciamento realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (ICB-USP).

4.2.10.3 Construção da curva-padrão com células mononucleares do sangue periférico de cães

Para a construção da curva padrão com células mononucleares do sangue periférico foram feitas diluições seriadas nas quantidades de 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 e 1 célula mononuclear por reação.

4.2.10.4 PCR em tempo real quantitativo

A PCR em tempo real foi realizada usando Sybr Green (2x) (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à amplificação de DNA em termociclador (Applied Biosystem StepOne Plus Real Time PCR System) aos seguintes ciclos: 95° por 10 minutos; 95°C por 15 segundos; 58°C por 1 minuto, 70°C por 1 minutos, submetidos a 40 ciclos.

Os *primers* foram construídos utilizando ferramentas online disponibilizadas nos sites “Primer 3” (<http://frodo.wi.mit.edu>) e “Sci Tools” do site “IDTDNA” (<http://www.idtdna.com/Scitools>), para o gene *ribosomal internal transcribed spacer* (ITS) (GQ332357.1). Os *primers* utilizados foram: Forward: 5’ CGTAACAAGGTAGCTGTAGGTGAA 3’ e Reward 5’ ATATAGAATAAGCCTCCCCGAGTT 3’ e para o gene *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* - GAPDH (AB038240.1). Os *primers* construídos foram: Forward: 5’GCTGGTGCTGAGTATGTTGTGGAG3’ e Reward 5’ CAGCAGAAGGAGCAGAGATGATGA3’.

4.2.11 Análise estatística

Para a análise estatística empregamos testes não paramétricos Mann-Whitney ou Kruskal Wallis com o pós-teste de Dunns e os resultados apresentados como mediana e percentis de 25% e 75%. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

4.3 Resultados

Inicialmente, destacamos que todos os cães utilizados em nosso estudo tiveram a confirmação do diagnóstico de LV pelo encontro de parasitos em tecidos linfóides e foram negativos no diagnóstico diferencial para erliquiose monocítica canina. Dos 288 cães examinados, apenas 23% (66/288) foram positivos no exame parasitológico e destes, somente 36% (24/66) eram monoinfectados com *Leishmania*.

Daremos sequência na exposição dos resultados, apresentando a análise comparativa de todos os dados entre os grupos formados de acordo com o perfil hematimétrico, pois objetivamos correlacionar, as alterações na medula óssea, a

expressão dos fatores de crescimento e/ou citocinas com o grau das alterações hematológicas.

4.3.1 Classificação dos cães com LV conforme alterações hematológicas

Para compararmos os cães com LV conforme perfil hematimétrico, organizamos os seguintes grupos: cães com LV/hemograma normal que denominamos HN (N=3), cães com citopenia única (N=5), cães com bicitopenia (N=11), cães com pancitopenia (N=5) e cães sadios (N=13). Dentro da população dos 24 cães monoinfectados com *Leishmania*, 21% eram pancitopênicos, 46% bicitopênicos, 21% com citopenia única e 12% tinham hemograma normal. Mas, considerando a população amostral canina dos 288 animais avaliados com exame sorológico positivo, sem descarte de outras coinfeções, a frequência de cães com pancitopenia era apenas de 2%.

Os cães infectados com pancitopenia apresentavam uma redução significativa nos valores dos seguintes parâmetros: hemácias, hemoglobina, leucócitos e plaquetas. Os cães bicitopênicos apresentavam uma redução significativa nos parâmetros: hemácias, hemoglobina e plaquetas enquanto que, os cães com LV e com citopenia única apresentaram redução significativa apenas no número de hemácias (Tabela 2).

Na série eritrocítica, em todos os animais infectados com alterações hematimétricas, observamos uma anemia normocítica normocrômica, sendo esta marcante nos animais com pancitopenia. Já na série leucocítica, vimos que nos cães com citopenia única, bicitopenia e/ou hemograma normal não apresentaram diferenças em relação aos cães sadios no número total de leucócitos, mas havia uma redução significativa nos cães com pancitopenia quando comparados com os outros grupos de cães infectados e ao grupo controle. A leucopenia observada nos cães pancitopênicos estava acompanhada por uma linfopenia, monocitopenia e eosinopenia absoluta. Não houve diferença estatisticamente significativa no número total de leucócitos nos animais bicitopênicos e/ou com apenas uma citopenia. Por outro lado, a contagem absoluta de linfócitos nesses animais apresentavam uma diminuição significativa em relação aos cães sadios e a contagem de neutrófilos, uma tendência ao aumento. Na série plaquetária, havia uma diminuição gradual do número de plaquetas à medida que os animais apresentavam alterações hematológicas mais severas, sendo significativa nos animais pancitopênicos e/ou bicitopênicos em relação aos cães sadios (Tabela 2).

Tabela 2 – Perfil hematológico dos cães infectados por *L. (L.) infantum* e cães controles

Parâmetros	Cães sadios (N=13)	Cães com pancitopenia (N=5)	Cães com bicitopenia (N=11)	Cães com citopenia única (N=5)	Cães LV/HN (N=3)
Hemácias ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7,0 (6,4-7,6)*	2,1 (1,4-3,6) ^{a,b}	4,1 (3,4-4,6) ^a	5,6 (2,7-6,7) ^a	6,1 (5,8-7,5)
CHCM (g/dL)	33,1 (32,4-33,8)	34,2 (31,5-40,2)	37,5 (32,4-38,8)	32,4 (26,5-33,9)	33,5 (32,6-36,7)
VCM (fL)	66,4 (63,6-68,4)	64,0 (59,5-69,0)	62,0 (58,4-64,0)	64,8 (62,9-68,3)	65,6 (61,5-70,0)
Hemoglobina (g/dL)	14,9 (14,2-16,4)	4,9 (3,3-8,6) ^{a,b}	8,0 (7,7-10,6) ^{a,d}	13,1 (5,7-15,0)	15,0 (12,6 -15,5)
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	280,0 (226,0-288,5)	149,0 (98,5-163,5) ^a	101,0 (81,0-149,0) ^{a,c,d}	185,0 (145,0-370,0)	238,0 (217,0-276,0)
Leucócitos totais ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7,1 (5,8-10,4)	4,0 (2,1-5,6) ^{a,b,e,f}	9,9 (6,9-12,3)	8,0 (7,7-12,9)	9,7 (8,1-14,7)
Neutrófilos/ mm^3	4224 (3218-7325)	3200 (1575-4956) ^{b,e,f}	8019 (5106-9717)	6794 (5680-10545)	8730 (5589-10731)
Eosinófilos/ mm^3	314 (175-547)	0 (0-163) ^{a,f}	126 (99-246) ^a	240 (232-379)	162 (147-194)
Linfócitos/ mm^3	2460 (1722-2631)	560 (308-616) ^{a,b,e}	1173 (1045-1690) ^a	847 (600-1652) ^a	2268 (776-3528)
Monócito/ mm^3	275 (189-433)	56 (41-98) ^{a,e,f}	190 (89-390)	240 (153-379)	81 (0-294)

*Mediana (percentis 25 – 75).

^a P < 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães sadios.^b P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com LV com hemograma normal (Cão LV/HN).^c P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com citopenia única.^d P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com LV com hemograma normal (Cão LV/HN).^e P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com bicitopenia.^f P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com citopenia única.

4.3.2 Manifestações clínicas em cães com LV com diferente perfil hematológico

Quando analisamos os 24 cães com LV conforme perfil hematológico, vimos que em todos os grupos dos cães infectados as manifestações clínicas mais frequentes foram: linfadenopatia (80-100%), lesões cutâneas (40-100%) e emagrecimento (40-80%) (Tabela 3). Nesses animais, não observamos correlação com o número de sinais clínicos e o quadro hematológico.

Tabela 3 – Perfil clínico de 24 cães com LV agrupados conforme quadro hematológico

	Pancitopenia (N=5)	Bicitopenia (N=11)	Citopenia única (N=5)	Cão LV/HN* (N=3)
Linfadenopatia	4 (80%) ^{&}	11 (100%)	4 (80%)	2 (67%)
Alterações cutâneas	2 (40%)	10 (91)	5 (100%)	3 (100%)
Emagrecimento	4 (80%)	7 (63%)	2 (40%)	2 (67%)
Onicogribose	0	6 (54%)	0	0
Apatia	2 (40%)	1 (9%)	0	1 (33%)
Mucosa ocular e oral hipocoradas	2 (40%)	3 (27%)	0	0
Conjuntivite	1 (20%)	2 (18%)	1 (20%)	1
Blefarite	1 (20%)	0	0	0
Diarréia	0	1 (9%)	0	0
Vômito	1 (20%)	0	0	0

*Cão com LV e hemograma normal.

[&] Numero de animais (% em relação ao total do grupo)

4.3.3 Perfil bioquímico dos cães com LV com diferente perfil hematológico

Na análise bioquímica, a principal alteração foi a hiperglobulinemia. O aumento significativo de concentração de proteínas totais foi observado nos cães com bicitopenia e pancitopenia em comparação aos cães saudáveis, sendo que esse achado se deve, particularmente, a um aumento importante de globulinas séricas nesses animais. Quando comparamos os grupos de cães infectados com os animais controles, não houve diferença estatisticamente significativa na TGP, uréia e creatinina, mas avaliando os cães com LV isoladamente, no grupo de cães infectados sem alterações no hemograma, apenas um animal tinha aumento dos níveis séricos de TGP. Já nos cães com citopenia única um animal apresentava aumento de uréia e creatinina. Nos cães bicitopênicos, dois cães apresentavam aumento de TGP, um cão aumento de uréia e 4 cães aumento de

creatinina. Nos cães com pancitopenia, três tinham aumento de TGP e dois de uréia e creatinina (Tabela 4).

Tabela 4 – Perfil bioquímico dos cães infectados por *L. (L.) infantum* e cães controles

Parâmetros	Cães sadios (N=13)	Cães com pancitopenia (N=5)	Cães com bicitopenia (N=11)	Cães com citopenia única (N=5)	Cães LV/HN (N=3)
Proteínas Totais (g/dL)	5,9 (5,8-6,3)	8,3 (7,7-12,2) ^a	8,9 (7,0-9,1) ^a	6,4 (6,2-7,5)	6,9 (5,4-8,6)
Albumina (g/dL)	3,3 (3,0-3,7)	1,3 (1,1-2,3) ^{a,b,c,d}	3,1 (2,6-3,8)	2,9 (2,3-4,2)	3,7 (2,7-4,3)
Globulina (g/dL)	2,5 (2,4-4,3)	6,9 (5,3-11,1) ^{a,b,d}	5,3 (3,0-6,3) ^a	3,8 (2,9-4,2)	3,2 (2,7-4,3)
TGP (U/L)	27,22 (22,25-36,3)	36,0 (15,5-108,0)	20,1 (17,8-31,6)	22,7 (19,5-28,0)	19,5 (17,0-40,5)
Uréia (mg/dL)	40,7 (33,9-46,9)	31,0 (17,0-225,5)	31,3 (16,9-47,9)	42,0 (34,0-194,5)	41,0 (24,0-58,0)
Creatinina (mg/dL)	0,9 (0,9-1,1)	1,0 (0,75-4,8)	1,7 (1,0-3,4)	0,9 (0,8-11,1)	1,0 (0,7-1,0)

* Mediana (percentis 25 – 75).

^a P < 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães sadios.

^b P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com LV com hemograma normal (Cão LV/HN).

^c P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com bicitopenia.

^d P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com citopenia única.

Observamos ainda uma forte correlação entre os níveis séricos de proteínas totais, globulinas e albumina e o grau das alterações hematológicas (Figura 1).

Figura 1 – Correlação entre os níveis séricos de proteína total, globulina e albumina sérica, e o grau das alterações hematológicas dos cães com LV. Escore foi estabelecido conforme gravidade das alterações hematológicas em: cães com pancitopenia=4, cães com bicitopenia= 3, cães com citopenia única=2 e cães HN=1. Teste de Spearman.

4.3.4 Mielograma em cães com LV com diferente perfil hematológico

No aspirado de medula óssea, avaliamos diferentes parâmetros como proporção mielóide:eritróide, índice de maturação mielóide e eritróide, contagem diferencial e características morfológicas em todos os tipos celulares.

Inicialmente, vimos que na proporção mielóide:eritróide havia um aumento significativo nos cães infectados com alterações hematológicas em comparação aos cães

sadios. Na avaliação dos índices de maturação mielóide e eritróide, somente neste último havia alterações significantes nos cães pancitopênicos que estava aumentado em relação aos outros grupos de cães infectados e cães sadios. Ressaltamos que a porcentagem de células eritróides nucleadas jovens estava aumentada nos cães com pancitopenia, e que somente os cães com bicitopenia e citopenia única tinham redução significativa de células eritróides nucleadas maduras quando comparados aos cães sadios. A porcentagem de células eritróides nucleadas maduras teve correlação com o número absoluto de hemácias nos cães infectados e sadios (Figura 2). Não observamos alterações no índice de maturação mielóide, mas os cães com alterações hematimétricas apresentavam um aumento na porcentagem de células mielóides maduras em relação ao grupo controle (Tabela 5).

Na contagem diferencial, um dado interessante foi a diminuição gradativa da porcentagem de linfócitos e monócitos de acordo com a gravidade das alterações hematológicas, ou seja, os cães infectados com hemograma normal tinham um aumento significativo no número de linfócitos em relação ao grupo controle, sendo este perfil observado também nos cães com apenas uma citopenia e/ou bicitopênicos, mas não nos cães pancitopênicos que apresentaram uma redução significativa em relação a esses grupos de cães infectados. Na porcentagem de plasmócitos, os animais tinham uma redução significativa em relação aos demais grupos. Por fim, na porcentagem de macrófagos, não observamos nenhuma alteração estatística entre os cães infectados e sadios (Tabela 5).

Figura 2 – Correlação entre porcentagem de células eritróides nucleadas maduras e o número absoluto de hemácias nos cães infectados e sadios. Teste de Spearman.

Tabela 5 – Mielograma dos cães com LV conforme perfil hematológico e cães saudáveis

	Cães saudáveis (N=13)	Cães com pancitopenia (N=5)	Cães com bicitopenia (N=11)	Cães com citopenia única (N=5)	Cães com LV/HN (N=3)
Mielóide:Eritróide	1,10 (0,96-1,4)*	1,90 (0,80-5,80) ^a	2,30 (1,60-3,90) ^a	2,10 (1,90-18,40) ^a	2,10 (1,30-2,60)
Mielóide Jovem:Mielóide Maduro	0,02 (0,01-0,03)	0,02 (0,01-0,04)	0,02 (0,01-0,03)	0,02 (0,00-0,025)	0,03 (0,01-0,03)
Eritróide Jovem:Eritróide Maduro	0,03 (0,01-0,06)	0,08 (0,05-0,02) ^{a,b,d,e}	0,03 (0,01-0,06)	0,03 (0,00-0,04)	0,02 (0,01-0,03)
Células mielóides jovens (%)	1,00 (0,50-1,60)	1,40 (0,90-1,80)	1,20 (0,80-1,80)	1,40 (0,10-1,50)	1,50 (0,80-1,60)
Células mielóides maduras (%)	47,40 (44,90-52,40)	61,40 (38,63-78,40) ^a	60,20 (51,00-67,60) ^a	56,20 (53,90-66,00) ^a	56,60 (43,50-63,20)
Células eritróides nucleadas jovens (%)	1,40 (0,70-2,50)	2,00 (1,30-4,60) ^{a,b,d,e}	0,60 (0,20-1,20)	0,60 (0,10-1,20)	0,60 (0,20-0,80)
Células eritróides nucleadas maduras (%)	43,00 (37,00-46,00)	27,60 (13,40-50,70)	25,40 (17,40-31,60) ^a	26,40 (10,80-28,70) ^a	26,80 (23,40-34,00)
Linfócitos (%)	4,00 (3,50-5,70)	5,60 (3,70-6,60)	9,00 (5,80-14,80) ^a	11,80 (6,00-16,20) ^a	9,00 (7,40-11,20) ^a
Plasmócitos (%)	0,80 (0,60-1,30)	0,40 (0,10-0,50) ^{a,b,d,e}	0,40 (0,20-1,20)	0,80 (0,60-1,70)	1,20 (0,70-2,20)
Monócitos (%)	1,00 (0,40-1,80)	0,40 (0,10-0,80) ^{b,d,e}	1,80 (1,40-3,00) ^{a,c}	5,40 (4,50-6,80) ^a	3,20 (2,80-8,50) ^a
Macrófagos (%)	0,00 (0,00-0,20)	0,00 (0,00-0,30)	0,20 (0,00-0,60)	0,20 (0,00-0,50)	0,20 (0,00-0,40)

* mediana (percentil 25 – 75)

^a P < 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães controles.^b P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com LV com hemograma normal (Cão LV/HN).^c P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com citopenia única.^d P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com bicitopenia.^e P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com citopenia única.

Avaliando o mielograma frente a gravidade das alterações hematológicas, vimos uma correlação positiva no índice de maturação eritróide e porcentagem de células eritróides nucleadas jovens com o grau das alterações hematómetricas, ou seja, havia um aumento desses parâmetros de acordo com o grau de comprometimento das células do sangue periférico (Figura 3).

Figura 3 – (A) Correlação do índice de maturação eritróide e (B) porcentagem de células eritróides nucleadas jovens em relação o grau das alterações hematológicas em cães com LV. Teste de Spearman. Escor foi estabelecido conforme gravidade das alterações hematológicas em: cães com pancitopenia=4, cães com bicitopenia= 3, cães com citopenia única=2 e cães HN=1.

Na porcentagem de linfócitos, havia uma correlação negativa com o grau de comprometimento hematológico nos cães com LV (Figura 4A). Esse mesmo padrão foi observado na porcentagem de plasmócitos e monócitos (Figura 4B-C).

micromegacariócitos, megacariócitos com assincronia de maturação (Figura 5I) e emperopolese (Figura 5J). Outras alterações observadas foram eritrofagocitose (Figura 5L) e mitoses atípicas (Figura 5M).

Figura 5 – Aspirado de medula óssea de cão com LV. (→) Presença de formas amastigotas de *Leishmania* dentro do macrófago (A) e células polimorfonucleares (B); (→) Célula eritróide: Megalócito (C), assincronia de maturação núcleo:citoplasma (D) e binucleação (E); (→) Célula mielóide: bastonete gigante (F), assincronia de maturação núcleo:citoplasma (G) e fragmentação nuclear (H); Megacariócito com

assincronia de maturação (I) e empiropolesi (J); ($\rightarrow$) Eritrofagocitose (L) e mitose atípica (M).

4.3.5 Exame histopatológico de medula óssea em cães com LV com diferente perfil hematológico

O exame histopatológico foi realizado somente nos cães com LV com bicitopenia (N=9) e citopenia única (N=5) e com hemograma normal (N=3), pela disponibilidade. Ainda conseguimos fazer biopsia de um animal sadio.

No exame histopatológico da medula óssea, as principais alterações observadas foram aumento na celularidade, hiperplasia megacariocítica, proliferação macrofágica e degeneração e/ou necrose.

Nos cães com LV, vimos que apenas um animal apresentava celularidade normal, sendo este pertencente ao grupo dos cães infectados sem alteração no hemograma. Os cães bicitopênicos apresentaram um aumento significativo da celularidade em relação aos demais cães infectados. Além disso, havia uma correlação entre a celularidade e maior grau de alterações hematológicas (Figura 6; 7B).

Figura 6 – Correlação entre a celularidade e o grau das alterações hematológicas em cães com LV. Avaliação semiquantitativa (escore). Teste de Spearman.

Outro achado foi o aumento de megacariócitos (Figura 7E) e de necrose e/ou degeneração com intensidade variando de normal a moderada nos cães infectados. Outra alteração que observamos na medula óssea desses cães com LV foi a proliferação e/ou infiltrado de macrófagos com distribuição focal e/ou difusa (Figura 7D), em intensidade variando de média a severa (Tabela 6).

Tabela 6 – Intensidade (escore) de alteração histopatológica de medula óssea de cães com LV com diferente perfil hematológico

	Cães com bicitopenia (N=9)	Cães com citopenia única (N=5)	Cães com LV/HN (N=3)
Celularidade	3,0 (3,0-3,0) ^{*a}	3,0 (1,0-3,0)	1,0 (0,0-3,0)
Hiperplasia megacariocítica	1,0 (0,5-2,0)	1,0 (0,5-2,0)	0,0 (0,0-1,0)
Proliferação e/ou infiltrado de macrófagos	2,0 (1,5-2,5)	1,0 (0,5-2,5)	2,0 (1,0-2,0)
Necrose e/ou degeneração	1,0 (0,5-1,0)	0,0 (0,0-1,5)	1,0 (0,0-1,0)

* Mediana (percentis 25 – 75).

^a P < 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com citopenia única e com hemograma normal (HN).

Figura 7 – Histopatologia de medula óssea. Cão sadio: (A) Medula óssea normocelular. Cão com LV: (B) Medula óssea hipercelular; Proliferação e/ou infiltrado de macrófagos (C) focal e (D) difusa; (E) Aumento de megacariócitos. H-E.

4.3.6 Expressão de mRNA de fatores de crescimento e/ou citocinas em cães com LV com diferente perfil hematológico

Para verificarmos a participação dos fatores de crescimento e/ou citocinas, por PCR em tempo real, nas alterações observadas na medula óssea dos cães com LV, selecionamos os seguintes fatores: TNF, IFN, IL-3, IL-7, GM-CSF e IGF-I. A expressão de mRNA de cada gene foi calculado com base em dois controles internos, HPRT e GAPDH, mas optamos por apresentar os dados conforme a expressão relativa obtida de acordo com a expressão do controle interno HPRT. Esclarecemos que o perfil observado na expressão de cada gene analisado foi similar com base em ambos controles internos selecionados.

Na análise de expressão de mRNA de TNF, vimos um aumento significativo nos cães infectados sem alteração no hemograma, naqueles com citopenia única e bicitopenia quando comparados ao grupo controle. Os cães com pancitopenia apresentavam uma tendência de aumento em relação aos cães saudáveis. A expressão de IFN e IL-7 estava aumentada em todos os grupos de cães com LV, no entanto, apenas os cães com bicitopenia tinham um aumento significativo dessas citocinas quando comparados aos animais saudáveis. Já a expressão de IL-3 estava aumentada somente nos cães com citopenia única no sangue periférico. Na expressão de GM-CSF, observamos que nos cães com citopenia única, cães bicitopênicos e cães pancitopênicos havia um aumento significativo em relação aos cães saudáveis. Quando analisamos o perfil da expressão de IGF-I nos cães infectados, a sua expressão parece aumentada quando o animal apresenta alterações hematológicas menos intensas com uma queda significativa naqueles com maior comprometimento, nos cães pancitopênicos. Nestes vimos uma diminuição significativa em relação aos cães infectados com bicitopenia e com citopenia única bem como em relação aos cães saudáveis (Tabela 7).

Tabela 7 – Expressão de fatores de crescimento e/ou citocinas em medula óssea de cães com LV conforme perfil hematológico e cães sadios*

	Cães sadios	Cães com pancitopenia	Cães com bicitopenia	Cães com citopenia	Cães com LV/HN
TNF	0,17 (0,07-0,88) (N=13)	4,40 (0,35-16,17) (N=4)	2,00 (0,08-12,60) ^a (N=11)	1,80 (0,84-13,70) ^a (N=5)	7,9 (0,71-106,9) ^a (N=3)
IFN	0,00 (0,00-0,03) (N=7)	0,26 (0,00-0,59) (N=3)	0,62 (0,40-2,15) ^a (N=6)	0,20 (0,00-2,13) (N=4)	0,10 (0,0-0,49) (N=3)
IL-3	0,34 (0,08-1,42) (N=11)	0,42 (0,31-6,87) (N=5)	0,39 (0,08-6,78) (N=9)	2,94 (1,56-10,31) ^a (N=5)	3,90 (0,43-30,63) (N=3)
IL-7	0,01 (0,004-0,21) (N=8)	0,11 (0,06-0,79) (N=3)	0,23 (0,11-0,37) ^a (N=5)	0,06 (0,02-0,12) (N=4)	0,18 (0,09-0,56) (N=3)
GM-CSF	0,06 (0,04-0,32) (N=9)	4,05 (0,65-7,12) ^a (N=3)	3,95 (0,94-10,25) ^a (N=8)	7,09 (1,70-116,70) ^a (N=4)	0,89 (0,16-38,34) (N=3)
IGF-I	0,06 (0,03-0,14) (N=13)	0,01 (0,01-0,07) ^{a,b,c} (N=5)	0,08 (0,04-0,33) (N=11)	0,1 (0,05-0,25) (N=5)	0,12 (0,02-0,60) (N=3)

^a P < 0,05 (testes de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães controles.

^b P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com bicitopenia.

^c P < 0,05 (teste de Kruskal-Wallis e Dunns), em relação aos cães com citopenia única.

*Os valores são representativos da expressão relativa de cada gene com base na expressão do controle interno HPRT ($2^{-\Delta C_t}$).

Quando analisamos a expressão de IGF-I nos grupos dos cães infectados, esse fator de crescimento apresentou uma correlação negativa com a evolução das alterações hematológicas (Figura 8).

Figura 8 – Correlação da expressão de IGF-I em relação o grau de alterações hematológicas em cães com LV. Escore foi estabelecido conforme o grau de alterações hematológicas em: cães com pancitopenia=4, cães com bicitopenia= 3, cães com citopenia única=2 e cães HN=1. Teste de Spearman.

Na análise de todos os fatores de crescimento/citocinas, vimos que o nível de expressão de TNF- α tinha correlação com a expressão de GM-CSF e IL-3 nos cães com LV (Figura 9).

Figura 9 – Correlação entre o nível de expressão de TNF- α e os níveis de expressão de GM-CSF (A) e IL-3 (B). Teste de Spearman.

4.3.7 IGF-I sérico em cães com LV com diferente perfil hematológico

Na dosagem sérica de IGF-I, os cães infectados apresentaram uma tendência de aumento em relação ao grupo controle, exceto os cães pancitopênicos que em relação aos cães bicitopênicos apresentaram uma redução significativa de IGF-I sérico (Figura 10). Analisando a frequência de distribuição de IGF-I nos grupos dos cães infectados observamos essa redução nos cães com pancitopenia (Figura 11).

Figura 10 – Níveis séricos de IGF-I em cães infectados e cães saudáveis. * $P < 0,05$ em relação a outros grupos de cães infectados (teste Kruskal-Wallis e Dunns).

Figura 11 – Frequência de distribuição relativa dos níveis séricos de IGF-I em cães sadios (A) e cães conforme perfil hematológico: com hemograma normal (B), com citopenia única (C), com bicytopenia (D) e pancitopenia (E).

4.3.8 Carga parasitária em cães com LV com diferente perfil hematológico

Na quantificação da carga parasitária na medula óssea dos cães com LV havia um aumento significativo apenas nos cães com bicitopenia em relação aos cães com citopenia única e sem alterações hematológicas (Figura 12).

Figura 12 – Carga parasitária em medula de óssea de cães com LV conforme a gravidade das alterações hematológicas. *P < 0,05 em relação ao cão com citopenia única e LV/HN (testes de Kruskal-Wallis e Dunns).

4.4 Discussão

Na LVC, as alterações hematológicas são comuns e consideradas como marcadores na determinação da progressão da doença, sendo a anemia o achado mais frequente (Amusategui et al., 2003; Queiroz et al., 2004). Considerando que na LV humana, a pancitopenia seja a forma mais grave dessas alterações no sangue periférico com uma frequência em torno de 57,8-88% (Marwaha et al., 1991; Varma e Naseem, 2010), buscamos explorar os aspectos envolvidos na patogênese dessa alteração hematológica em cães com LV, já que os mesmos também desenvolvem citopenias no sangue periférico. Dentro do que conhecemos, não encontramos nenhum dado na literatura focando a pancitopenia na LVC.

Ao iniciarmos a nossa pesquisa, como várias doenças infecciosas podem levar a mudanças do perfil hematológico em cães, não somente LV, procuramos excluir os animais com outra infecção que pudesse levar a pancitopenia. Uma dessas condições é a erliquiose monocítica canina, causada pela bactéria *Erlichia canis*, caracterizada por sinais clínicos inespecíficos e alterações hematológicas semelhantes à LV canina (Woody e Hoskins, 1991). Esta doença também conhecida como pancitopenia tropical canina, vem sendo relatada em vários estados brasileiros, acometendo aproximadamente 20 a 30% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias (Davidson et al., 1975; Dagnone et al., 2003; Bulla et al., 2004). A cidade de Teresina, Piauí, onde realizamos a seleção dos nossos animais, também é palco da erliquiose monocítica canina chegando a atingir 29,63% dos cães, sendo que em torno de 29% dos casos estavam co-infectados com *L. infantum* (Silva, 2010). Desta forma, para investigar os mecanismos envolvidos na pancitopenia em cães com LV, sem interferência de nenhuma doença concomitante, adotamos como critério de exclusão a presença de infecção por *Erlichia canis*, realizando, durante a triagem dos animais para esse estudo, o diagnóstico diferencial da erliquiose monocítica canina por teste sorológico. Dos animais sem erliquiose, adotamos como critério de inclusão, os animais positivos no parasitológico para *L. (L.) infantum*.

Após a etapa de triagem dos animais, organizamos os grupos dos cães com LV de acordo com o perfil hematológico em: com pancitopenia, bicitopenia, citopenia única e cães sem alterações no hemograma. Decidimos dividir os animais desta forma com o intuito de ter grupos com graus diferentes de alteração do perfil hematimétrico, já que nos cães não tínhamos o tempo de evolução da infecção. Com essa abordagem, pretendíamos analisar possíveis diferenças imunopatológicas na medula óssea que fossem causas determinantes das citopenias no sangue periférico na LVC, dependente da gravidade ou evolução da doença. Esta abordagem não fora utilizada em estudos existentes onde avaliou-se alteração da medula óssea de cães com LV correlacionando-a às alterações do perfil clínico e carga parasitária dos animais infectados (Tropia de Abreu et al., 2011; Nicolato et al., 2013).

Avaliando em nossos animais o perfil hematológico, quando selecionamos os animais com citopenia única em sangue periférico, a anemia foi a alteração que se destacou, sugerindo que as mudanças na série eritrocítica sejam o ponto inicial da

progressão da doença. Na literatura, a maioria dos estudos aponta a anemia como um importante marcador hematológico na LVC (Reis et al., 2006). Em nossos cães bicitopênicos, a anemia e a trombocitopenia foram os principais achados e, nos cães pancitopênicos, havia uma diminuição global de todas as células no sangue periférico, sendo a diminuição no número absoluto de hemácias as alterações mais significantes, atingindo somente 30% do valor médio normal dos animais sadios. Um dado interessante foi a baixa frequência dos cães com sorologia positiva para LV com quadro pancitopênico, esta observada em apenas 1,7% (5/288), proporção bem menor do que em casos humanos (Marwaha et al., 1991).

As manifestações clínicas mais frequentes foram linfadenopatia (80-100%), lesões cutâneas (40-100%) e emagrecimento (40-80%), não diferindo da literatura (Ciaramella et al., 1997; Almeida et al., 2005). Muitos trabalhos tem demonstrado na LVC a correlação dos sinais clínicos e as alterações hematológicas (Reis et al., 2006), mas da Costa-Val et al. (2007) não encontrou nenhuma correlação entre a anemia e o aparecimento dos sinais clínicos. Em nossa abordagem, na qual os grupos foram formados de acordo com as alterações hematológicas e não de acordo com o estatus clínico do animal, não vimos correlação entre esses parâmetros. Sendo as alterações clínico-patológicas variáveis em cães com LV, a classificação dos animais considerando apenas os sinais clínicos tem suas limitações. Assim, o grupo Leshvet sugere classificar os cães com LV com base nos sinais clínicos, alterações laboratoriais e os níveis de anticorpos séricos (Solano-Gallego et al., 2011).

Outro marcador considerado importante na LVC é a hiperproteinemia devido a uma maior produção de globulinas e que vem sendo mostrada sua correlação com o estatus clínico do animal (Almeida et al., 2005; Reis et al., 2006). Em nossos animais, o aumento de proteína total, aumento de globulinas e diminuição de albumina também foram marcantes, sendo que havia correlação com o perfil hematológico do cão. Os cães que apresentavam uma alteração hematológica mais acentuada, eram acompanhados de hiperproteinemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia mais acentuadas. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de TGP, uréia e creatinina entre os grupos mas sabe-se que em estágios mais avançados da LVC estes parâmetros podem ter alterações importantes (Slappendel, 1990; Abranches et al., 1991).

Como dito anteriormente, focamos nosso estudo na análise dos possíveis elementos envolvidos na patogênese das alterações hematológicas na LVC. Para tanto, as nossas investigações foram centradas na medula óssea por ser um importante órgão hematopoiético e alvo para replicação de *Leishmania* (Tropia de Abreu et al., 2011). Por anos, a medula óssea era analisada apenas para a busca e identificação de leishmânias, no entanto, estudos recentes vêm demonstrando a importância dos eventos patológicos nesse órgão (Sinha et al., 1993; Lafuse et al., 2013; Nicolato et al., 2013; Momo et al., 2014; Temiz et al., 2014).

A nossa análise da medula óssea consistiu em uma avaliação conjunta do mielograma e sua histopatologia e da expressão de fatores de crescimento/citocinas em cães com LV. Os vários dados assim obtidos foram correlacionados a níveis de citopenias no sangue periférico. Antes de discutirmos os dados da medula óssea é importante lembrar que dos resultados encontrados na literatura, somente Foglia-Manzillo et al. (2006) realizaram diagnóstico diferencial para erliquiose.

Inicialmente, partimos para o mielograma no qual focamos na análise da proporção mielóide:eritróide, índice de maturação mielóide e eritróide, contagem diferencial e características morfológicas de todos os tipos celulares. Assim, em nossos animais vimos que na proporção mielóide:eritróide havia um aumento significativo nos cães infectados com alterações hematológicas em comparação aos cães saudáveis. Como a determinação da proporção mielóide:eritróide indica a relação entre as duas linhagens celulares, ela é considerada uma importante medida semi-quantitativa do desenvolvimento de células vermelhas e brancas (Raskin e Messick, 2012; Nicolato et al., 2013). Como vimos um aumento significativo na porcentagem de células mielóides maduras nos cães infectados e uma diminuição das células eritróides nucleadas maduras, o aumento observado da proporção mielóide:eritróide sugere ser devido a uma hiperplasia mielóide acompanhada de uma hipoplasia eritróide. Na análise dos índices de maturação mielóide e eritróide, apenas a série eritrocítica estava alterada nos cães pancitopênicos com aumento significativo dos precursores eritróides em relação aos demais grupos de cães infectados e cães saudáveis.

Quando comparamos esses primeiros achados no mielograma com o grau de citopenias periféricas, vimos que havia uma correlação entre o índice de maturação eritróide com a evolução das alterações no sangue periférico, mostrando que nos cães

pancitopênicos há um aumento dos progenitores eritróides, mas sem o restabelecimento da anemia. Outro dado, que fortalece essa análise, foi a correlação positiva encontrada entre a porcentagem de células eritróides nucleadas maduras e o número absoluto de hemácias no sangue periférico dos cães examinados. Em adição, outros estudos também demonstraram uma diminuição da linhagem eritróide acompanhada da diminuição de hemácias circulantes em cães sintomáticos (Nicolato et al., 2013). Na série mielóide, não vimos alteração no índice de maturação nos cães infectados, mas destacamos o aumento das células mielóides maduras nesses animais somente naqueles com alterações no exame hematimétrico. De acordo com os estudos obtidos por Nicolato et al. (2013) na LVC severa ocorre uma neutrofilia associada a uma eosinopenia nas células da medula óssea.

Na contagem diferencial das células da medula óssea, vimos um importante aumento na porcentagem de linfócitos e monócitos nos cães infectados, particularmente, nos cães com bicitopenia, citopenia única e com hemograma normal, mas o oposto no sangue periférico. Sabe-se que a infecção promove uma resposta linfoproliferativa, o que pode explicar a linfopoiese na medula óssea, mas provavelmente não é suficiente para compensar a linfopenia no sangue periférico. Alternativamente ou concomitantemente, sugere-se também o recrutamento de linfócitos para outros órgãos afetados pelo parasito (Bourdoiseau et al., 1997; Reis et al., 2006). Em relação aos plasmócitos, os cães pancitopênicos tinham uma diminuição significativa quando comparados aos demais grupos. Sabemos que na LVC há uma ativação policlonal intensa de células B, caracterizada por uma hipergamaglobulinemia e uma plasmocitose, particularmente, em órgãos linfóides de cães sintomáticos (Martinez-Moreno et al., 1993; Guerra et al., 2009). A medula óssea sendo um órgão linfóide, essa diminuição pode ser explicada pelo recrutamento dessas células para outros sítios, mas uma disfunção nesse órgão não pode ser descartada, pois vimos uma correlação negativa na porcentagem de linfócitos, monócitos e plasmócitos com o comprometimento hematológico.

Além dos dados quantitativos das células da medula óssea, procedemos a avaliação morfológica das células mielóides e eritróides, quando observamos características displásicas com intensidade desde discreta a moderada nas séries mielóides, eritróides e megacariocítica. Era comum a presença de células com

assincronia de maturação núcleo:citoplasma e células atípicas. Os principais achados até agora descritos em humanos e/ou cães com LV eram displasia megacariocítica e eritrocítica (Yarali et al., 2002; Kopterides et al., 2003; Foglia-Manzillo et al., 2006). Essas displasias observadas nos cães pancitopênicos, particularmente na série eritróide, representam alteração no processo de maturação e/ou diferenciação celular na medula óssea desses animais, que somado ao aumento observado no índice de maturação eritróide sugere uma parada de maturação nesse compartimento, já que havia um aumento na porcentagem de células eritróides imaturas e uma redução na porcentagem de células imaturas. Outros achados foram mitoses atípicas, emperipolese e eritrofagocitose. A síndrome hemofagocítica secundária à infecção por LV já foi relatada em humanos (Martin et al., 2009).

A displasia megacariocítica tem sido relatada na LVC, sendo frequente a emperipolese. Este refere-se a passagem de células sanguíneas pelo citoplasma de megacariócitos, e há relatos de até mesmo lêishmanias em cães com LV (Humble et al., 1956; Momo et al., 2014). Em humanos, nas síndromes mielodisplásicas, neoplasias e hemorragias é um achado comum (Schmitt et al., 2000). Não se sabe exatamente a etiopatogênese desse processo, mas acredita-se que no caso da infecção por *Leishmania*, as citocinas produzidas influenciam a megariopoiese podendo levar as displasias e consequente falha na produção de plaquetas (Momo et al., 2014). Na maioria dos nossos animais, observamos a empiropolese, mas nem sempre acompanhada de displasia megacariocítica, principalmente, nos cães com citopenias menos severas.

Para complementarmos a análise na medula óssea dos cães com LV, realizamos o exame histopatológico da medula óssea dos cães com bicitopenia, citopenia única e sem alterações hematológicas. Nesta etapa, não conseguimos obter amostras de cães com pancitopenia. As principais alterações foram aumento na celularidade, hiperplasia megacariocítica, proliferação e/ou infiltrado de macrófagos e degeneração e/ou necrose semelhantes ao observado por (Momo et al., 2014), mas não os casos de aplasia medular. Os cães bicitopênicos apresentaram um aumento significativo da celularidade em relação aos demais animais infectados mostrando uma correlação positiva entre esse parâmetro e a gravidade das citopenias no sangue periférico. Este aumento estava relacionado não só a hiperplasia mielóide observada

nesses animais como também ao aumento de macrófagos em distribuição focal e/ou difusa. Além disso, havia organizações semelhantes a granuloma. Classicamente, diferentes trabalhos já descreveram, não só na medula óssea como em outros órgãos, o aumento de macrófagos. No entanto, são escassos os estudos que abordam o seu papel na gênese das alterações hematológicas na medula óssea (Momo et al., 2014). Não foi observada correlação do aumento destas células, entre os animais infectados, com maior grau de alterações hematológicas, pois mesmo nos animais com LV sem alterações importantes no mielograma, já havia o infiltrado de macrófagos em intensidade moderada.

No presente estudo, vimos tanto no mielograma quando no exame histopatológico o comprometimento da medula óssea em cães com LV e a sua relação com as alterações no sangue periférico. Constatamos, além disso, que a série eritróide era o compartimento celular mais afetado na infecção por *Leishmania* (Tropia de Abreu et al., 2011; Nicolato et al., 2013). A contagem de reticulócitos é um parâmetro importante para avaliar a resposta da medula óssea nas anemias. Na LVC, a anemia é normocítica normocrômica e não regenerativa em torno de 70% dos casos (Abranches et al., 1991; Ciaramella et al., 1997; Koutinas et al., 1999; Reis et al., 2006). Dos poucos animais com bicitopenia, citopenia única e sem alteração no hemograma, que realizamos a contagem de reticulócitos não havia diferenças marcantes (dados não mostrados), talvez a doença ainda não estivesse em seu grau maior de severidade nesses cães. Vários fatores foram anteriormente citados como causas da anemia na LV dentre eles fatores extramedulares como hemólise, destruição esplênica e/ou auto-imune (Woodruff et al., 1972; Dilber et al., 2002; Çelik et al., 2007). No entanto, as evidências obtidas no nosso estudo sugerem a ocorrência de uma dishematopoiese na LVC.

A medula óssea tem sido considerado um importante marcador para LV, por apresentar uma densidade parasitária maior nos cães com LV sintomáticos em relação aos cães oligossintomáticos e/ou assintomáticos (Tropia de Abreu et al., 2011), tendo até uma melhor correlação com os sinais clínicos em relação a outros órgãos como baço, fígado, linfonodo e pele (Reis et al., 2006). Avaliamos também o impacto da parasitemia em nossos animais e vimos que nos cães bicitopênicos o parasitismo aumentado assume um papel importante em relação aos cães

pancitopênicos que apresentaram em alguns animais um queda no parasitismo, talvez, na fase mais severa da doença, a desregulação na resposta imune influencie na proliferação do parasito.

Aprofundando os nossos estudos na medula óssea, avaliamos a expressão de fatores de crescimento/citocinas que são apontados como participantes do processo hematopoiético como GM-CSF, IL-3 e IL-7 e IGF-I (Cheers et al., 1988; Metcalf, 1991; Rodriguez-Tarduchy et al., 1992; Hofmeister et al., 1999), e citocinas pro-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ descritas como elementos efetores na gênese de mielodisplasias em humanos com síndrome mielodisplásica (Kitagawa et al., 1997).

GM-CSF é o principal fator responsável pela proliferação e/ou diferenciação de granulócitos e monócitos, assumindo grande importância nas reações imunes e inflamatórias (Burgess e Metcalf, 1980). Observamos no nosso estudo que em todos os grupos dos cães infectados havia um aumento significativo deste fator em relação aos cães saudáveis. Esse aumento pode ter contribuído para a hiperplasia mielóide nesses animais, mas talvez não seja o único determinante para a expansão mielóide pois não houve correlação entre a expressão do GM-CSF e o aumento na porcentagem de células mielóides maduras nos cães infectados. Em modelo murino infectado com *L. (L.) donovani*, o aumento de células precursoras estava relacionado com a maior expressão de mRNA de GM-CSF e MIP-1 α em medula óssea femoral, sendo esta resposta dependente de células T (Cotterell et al., 2000). Outros estudos demonstraram que macrófagos estromais medulares infectados por *Leishmania* aumentam seletivamente a mielopoiese por uma produção excessiva de GM-CSF e TNF- α (Cotterell et al., 2000). Por muito tempo, diferentes abordagens mostraram que a alta expressão de GM-CSF sempre estava presente em processos patológicos (Hamilton e Anderson, 2004). Experimentos utilizando camundongos transgênicos para GM-CSF, por exemplo, a produção excessiva de GM-CSF levava ao acúmulo de macrófagos, cegueira e danos severos em vários tecidos (Lang et al., 1987), além disso, as células de medula óssea infectadas com retrovírus expressando GM-CSF desenvolviam uma síndrome mieloproliferativa letal (Johnson et al., 1989).

IL-3 também conhecida como *multi-colony stimulating factor* (CSF) tem um papel importante na hematopoiese por estimular a proliferação e/ou diferenciação de diferentes linhagens de precursores hematopoiéticos como granulócitos, macrófagos,

eritrócitos e megacariócitos (Ihle, 1992). Na LV, particularmente em cães, são escassos os estudos focando a participação desse fator na gênese das lesões observadas na medula óssea. Apenas trabalhos realizados em modelo murino infectado por *L. major* demonstram uma correlação entre a susceptibilidade à infecção e a capacidade das células esplênicas produzirem elevados níveis de IL-3, mas o papel dessa citocina na imunoregulação ainda não está clara (Mirkovich et al., 1986). Em cães do nosso estudo, o aumento na expressão de IL-3 foi significativa apenas nos cães com citopenia única, mas nos demais grupos havia somente uma tendência de aumento.

Outra citocina importante na hematopoiese é a IL-7, esta atua na linfopoiese agindo como fator de crescimento e tendo efeitos antiapoptóticos (Hofmeister et al., 1999). Além disso, alguns estudos vem mostrando a sua participação na mielopoiese e eritropoiese (Aiello et al., 2007). Na avaliação de IL-7 em nosso estudo, nos cães bicitopênicos essa citocina foi mais expressiva. Ao observar os dados do mielograma, esses animais tinham também uma porcentagem maior de linfócitos em relação ao grupo controle, entretanto, não vimos correlação entre a expressão de mRNA de IL-7 e a porcentagem de linfócitos obtida pelo mielograma. Vários fatores podem ter atuação pois um grande número de fatores de crescimento/citocinas pode atuar sinergicamente em diferentes funções na hematopoiese (Quesenberry, 1986).

Outro fator de crescimento que participa da hematopoiese é IGF-I que, tanto *in vitro* e *in vivo*, mostrou-se ter papel na diferenciação de células mielóides e eritróides (Yakar et al., 1999; Welniak et al., 2004). Quando analisado o seu perfil nos animais do nosso estudo, a expressão de IGF-I na medula óssea de cães pancitopênicos estava diminuída significativamente quando comparados aos demais cães infectados e sadios. Este achado sugere sua importância na determinação do quadro pancitopênico nos cães com LV. Vale ressaltar que, dentre os fatores de crescimento e/ou citocinas que analisamos, o IGF-I foi o único fator que teve correlação com o grau de alterações hematológicas. Esse fator de crescimento pode ser produzido pela maioria das células mas a nível sistêmico, a produção maior de IGF-I se dá pelas células hepáticas (Sjogren et al., 1999). Como vimos uma diminuição na expressão de IGF-I na medula óssea, particularmente, nos cães pancitopênicos, avaliamos o nível de IGF-I sérico em todos os cães. Observamos

uma diminuição significativa dos níveis séricos de IGF-I mais uma vez nos cães com pancitopenia. Além disso, houve uma correlação entre a expressão de IGF-I na medula óssea e seus níveis séricos nos cães infectados. Com base nesses dados, podemos sugerir tanto a nível sistêmico como local que a redução de IGF-I pode ser importante nos eventos que acontecem na medula óssea durante a infecção leishmaniótica afetando a hematopoiese. Estudos mais aprofundados são necessários visando a possível utilização desse fator de crescimento como uma alternativa complementar no tratamento de pacientes humanos e/ou caninos com LV com evolução grave.

Os fatores de crescimento atuantes na hematopoiese podem sofrer regulação positiva e/ou negativa na sua função biológica pela ação de outras citocinas como TNF- α e IFN- γ (Zhang et al., 1995; Bruin et al., 2014). Assim, considerando que estas citocinas são observadas em níveis elevados na LV humana e experimental, buscamos avaliar a sua expressão na medula óssea de cães com LV.

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por células da linhagem hematopoiética e não-hematopoiética com efeitos biológicos diversos (Wajant et al., 2003). Inicialmente, mencionaremos o TNF- α como participante do processo hematopoiético. Muitos estudos já demonstraram que o TNF tem efeitos bifuncionais na hematopoiese. Primeiro, este é capaz de estimular a proliferação de progenitores hematopoiéticos na presença de alguns fatores de crescimento como IL-3 e GM-CSF, segundo, pode inibir a proliferação de células imaturas na presença de G-CSF e/ou *stem cell factor* (SCF) (Jacobsen et al., 1992). Em cães infectados do nosso estudo, vimos que o aumento na expressão de TNF- α na medula óssea era significativo nos cães com bicitopenia, citopenia única e hemograma normal. Esse foi o mesmo perfil observado na expressão de GM-CSF e IL-3, sugerindo assim, que esses fatores juntos, podem ser os responsáveis pelo aumento da mielopoiese observada nos cães infectados, tendo constatada uma correlação positiva entre TNF- α e a expressão de GM-CSF e IL-3. Sabe-se também que TNF- α exerce efeito negativo na regulação de IGF-I, o que corrobora com nossos achados nos cães pancitopênicos que tinham níveis elevados de TNF- α e baixos níveis de IGF-I. Não só na LV, em síndrome mielodisplásica em humanos, um dos fatores envolvidos na patogênese das

alterações na hematopoiese é o aumento de TNF- α por macrófagos estromais CD68+ (Kitagawa et al., 1997).

A citocina pro-inflamatória IFN- γ é conhecida não só pelo seu papel na resposta imune inata e adaptativa contra infecções intracelulares, mas também por ser supressora da hematopoiese, particularmente, da série eritrocítica (Bruin et al., 2014). Estudos mostram que IFN- γ produzidos por macrófagos ativados contribuem para a hemofagocitose, além de inibir a formação de colônias eritróides a partir de progenitores hematopoiéticos (Wang et al., 1995; Zoller et al., 2011). Assim, considerando sua ação tanto na hematopoiese quanto nas leishmanioses, analisamos a sua expressão na medula óssea dos cães com LV. Em todos os cães infectados observamos uma tendência de aumento da expressão de IFN- γ em comparação aos cães saudáveis, no entanto, sendo acentuada nos cães bicitopênicos. IFN- γ é considerado um inibidor da hematopoiese, mas a sua ação é específica para determinadas linhagens celulares e estágios de maturação, observando-se a estimulação da série mielóide, particularmente, de neutrófilos e monócitos (de Bruin et al., 2013). Constatando-se, no nosso estudo, um aumento na porcentagem de monócitos na medula óssea, a informação acima sugere a participação de IFN- γ no aumento de monócitos avaliadas no mielograma e de macrófagos vistos no exame histopatológico. O IFN- γ à semelhança de TNF- α também tem participação nas síndromes mielodisplásicas em humanos, onde se observam níveis elevados de expressão dessa citocina, contribuindo para as alterações da hematopoiese com consequente citopenias no sangue periférico (Kitagawa et al., 1997).

Na análise comparativa de cada fator de crescimento e/ou citocinas com a gravidade das alterações hematológicas, o aumento da expressão de IFN- γ , GM-CSF, IL-7 e TNF- α parece assumir um papel importante, particularmente, nos cães bicitopênicos, e IL-3 nos cães com citopenia única. Mas, em cães pancitopênicos a diminuição da expressão de IGF-I parece contribuir na gênese das alterações hematológicas na medula óssea.

Além disso, observamos em cães com LV um aumento acentuado do número de macrófagos ao lado de um aumento na expressão de TNF- α e IFN- γ , semelhante ao observado na LV humana (Barral-Netto et al., 1991; Karp et al., 1993). Estes

dados sugerem que a participação dos macrófagos produzindo essas citocinas seja um dos principais elementos que levam a dishematopoiese observada na LVC.

4.5 Conclusão

Diante do exposto, cães com LV desenvolvem alterações na medula óssea caracterizando uma dishematopoiese com participação de macrófagos, aumento da expressão de fatores de crescimento e/ou citocinas GM-CSF, IL-3, IL-7, TNF- α e IFN- γ e diminuição de IGF-I nos casos mais severos.

5 PATOGÊNESE DA PANCITOPENIA EM CAMUNDONGOS C57BL/6 INFECTADOS POR *L. (L.) donovani*

5.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar as alterações hematimétricas de camundongos C57BL/6 com LV;
- b) Avaliar as características do mielograma e exame histopatológico de medula óssea de camundongos C57BL/6 com LV;
- c) Caracterizar a população de macrófagos em medula óssea de camundongos C57BL/6 com LV.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Animais, infecção e coleta de amostras

Camundongos C57BL/6, isogênicos, fêmeas, com 6-7 semanas de idade, criados e mantidos no Biotério do Departamento de Biologia da Universidade de York, Reino Unido, em condições livres de patógenos específicos, em ambiente com ventilação natural, com ração e água à vontade. Realizamos três experimentos independentes sendo que dividimos os animais em dois grupos: quatro animais não infectados e quatro animais infectados. Para a infecção, inoculamos por via intravenosa 3×10^7 parasitos (*Leishmania donovani*/cepa LV9 WT – isolada de um paciente da Etiópia). As coletas de sangue periférico e medula óssea foram realizadas com 28 dias pós-infecção. Para coleta de diferentes amostras, os animais foram anestesiados com isoflurano na concentração alveolar de 2%, por via inalatória. Aproximadamente 600 μ L de sangue periférico foram coletados por punção intracardíaca e transferidos para microtubos contendo heparina (Sigma-Aldrich) que foram utilizados para a dosagem de hemoglobina, contagem de eritrócitos, plaquetas, reticulócitos e leucócitos por citometria de fluxo. Para o mielograma, foi obtido aspirado da medula óssea da crista ilíaca com auxílio de agulha (23G) e seringa de 5 mL utilizando a técnica de *squash* (citologia por esmagamento: o material é

espalhado comprimindo-o entre duas lâminas), para preparo na lâmina. Para a análise histopatológica da medula óssea, realizamos a retirada total do úmero.

Todos os procedimentos adotados foram aprovados pela Comissão de Ética e Procedimentos em Animais da Universidade de York.

5.2.2 Dosagem de hemoglobina

A dosagem de hemoglobina foi realizada utilizando o *Hemoglobin Assay Kit* (Sigma-Aldrich), seguindo as recomendações do fabricante.

5.2.3 Contagem de eritrócitos, reticulócitos e plaquetas por citometria de fluxo

a) Marcação de eritrócitos e plaquetas para contagem por citometria de fluxo

aa) Anticorpos monoclonais de camundongo para marcadores de eritrócitos e plaquetas conjugados a diferentes fluoróforos conforme a Tabela 8.

Tabela 8 – Anticorpos utilizados na contagem de eritrócitos e plaquetas

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Isotipo	Alvo	Fabricante
Ter119	PE-Cy7	Ter-119	IgG2b	antígeno associado a glicoforina A	eBioscience
CD45	APC-Cy7	30-F11	IgG2b	Antígeno comum de leucócitos (glicoproteína)	Biolegend
CD42d	PE	1C2	IgG	Glicoproteína V de membrana de plaquetas	eBioscience

ab) Marcação de células

De cada amostra, 2 µL de sangue periférico foram incubados com 48 µL de solução contendo 0,1 µg de diferentes anticorpos (Tabela 8), por 15 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após a incubação, foram adicionados 300 µL de salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline* = PBS), 0,01M, pH 7,2, soro fetal bovino (SFB) 1%, inativado pelo calor, e 5×10^6 de microesferas

(Polysciences). Como controle da reação, preparamos 2 μL de sangue periférico em 48 μL de solução contendo os controles isotípicos de cada anticorpo utilizado (Tabela 8), e uma solução contendo 2 μL de sangue periférico com 48 μL de PBS. Após a incubação, foram adicionados 300 μL de PBS. As amostras foram processadas imediatamente em citometro de fluxo.

b) Marcação de reticulócitos para contagem por citometria de fluxo

Para contagem de reticulócitos, 2 μL de sangue foram incubados em 2 mL de solução 1,2 nM de laranja de tiazol (Sigma-Aldrich, USA), PBS, por 90 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. Como controle, preparamos uma solução com 2 μL de sangue em 2 mL de PBS. Após essa etapa, as amostras foram imediatamente passadas no citometro de fluxo (Nobes e Carter, 1990).

c) Citometria de fluxo

As amostras foram processadas no equipamento CyAnTM ADP Analyzer – Beckman Counter, avaliando em torno de 20.000 eventos e os dados analisados no software FlowJo Versão VX (EUA).

Segue abaixo a estratégia de *gate* utilizada para a contagem dos eritrócitos, reticulócitos e plaquetas:

Figura 13 – Estratégia de *gate* utilizada para contagem de eritrócitos, reticulócitos e plaquetas.

5.2.4 Contagem de leucócitos totais por microscopia óptica

Em aproximadamente 600 μL de sangue periférico foram adicionados 10 mL da solução de lise ACK (Life Technologies, USA) por 10 minutos a temperatura ambiente. Depois, completou-se o volume para 20 mL com PBS, SFB 1% e a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 800 x g. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e ressuspensionado em 1 mL de PBS, SFB 1% para contagem das células em câmara de Neubauer.

- a) Marcação de diferentes populações de leucócitos para contagem por citometria de fluxo

aa) Anticorpos monoclonais de camundongo para marcadores de populações diferentes de leucócitos conjugados a diferentes fluoróforos conforme a Tabela 9. Dois painéis foram utilizados.

Tabela 9 – Anticorpos utilizados na contagem diferencial de leucócitos

Painel 1					
Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Isotipo	Alvo	
cKit (117)	BV421	M1/70	IgG2b, kappa	receptor de transmembrana para o ligante de c-kit presente em células imaturas	Biolegen
B220(CD45R)	APC	RA3-6B2	IgG2a, kappa	isoforma restrita ao exon A expressa na superfície de linfócitos B	eBioscience
CD3	PE	145-2C11	IgG	co-receptor presente na superfície de linfócitos T	eBioscience
CD45.2	FITC	104	IgG2a, kappa	Antígeno comum de leucócitos (glicoproteína)	eBioscience
<i>Live/dead stain</i>	Efluor780			Marcador nuclear (apenas de células mortas)	eBioscience
Painel 2					
CD11b	ef450	M1/70	IgG2b, kappa	integrina presente na superfície de monócitos/macrófagos	eBioscience
CD11c	APC	N418	IgG	integrina presente na superfície de células dendríticas	Biolegend
Ly6G	PE	1A8	IgG2a, kappa	proteína expressa por neutrófilos	BD Bioscience
CD45.2	FITC	104	IgG2a, kappa	Antígeno comum de leucócitos (glicoproteína)	
<i>Live/dead stain</i>	Efluor780			Marcador nuclear (apenas de células mortas)	eBioscience

ab) Marcação de células

Após a contagem de leucócitos, a concentração foi ajustada para aproximadamente $10^5 - 10^6$ células/mL. 200 μ L desta suspensão de células foram distribuídas em poços de placas de 96 poços para centrifugação por 5 minutos a 800 x g. Após o descarte do sobrenadante, adicionaram-se 100 μ L de solução para bloqueio dos receptores para porção Fc do anticorpo com o anticorpo Anti-Mouse CD16/CD32 Purified (eBioscience), por 20 minutos a 4°C. Em seguida, adicionaram-se 100 μ L de PBS, SFB 1% e depois centrifugou-se por 5 minutos a 800 x g. Após descarte do sobrenadante, adicionaram-se 200 μ L da solução contendo 0,2 μ g de anticorpos e *Live/dead stain*, com incubação por 30 minutos no escuro a 4°C. Como controle da reação, as células foram incubadas com os controles isotípicos correspondentes de cada anticorpo (Tabela 9). Posteriormente a essa etapa, as células foram lavadas e fixadas em solução de paraformaldeído 2% em PBS, para submeter a citometria de fluxo.

Segue abaixo a estratégia de *gate* utilizada para contagem diferencial dos leucócitos:

Figura 14 – Estratégia de *gate* utilizada para contagem diferencial dos leucócitos de sangue periférico.

5.2.5 Mielograma

O aspirado de medula óssea foi fixado em metanol, o esfregaço foi corado com corante rápido Hemacolor (Merck), de acordo com as instruções do fabricante. As alterações medulares foram avaliadas por contagem diferencial de 500 células de acordo com Yang et al. (2013), em microscópio de luz (Zeiss, Alemanha). Nesse exame focamos na proporção mielóide:eritróide e nos índices de maturação mielóide e eritróide, e não exploramos detalhadamente as subpopulações das células jovens e/ou maduras mielóides e eritróides. Assim, adotamos o seguinte critério de contagem: células mielóides jovens (mieloblastos + promielócitos + mielócitos); células mielóides maduras (metamielócitos + bastonetes + segmentados); células eritróides nucleadas jovens (proeritroblastos + eritroblastos basófilos); células eritróides nucleadas maduras (eritroblastos policromáticos + eritroblastos ortocromáticos).

5.2.6 Histopatologia de medula óssea

O úmero foi fixado em solução contendo Lisina 75 mM, Paraformaldeído 4% e Periodato de Sódio 10 mM, e, posteriormente, foi embebido em *Tissue-Tek OCT* (Fisher Scientific) e conservado a -20°C. As amostras foram processadas por técnica de rotina, cortados com 3 a 4 µm de espessura, e corados com hematoxilina-eosina. Os cortes foram escaneados utilizando o equipamento *Axio Scan.Z1 slide scanner* (Zeiss, Alemanha) e as imagens obtidas foram analisadas no programa *Zeiss blue 2012 lite* (Zeiss, Alemanha). Os resultados da biopsia foram analisados de forma semi-quantitativa, mensurando-se a localização, distribuição e intensidade da lesão, numa escala de 0 a 3 onde: 0= normal, 1= mínima ou média, 2= moderada, 3=severa.

5.2.7 Identificação dos macrófagos estromais em medula óssea

- a) Anticorpo anti-*Leishmania* (soro de hamster infectado com a cepa LV9 WT) e anticorpos monoclonais para diferentes populações de macrófagos estão especificados na Tabela 10.

Tabela 10 – Anticorpos utilizados na identificação de macrófagos

Anticorpos	Fluorocromo	Clone	Isotipo	Alvo	Fabricante
F4/80 (microscopia confocal)	ef660	BM8	IgG2a, kappa	proteína transmembranica expressa por macrófagos	eBioscience
F4/80 (citometria de fluxo)	PE-Cy7	BM9	IgG2a, kappa	proteína transmembranica expressa por macrófagos	eBioscience
CD11b	ef450	M1/70	IgG2b, kappa	integrina presente superfície de monócitos/macrófagos	eBioscience
CD169	ef660	SER-4	IgG2a, kappa	sialodesina expressa por macrófagos	eBioscience
Ki67	FITC	16A8	IgG2a, kappa	proteína nuclear Ki67	Dako
<i>Live/dead stain</i>	Efluor780			Marcador nuclear (apenas de células mortas)	eBioscience

b) Reação imunoistoquímica para microscopia confocal

Para a reação, preparamos os cortes com 3 a 4 µm de espessura em lâminas com polilisina, os mesmos foram reidratados em solução de PBS, BSA 0,05%. Como as amostras foram fixadas com paraformaldeído, incubamos os cortes em solução de Triton X-100 0,1%, PBS para permeabilização da membrana das células. Após essa etapa, adicionamos uma solução do anticorpo F4/80 (1:200) conjugado com efluor 660 e/ou soro de hamster (1:100) por 30 minutos a temperatura ambiente. Para detecção das leishmânias, adicionou-se anticorpo secundário anti-IgG de hamster conjugado com efluor546 (1:200). Posterior às etapas de lavagem, incubamos os cortes com DAPI (1 µg/mL) para marcação nuclear. Os cortes foram cobertos com *Prolong Gold Mountant* (Life Technologies) e mantidos a 4°C até o momento da análise em microscópio confocal *Zeiss 510 Meta upright*.

Os cortes foram escaneados utilizando o equipamento *Axio Scan.Z1 slide scanner* e as imagens obtidas foram analisadas no programa *Zeiss blue 2012 lite*.

c) Citometria de fluxo

A suspensão das células do aspirado de medula óssea foi filtrada em filtro de 70 μm em um volume final de 50 mL. A mesma foi centrifugada a 800 x g, 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e *pellet* ressuspensionado em 1 mL de solução ACK lysing (Life Technologies) e mantido por 1 minuto. Após nova lavagem e centrifugação, as células foram ressuspensionadas em 10 mL de PBS, SFB 1% e contadas em contador automático de células (Beckman Coulter). A suspensão de células, foi ajustada a sua concentração para $1-3 \times 10^7$ células/mL sendo 200 μL distribuídos em placa de 96 poços. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com 100 μL de solução para bloqueio dos receptores para porção Fc do anticorpo, por 20 minutos a 4°C. Em seguida, adicionaram-se 100 μL de PBS, SFB 1% e depois centrifugou-se por 5 minutos a 800 x g. Após descarte do sobrenadante, adicionaram-se 200 μL da solução de anticorpos contendo *Live/dead stain* (Tabela 10), com incubação por 30 minutos no escuro a 4°C. Como controle da reação, as células foram incubadas com os controles isotípicos correspondentes de cada anticorpo (Tabela 10). Posteriormente a essa etapa, as células foram lavadas e incubadas com solução de permeabilização/fixação (Perm/Buffer concentrate – ebioscience) por 12 horas a 4°C. Depois, as células foram lavadas e incubadas com solução contendo o anticorpo Ki67 (marcação intracelular) por 30 minutos a 4°C. Depois as células foram lavadas com PBS, SFB 1% e analisadas por citometria de fluxo.

Segue abaixo a estratégia de *gate* utilizada para identificação e contagem dos macrófagos:

Figura 15. Estratégia de *gate* utilizada para identificação e contagem de macrófagos estromais da medula óssea.

5.2.8 Análise estatística

Para a análise estatística empregamos testes não paramétricos Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunns. Os resultados foram apresentados como mediana e percentis de 25% e 75%. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

5.3 Resultados

5.3.1 Avaliação hematológica

A coleta de sangue foi realizada aos 28 dias pós-infecção, período sabidamente estabelecido em que acontece o pico da carga parasitária nos camundongos infectados com a cepa de *L. (L.) donovani* que utilizamos. Nesse tempo de infecção, os animais apresentaram uma diminuição significativa de hemácias, hemoglobina, plaquetas e leucócitos totais quando comparados ao grupo sadio. Na contagem diferencial de leucócitos, vimos alteração na porcentagem de linfócitos T e B e célula dendrítica. Nesse caso, os animais infectados têm um aumento importante de linfócitos T e uma diminuição de linfócitos B diferente do observado nos animais sadios que apresentavam uma proporção de linfócitos T e B semelhante. Além disso, a porcentagem de células dendríticas estava menor nos camundongos com LV. Outro elemento avaliado foi a porcentagem de reticulócitos, a qual estava aumentada em média quatro vezes nos camundongos infectados quando comparados aos camundongos sadios (Tabela 11).

Tabela 11 – Alterações hematológicas observadas em camundongos infectados com *L. (L.) donovani*

	Camundongo sadio	Camundongo infectado
Hemácias/uL ($\times 10^6$)	19,2 (16,8-20,8) ¹	12,1 (10,4-160,3) *
Hemoglobina (mg/dL)	23,1 (20,9-26,3)	17,1 (15,6-19,03)*
Reticulócito (%)	4,5 (4,1-5,5)	20,2 (12,3-25,2)*
Plaquetas/ul ($\times 10^5$)	16,1 (12,0-22,0)	1,9 (1,2-3,9)*
Leucócitos/uL ($\times 10^3$)	2,7 (1,9-2,9)	1,5 (1,3-2,3)*
Linfócitos T (%)	34,1 (30,4-36,9)	49,9 (44,2-56,0)*
Linfócitos B (%)	34,9 (31,5-45,1)	25,9 (22,3-27,8)*
Monócitos (%)	15,0 (12,1-17,9)	14,5 (11,3-17,3)
Granulócitos (%)	3,8 (2,1-6,1)	4,4 (3,4-6,7)
Células dendríticas (%)	4,3 (4,1-5,5)	2,6 (1,8-3,6)*

¹Mediana (percentis 25 – 75)

*P<0,005, teste de Mann-Whitney.

5.3.2 Mielograma

No mielograma, os camundongos infectados apresentavam um aumento na proporção mielóide:eritróide. Na série mielóide, o índice de maturação foi maior nos animais com LV em relação aos camundongos saudáveis, devido ao aumento significativo de células mielóides jovens e uma diminuição de células mielóides maduras. Também na série eritróide, vimos uma diminuição significativa das células eritróides nucleadas maduras. Além disso, a porcentagem de linfócitos e macrófagos estava maior nos camundongos com LV (Tabela 12).

Tabela 12 – Mielograma dos camundongos saudáveis e camundongos infectados por *L. (L.) donovani*

	Camundongo sadio	Camundongo infectado
Mielóide:Eritróide	1,5 (1,3-2,0) ¹	2,1 (1,7-2,8) *
Mielóide Jovem:Mielóide Maduro	0,02 (0,01-0,03)	0,04 (0,10-0,19)*
Eritróide Jovem:Eritróide Maduro	0,02 (0,01-0,03)	0,03 (0,02-0,05)
Mielóide Jovem (%)	1,0 (0,6-1,1)	2,6 (4,8-6,0)*
Mielóide Maduro (%)	39,7 (35,5-42,5)	34,8 (31,0-38,1)*
Eritróide Jovem (%)	0,6 (0,4-0,9)	0,6 (0,2-0,9)
Eritróide Maduro (%)	26,8 (19,4-30,6)	17,8 (11,8-21,1)*
Linfócitos (%)	33,0 (26,4-37,4)	41,2 (35,7-47,2)*
Monócitos (%)	0,4 (0,2-0,6)	0,6 (0,2-1,0)
Macrófagos (%)	0,0 (0,0-0,2)	0,3 (0,0-0,7)
Plasmócitos (%)	0,0 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,1)

¹Mediana (percentis 25 – 75)

*P<0,005, teste de Mann-Whitney.

Na contagem diferencial das células da medula óssea, vimos apenas macrófagos infectados por *Leishmania* (Figura 16A). Na análise morfológica detalhada das séries mielóide e eritróide, nos camundongos infectados havia alterações morfológicas como assincronia de maturação núcleo:citoplasma (Figura 16B), presença de megalócitos (Figura 16E) e de células binucleadas e/ou bilobuladas (Figura 16F), e bastonetes gigantes. Além disso, observamos mitose atípica (Figura 16G), emperipolesi (Figura 16H) e leucoeritrofagocitose (Figura 16D).

Figura 16 – Mielograma de camundongos infectados por *L. (L.) donovani*. (A) Macrófago infectado com *Leishmania*. (B) Célula mielóide com assincronia de maturação. (C) Predomínio de células mielóides. (D) Hemofagocitose. (E) Megalócito. (F) Célula eirtróide binucleada. (G) Mitose atípica. (H) Emperipolesi.

5.3.3 Exame histopatológico

Para complementar os dados obtidos no mielograma, analisamos a histopatologia do úmero de camundongos infectados. A primeira evidência de alteração foi o aumento na celularidade nos camundongos infectados em relação aos camundongos saudáveis, com intensidade variando de mínima a severa (Figura 17). O aumento da celularidade em 45,4 % (5/11) dos animais era severo, em 18,2% (2/11), moderado e em 6,4% (4/11), médio.

Figura 17 – Histopatologia do úmero de camundongos saudáveis (A) e camundongos infectados com *L. (L.) donovani* (B). H-E.

Outra alteração observada na medula óssea dos camundongos infectados foi a presença de um infiltrado e/ou proliferação de células mononucleares similares a macrófagos (Figura 18) com distribuição difusa e/ou multifocal de intensidade severa em 54,5% (6/11), moderada em 9,1% (1/11) e média em 36,4% (4/11) dos casos.

Figura 18 – Histopatologia de medula óssea. (A) Camundongo sadio. (B) Camundongos infectados: Infiltrado e/ou proliferação de macrófagos (setas pretas) e formas amastigotas de *Leishmania* (seta branca). H-E.

5.3.4 Identificação dos macrófagos estromais em medula óssea

a) Microscopia confocal

Na imunomarcagem em tecido de medula óssea, tanto de camundongos sadios quanto camundongos infectados, tentamos identificar a população de macrófagos que observamos no exame histopatológico. Para tanto, selecionamos o marcador F4/80, cujo antígeno é expresso na superfície de macrófagos estromais (Khazen et al., 2005). Na nossa análise, em seis cortes de camundongos comparando com seis cortes de camundongos infectados, podemos constatar claramente um aumento significativo da expressão de células F4/80⁺ nos animais infectados quando comparado com os sadios (Figura). Além disso, vimos em um corte de camundongo infectado uma distribuição do parasito similar à de macrófagos estromais (Figura 20).

Figura 19 – Expressão de F4/80 em medula óssea de camundongo sadio (esquerda) e camundongo infectado com *Leishmania donovani* (direita). Em azul: núcleo das células corado com DAPI; Em vermelho: expressão de F4/80.

Figura 20 – Distribuição de *L. (L.) donovani* em medula óssea de camundongo C57BL/6 (direita). Camundongo sadio (esquerda). Em azul: núcleo das células corado com DAPI; Em vermelho: expressão de F4/80. Em verde: *Leishmania*.

b) Citometria de fluxo

Na caracterização dos macrófagos estromais por citometria de fluxo, além do marcador F4/80 acrescentamos mais dois, CD169 e CD11b. Vimos que dentro da população F4/80 em camundongos saudáveis, aproximadamente 70% das células eram CD169⁺. Nessa análise separamos toda a população celular que expressava F4/80, e observamos que os animais infectados apresentavam um aumento significativo desse marcador em comparação aos animais saudáveis (Figura 21A). Na sequência, restringimos nossa análise para essa população F4/80⁺ e separamos em quatro populações: F4/80⁺CD169⁺CD11b⁺, F4/80⁺CD169⁺CD11b⁻, F4/80⁺CD169⁻CD11b⁺ e F4/80⁺CD169⁻CD11b⁻. Dentre essas subpopulações celulares, as células F4/80⁺CD169⁺CD11b⁺ representavam em torno de 50% das células F4/80⁺ nos camundongos saudáveis. Durante a infecção, no entanto, vimos que essa população sofre uma regulação negativa nos animais infectados seguido de um aumento nas células F4/80⁺CD169⁻CD11b⁺ (Figura 21B; Tabela 13).

Tabela 13 – Porcentagem de macrófagos e suas subpopulações em medula óssea de camundongos saudáveis e camundongos infectados com *L. (L.) donovani*

Macrófagos	Camundongos saudáveis	Camundongos infectados
F4/80 ⁺	28,8 (28,3-33,7)	50,1 (40,8-53,8) ^{1*}
F4/80 ⁺ CD169 ⁺ CD11b ⁺	52,9 (45,3-61,6)	14,5 (11,6-33,9)*
F4/80 ⁺ CD169 ⁺ CD11b ⁻	9,2 (7,8-17,8)	10,2 (8,2-11,8)
F4/80 ⁺ CD169 ⁻ CD11b ⁺	19,3 (15,3-26,8)	41,1 (33,1-54,1)*
F4/80 ⁺ CD169 ⁻ CD11b ⁻	4,6 (3,8-9,9)	13,8 (10,1-18,4)*
F4/80 ⁺ Ki67 ⁺	30,8 (18,0-39,6)	36,1 (28,5-56,3)*

¹Mediana (percentis 25 – 75)

* P<0,05, teste de Mann-Whitney.

Ainda na população de células F4/80⁺ vimos que nos animais infectados havia um aumento na proliferação celular (Figura 21D).

Figura 21 – Análise da expressão de F4/80, CD169, CD11b e Ki67 em macrófagos da medula óssea. (A) Histograma representando a população de macrófagos F4/80+. *Dot plot* representando a marcação de CD169, CD11b e Ki67. Diminuição da expressão de CD169+CD11b+ e aumento de CD169-CD11b+ em camundongos infectados (B) em comparação ao grupo controle (C). Aumento da expressão de Ki67 em células F4/80+ de camundongos infectados (D) em comparação aos camundongos sadios (E).

5.4 Discussão

Na LV as alterações hematológicas são achados frequentes em humanos, cães e hamsteres, particularmente, a anemia (Biswas et al., 1992; Ciaramella et al., 1997; Varma e Naseem, 2010). Muito embora a leishmaniose visceral experimental seja largamente utilizada para o estudo dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na resistência e/ou susceptibilidade, durante a infecção por *L. (L.) donovani* e/ou *L. (L.) infantum*, pouco se sabe a respeito das alterações no sangue periférico em camundongos (Kumar e Nylen, 2012). Assim, propomos nesse estudo caracterizar o quadro hematológico de camundongos infectados intravenosamente com *L. (L.) donovani* bem como o perfil celular da medula óssea.

A avaliação hematológica foi realizada aos 28 dias pós-infecção, pois no modelo adotado e com a cepa utilizada sabe-se que esse período corresponde ao pico de carga parasitária nesses animais com alterações hepáticas e esplênicas marcantes (Smelt et al., 2000). Ressalta-se que mesmo o camundongo C57BL/6 seja considerado suscetível a infecção e desenvolva LV, não estendemos nossa análise para uma fase mais crônica nesses animais, porque os mesmos são capazes de controlar a infecção a partir de três semanas pós-infecção (Leclercq et al., 1996).

Na análise dos resultados voltados às alterações hematológicas, observamos que os camundongos infectados desenvolveram pancitopenia, à semelhança dos achados em pacientes, cães e hamsteres infectados com *Leishmania donovani* e/ou *Leishmania infantum* (Biswas et al., 1992; Ciaramella et al., 1997; Varma e Naseem, 2010). Foi um ponto de partida importante, indicando que nesse modelo é possível desenvolver estudos focados nos mecanismos envolvidos nas citopenias em sangue periférico.

Nas citopenias desenvolvidas em nossos animais com LV, o número de hemácias, plaquetas e leucócitos teve uma queda de 36,7%, 88% e 43%, respectivamente, quando comparados com a mediana dos camundongos saudáveis. Dentre essas alterações, a série plaquetária foi a mais afetada nesses animais. Um aspecto a ser destacado, em relação a anemia, é o aumento na porcentagem de reticulócitos, em média de quatro vezes, nos camundongos infectados em relação ao grupo controle, caracterizando um quadro de anemia regenerativa. Em geral, nas anemias regenerativas, as principais causas estão relacionadas à destruição periférica dessas células, seja por sequestro das mesmas no baço ou hemólise decorrente de infecções parasitárias e/ou por

imunocomplexos (Weiss e Goodnough, 2005; Koury e Rhodes, 2012). Em pacientes com LV, a maioria dos trabalhos descrevem casos tanto de anemia regenerativa e/ou não regenerativa (Cartwright et al., 1948; Varma e Naseem, 2010), ao contrário do cão, no qual observa-se em 70% dos casos, uma anemia não regenerativa (Koutinas et al., 1999). Como o camundongo faz hematopoiese extramedular no baço (O'Neill, 2012), não é possível saber exatamente se essa reticulocitose é na tentativa da medula óssea de restaurar a anemia ou, nos casos onde a medula óssea esteja afetada, do baço assumindo esse papel. Assim, decidimos avaliar a medula óssea desses animais, que discutimos adiante.

Na contagem diferencial de leucócitos, vimos alteração na porcentagem de linfócitos T e B e célula dendrítica. Em cães com LV, dentre as diversas alterações, observou-se uma diminuição de linfócitos T e B em sangue periférico (Reis et al., 2006). Os nossos dados sugerem que a leucopenia seja devida a uma diminuição de linfócitos B e células dendríticas, diferindo dos achados na literatura. Em humanos se observa uma leucopenia acompanhada por uma neutropenia e eosinopenia e em cães, uma leucopenia moderada ou grave devido à queda nos valores relativos de monócitos, eosinófilos, e principalmente, linfócitos (Reis et al., 2006; da Costa-Val et al., 2007). Na LV, os mecanismos que levam a leucopenia ainda não estão claros, mas alguns estudos apontam disfunção medular e/ou recrutamento de leucócitos para outros órgãos afetados pela infecção (Alvar et al., 2004).

A plaquetopenia observada nos camundongos infectados também é um achado observado em pacientes, cães e outros modelos experimentais e diferentes causas vêm sendo reportadas na literatura como displasia megacariocítica, esplenomegalia e/ou falha renal e hepática (Cartwright et al., 1948; Ferrer, 1992; Ciaramella et al., 2005; Foglia Manzillo et al., 2006).

Sabe-se que a gênese das alterações hematológicas é multifatorial e que muitas delas estão relacionadas a uma falha no processo hematopoiético na medula óssea (Amos et al., 1990). Na LV experimental, mesmo que a medula óssea seja reconhecida como um dos alvos de replicação do parasito no camundongo, pouco se sabe da interação estabelecida entre o parasito e esse órgão, bem como a expressão de fatores de crescimento e/ou citocinas que modulam a hematopoiese (Cotterel et al., 2000a). Nesses animais durante a fase adulta, a medula óssea é o principal órgão hematopoiético, embora uma pequena porcentagem de precursores mielóides seja encontrada no baço

(Gao et al., 1997). Estudos desenvolvidos em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani* tem focado particularmente o baço no estudo dos mecanismos envolvidos na expansão da atividade hematopoiética e os fatores implicados na sua patogênese (Cotterel et al., 2000a, 2000b). Nesse modelo observou-se uma rápida mobilização de células progenitoras mielóides derivadas da medula óssea para o sangue periférico, em torno de cinco horas de infecção, acompanhada de níveis elevados de GM-CSF e CCL3 (MIP-1 α). A partir de 14 dias pós-infecção, com o estabelecimento do parasito no baço e medula óssea, notou-se a ocorrência de um aumento de progenitores hematopoiéticos nesses órgãos, associado ao aumento de mRNA de GM-CSF, M-CSF e C-CSF (Cotterel et al., 2000a). Além desses dados, ainda são poucas as pesquisas voltadas para abordagem patogênica, principalmente focando a medula óssea. Na LV humana e canina, alguns estudos mostram a importância do mielograma como um parâmetro essencial para definir o prognóstico da doença (Yarali et al., 2002; Nicolato et al., 2013). Esse exame fornece informações sobre a atividade hematopoiética na medula óssea e os compartimentos celulares eventualmente comprometidos. O nosso estudo aqui apresentado é pioneiro nesta área, explorando o perfil do mielograma de camundongos C57BL/6 infectados com *L. (L.) donovani*.

No mielograma, focamos nossa análise na proporção mielóide:eritróide, índices de maturação mielóide e eritróide, bem como na contagem diferencial de linfócitos, monócitos, plasmócitos e macrófagos. Nesse contexto, as alterações mais marcantes nos camundongos com LV foram: aumento na proporção mielóide:eritróide, no índice de maturação mielóide e na porcentagem de linfócitos. Além disso, uma redução significativa na porcentagem de células eritróides nucleadas maduras. Com esses dados, vimos que esses animais desenvolviam uma hiperplasia mielóide acompanhada de uma hipoplasia eritróide e uma linfopoiese. Essas alterações, no geral, são semelhantes às aquelas reportadas em casos humanos e caninos (Yarali et al., 2002; Nicolato et al., 2013), e em outro modelo murino no que se refere à expansão das células mielóides imaturas (Cotterel et al., 2000a). Não encontramos correlação entre a porcentagem de células eritróides nucleadas maduras e o número de hemácias no sangue periférico como relatado em cães com LV (Nicolato et al., 2013). É possível que esse achado seja porque o camundongo faça hematopoiese extramedular no baço em casos onde ocorra falha de produção na medula óssea (Kim, 2010).

Além da contagem diferencial das células da medula óssea, analisamos a morfologia detalhada das séries mielóide e eritróide. Vimos que nos camundongos infectados haviam alterações displásicas particularmente na série mielóide e eritróide, com assincronia de maturação núcleo:citoplasma, eritrofagocitose e atipias celulares. A série megacariocítica não estava afetada como as demais, mas em todos os animais infectados a emperipolese estava presente. A etiopatogênese desse evento não é possível afirmar, mas esses achados são encontrados em desordens mieloproliferativas, linfomas, mielofibrose idiopática e síndromes mielodisplásicas (Schmitt et al., 2000). Na LV humana e canina, a emperipolese tem sido descrita (Yarali et al., 2002; Momo et al., 2014).

Todos esses achados apontam para uma dishematopoiese promovida pela infecção leishmaniótica. No entanto, para a confirmação dessa alteração, a combinação do exame histopatológico se fez necessária para a avaliação da celularidade, arquitetura do órgão e processos degenerativos (Bain, 2001). Assim, realizamos uma análise histopatológica do úmero de camundongos infectados em comparação aos camundongos sadios. O aumento da celularidade acompanhado pelo aumento de macrófagos foi o achado que mais se destacou nos camundongos infectados e que, juntos aos dados obtidos no mielograma, indicam uma dishematopoiese nesses animais.

Na descrição das alterações hematológicas, comentamos que não sabíamos exatamente se a reticulocitose observada nos camundongos infectados era uma resposta da medula óssea, na tentativa de recuperar a anemia. No entanto, com base nos achados no mielograma e no exame histopatológico, a medula óssea apresenta comprometimento nas suas funções hematopoiéticas com displasia medular, acompanhada de hipoplasia eritróide significativa e um infiltrado e/ou proliferação macrofágica acentuada. São dados que sugerem que a reticulocitose observada possa ser resultado de uma hematopoiese extramedular no baço, um evento bem caracterizado em camundongos (O'Neill, 2012). Em estudos realizados em hamsteres infectados com *L. (L.) donovani*, observou-se uma expressão diminuída em até 50% de genes relacionados ao processo de diferenciação eritróide na medula óssea, ao contrário do baço em que estavam todos aumentados. São dados que sugeriam a infecção tendo um efeito negativo na diferenciação dos eritroblastos, e o estresse causado pelo parasitismo, induzindo uma resposta hematopoiética extramedular esplênica (Lafuse et al., 2013). Provavelmente,

em nosso modelo também ocorra a desregulação dos fatores de diferenciação eritróide, uma vez que vimos displasias e mitoses atípicas nesse compartimento.

No exame histopatológico, os achados sugerem claramente que os macrófagos devam ter uma participação importante nas gêneses das lesões observadas na medula óssea dos camundongos infectados. Em estudos realizados em humanos e cães com LV, ocorreram em medula óssea um aumento importante dessas células com formações semelhantes a granulomas com padrão semelhante aos observados em nosso estudo (Daneshbod et al., 2010; Momo et al., 2014). Para melhor entender a participação desse achado na patogenia, partimos para identificar o tipo de macrófagos, se inflamatórios e/ou estromais. Inicialmente, utilizamos na microscopia confocal, um marcador clássico F4/80 expresso particularmente na superfície dessas células. Além disso, combinamos os marcadores CD169 e CD11b que são também largamente utilizados para distinção fenotípica de macrófagos por citometria de fluxo (Davies et al., 2013). Avaliamos ainda se havia proliferação celular nessas células utilizando o marcador Ki67 (Scholzen e Gerdes, 2000).

Na imunomarcação em tecido de medula óssea dos camundongos infectados, mostramos claramente um aumento significativo da expressão de células F4/80⁺. Portanto, confirmamos que as células observadas no exame histopatológico são macrófagos estromais e que, em ambas as análises, a distribuição dessas células é bastante similar, ocorrendo em toda a extensão da medula óssea. No trabalho realizado por Cotterel et al. (2000a) foi demonstrado que macrófagos estromais da medula óssea e outras células da linhagem macrofágica podem ser infectadas por *L. (L.) donovani*. Diante desses achados, tentamos identificar se em nosso modelo, os macrófagos estromais também estavam parasitados. A imunomarcação confirmou na medula óssea a presença do parasita e sua co-localização com essas células, mostrando que os macrófagos estromais são afetados diretamente pela ação da *Leishmania*. No entanto, nem todas as células F4-80⁺ estavam parasitadas e algumas células F4/80⁻ tinham em seu interior o parasito.

A expansão macrofágica e dos parasitos na medula óssea, sugere a participação ativa do parasito na regulação dessas células e consequentemente na gênese das lesões observadas. Em um estudo com modelo murino, foram vistos que macrófagos estromais medulares infectados por *L. (L.) donovani* e que podem aumentar a mielopoiese por uma produção excessiva de GM-CSF e TNF- α (Cotterell et al., 2000b). Outros estudos

sugerem que o aumento paralelo de células mielóides imaturas favorece um ambiente seguro para replicação do parasito, embora prefiram infectar macrófagos maduros (Davies et al., 1988). A hiperplasia de macrófagos e outros fagócitos nesses órgãos, concomitantemente com a falha na produção de eritrócitos, leva a hiperplasia esplênica e a anemia características da LV (Lafuse et al., 2013).

Ainda na caracterização dos macrófagos estromais por citometria de fluxo, confirmamos que a população F4/80⁺ estava aumentada como visto pela microscopia confocal. Como o F4/80 é um marcador expresso em outras células mielóides, mesmo que em menor intensidade, a combinação de outros marcadores foi essencial para a identificação dessas células, particularmente o CD169 por ser uma sialoadesina expressa em macrófagos estromais da medula óssea responsáveis pela retenção de precursores hematopoiéticos nos nichos endosteal e/ou perivascular (Chow et al., 2011). Assim, a população F4/80⁺ que examinamos, aproximadamente 70% das células eram CD169⁺. Quando acrescentamos o marcador CD11b vimos que 50% das células eram F4/80⁺CD169⁺CD11b⁺ e que, durante o processo infeccioso, sofreu uma redução significativa nessa população.

A perda de CD169 nos macrófagos sugere que a infecção leishmaniótica, nessa população celular, regule essa molécula importante para a manutenção da homeostasia na medula óssea. Demonstrou-se em modelo murino que a perda dessa sialodesina interfere particularmente na eritropoiese, já que a mesma é importante para a manutenção dos progenitores eritróides no nicho até completarem o estágio de diferenciação (Chow et al., 2011).

A expansão de macrófagos em tecidos durante um quadro patológico é comum e determinante na modulação da resposta imune e a recuperação tecidual (Gentek et al., 2014). Entretanto, somente nos últimos anos, a contribuição do recrutamento de monócitos e a proliferação local têm sido pesquisadas mais cuidadosamente, uma vez que não se sabe ainda se a expansão local de macrófagos é suficiente para regulação da progressão da doença, sem a necessidade de um recrutamento acentuado de monócitos do sangue periférico (Murphy e Tall, 2014). Estudos realizados por Jenkins et al. (2011) demonstraram que a expansão das células inatas necessárias para controlar um patógeno e reparo de feridas pode ser feita exclusivamente com a proliferação macrofágica local envolvendo citocinas do perfil Th-2. Diante desse contexto e dos nossos achados que demonstram claramente uma expansão macrofágica na medula óssea, tentamos

identificar a taxa de proliferação dessas células. Utilizando o marcador de proliferação Ki67 vimos que a população F4/80⁺ Ki67⁺ dos animais infectados estava aumentada em comparação aos camundongos não infectados. Esse dado sugere que a infecção induz uma expansão local dessas células que podem se tornar fontes importantes de mediadores capazes de estimular e/ou inibir a hematopoiese. Além disso, sabe-se da participação de citocinas TNF- α e IFN- γ , produzidas por macrófagos estromais na medula óssea na gênese das síndromes mielodisplásicas em pacientes humanos de etiologia diversas (Kitagawa et al., 1997).

5.5 Conclusão

Com base no exposto, demonstramos pela primeira vez que o camundongo C57BL/6 quando infectado por *L. (L.) donovani* desenvolve pancitopenia e que leva a uma disfunção na medula óssea com expansão de macrófagos estromais. A caracterização desses macrófagos e os elementos implicados na hematopoiese necessitam de estudos aprofundados para o entendimento do mecanismo patogênico da pancitopenia.

6 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os dados aqui apresentados sugerem que as alterações hematológicas são marcadores de progressão da LV e a pancitopenia indica um quadro mais severo em cães com LV, o que é vagamente discutido na literatura. Para elucidar a gênese dessas alterações focamos na análise da medula óssea que revelou estar comprometida com evidências de uma dishematopoiese. Acreditamos que esse processo seja regulado pela expansão macrofágica observada nesse órgão onde se produzem citocinas que afetam a hematopoiese. De fato, certificamos o aumento da expressão de GM-CSF, IL-3, IL-7, TNF- α , e IFN- γ , particularmente, nos cães bicitopênicos. IGF-I foi o único fator regulado negativamente em cães pancitopênicos.

Estendemos essa mesma abordagem para modelo murino pela disponibilidade de marcadores que possibilitam análises detalhadas de elementos participantes do processo patológico. Pela primeira vez, demonstramos que o camundongo C57BL/6 desenvolve pancitopenia quando infectado por *L. (L.) donovani*, desenvolvendo alterações na medula óssea muito similares ao cão. Um dado bastante interessante, pois mesmo estudando infecções por espécies diferentes de *Leishmania*, i.e. *L. (L.) donovani* ou *L. (L.) infantum*, o padrão de lesão na medula óssea foi o mesmo nos dois modelos animais, mostrando hiperplasia de células estromais. Esses dados reforçam a idéia de que a expansão macrofágica é um elemento crucial que leva a perturbações na hematopoiese. Iniciamos a caracterização desses macrófagos, mas o processo de sua diferenciação e os fatores de crescimento/citocinas implicados na hematopoiese necessitam de estudos aprofundados para o entendimento dos mecanismos patogênicos da pancitopenia visando inclusive alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

- Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1991; 13 (5): 537-50.
- Agrawal Y, Sinha A, Upadhyaya P, Kafle S, Rijal S, Khanal B. Hematological profile in visceral leishmaniasis *Int J Infect Microbiol* 2013; 2: 39-44.
- Aiello FB, Keller JR, Klarmann KD, Dranoff G, Mazzucchelli R, Durum SK. IL-7 induces myelopoiesis and erythropoiesis. *J Immunol.* 2007; 178 (3): 1553-63.
- al-Jurayyan NA, al-Nasser MN, al-Fawaz IM, al Aayed IH, al Herbish AS, al-Mazrou AM, et al. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. *J Trop Pediatr.* 1995; 41 (3): 143-8.
- Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM. Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2005; 127 (3-4): 227-32.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57: 1-88.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012; 7 (5): e35671.
- Amos RJ, Deane M, Ferguson C, Jeffries G, Hinds CJ, Amess JA. Observations on the haemopoietic response to critical illness. *J Clin Pathol.* 1990; 43 (10): 850-6.
- Amusatogui I, Sainz A, Rodriguez F, Tesouro MA. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur J Epidemiol.* 2003; 18 (2): 147-56.
- Anosa VO, Idowu AL. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1983; 30 (8): 600-8.
- Ansari NA, Kumar R, Gautam S, Nylen S, Singh OP, Sundar S, et al. IL-27 and IL-21 are associated with T cell IL-10 responses in human visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 2011; 186 (7): 3977-85.
- Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. *Clin Immunol.* 2006; 119 (3): 339-45.
- Antinori S, Cascio A, Parravicini C, Bianchi R, Corbellino M. Leishmaniasis among organ transplant recipients. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8 (3): 191-9.

- Arkins S, Rebeiz N, Brunke-Reese DL, Biragyn A, Kelley KW. Interferon-gamma inhibits macrophage insulin-like growth factor-I synthesis at the transcriptional level. *Mol Endocrinol*. 1995; 9 (3): 350-60.
- Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1986; 154 (6): 1003-11.
- Badaro R, Jones TC, Lorenco R, Cerf BJ, Sampaio D, Carvalho EM, et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis*. 1986; 154 (4): 639-49.
- Bain BJ. Bone marrow trephine biopsy. *J Clin Pathol*. 2001; 54 (10): 737-42.
- Barral-Netto M, Badaro R, Barral A, Almeida RP, Santos SB, Badaro F, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 199; 163(4): 853-7.
- Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am J Trop Med Hyg*. 1996; 55 (3): 273-7.
- Binhazim AA, Chapman WL, Jr., Shin SS, Hanson WL. Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania leishmania infantum* in hamsters and dogs. *Am J Vet Res*. 1993; 54 (1): 113-21.
- Biswas T, Chakraborty M, Naskar K, Ghosh DK, Ghosal J. Anemia in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. *J Parasitol*. 1992; 78 (1): 140-2.
- Blackwell JM. *Leishmania donovani* infection in heterozygous and recombinant H-2 haplotype mice. *Immunogenetics*. 1983; 18 (2): 101-9.
- Blackwell JM, Roach TI, Kiderlen A, Kaye PM. Role of Lsh in regulating macrophage priming/activation. *Res Immunol*. 1989; 140 (8): 798-805.
- Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, et al. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2004; 70 (1): 72-7.
- Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-Andre I, Chabanne L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997; 56 (3-4): 345-51.
- Boyer SH, Bishop TR, Rogers OC, Noyes AN, Frelin LP, Hobbs S. Roles of erythropoietin, insulin-like growth factor 1, and unidentified serum factors in promoting maturation of purified murine erythroid colony-forming units. *Blood*. 1992; 80 (10): 2503-12.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Nota Técnica Conjunta nº 01/2011. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

Broxmeyer HE, Lu L, Cooper S, Tushinski R, Mochizuki D, Rubin BY, et al. Synergistic effects of purified recombinant human and murine B cell growth factor-1/IL-4 on colony formation in vitro by hematopoietic progenitor cells. Multiple actions. *J Immunol.* 1988; 141 (11): 3852-62.

Bruin A, Voermans C , Nolte M. Impact of interferon- γ on hematopoies. *Blood.* 2014; 3: 2479-86.

Bulla C, Kiomi Takahira R, Pessoa Araujo J, Jr., AparecidaTrinca L, Souza Lopes R , Wiedmeyer CE. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet Res.* 2004; 35 (1): 141-6.

Burgess AW , Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood.* 1980; 56 (6): 947-58.

Cartwright GE, Chung HL , Chang A. Studies on the pancytopenia of kala-azar. *Blood.* 1948; 3 (3): 249-75.

Carvalho MD, Alonso DP, Vendrame CM, Costa DL, Costa CH, Werneck GL, et al. Lipoprotein lipase and PPAR alpha gene polymorphisms, increased very-low-density lipoprotein levels, and decreased high-density lipoprotein levels as risk markers for the development of visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 230129.

Çelik U, Leblebisatan G, Alhan E , Aksaray N. Immune hemolytic anemia in association with visceral leishmaniasis. *J Pediatr Inf.* 2007; 1: 36-8.

Chandra H, Chandra S , Kaushik RM. Visceral leishmaniasis with associated common, uncommon, and atypical morphological features on bone marrow aspirate cytology in nonendemic region. *J Trop Med.* 2013;2013: 861032.

Cheers C, Haigh AM, Kelso A, Metcalf D, Stanley ER , Young AM. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of macrophage-, granulocyte-, granulocyte-macrophage-, and multi-CSFs. *Infect Immun.* 1988; 56 (1): 247-51.

Chow A, Lucas D, Hidalgo A, Mendez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, et al. Bone marrow CD169+ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med.* 2011; 208 (2): 261-71.

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

Ciaramella P, Pelagalli A, Cortese L, Pero ME, Corona M, Lombardi P, et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J.* 2005; 169 (3): 465-7.

Cohick WS , Clemmons DR. The insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol.* 1993; 55: 131-53.

Cotterell SE, Engwerda CR , Kaye PM. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect Immun*. 2000; 68 (4): 1840-8.

Cotterell SE, Engwerda CR , Kaye PM. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF- α . *Blood*. 2000; 95 (5): 1642-51.

Crocker PR, Blackwell JM , Bradley DJ. Expression of the natural resistance gene *Lsh* in resident liver macrophages. *Infect Immun*. 1984; 43 (3): 1033-40.

Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodriguez A , Alvar J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet*. 2002; 359 (9312): 1124-5.

da Costa-Val AP, Cavalcanti RR, de Figueiredo Gontijo N, Michalick MS, Alexander B, Williams P, et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Vet J*. 2007; 174 (3): 636-43.

Dagnone AS, de Moraes HS, Vidotto MC, Jojima FS , Vidotto O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Vet Parasitol*. 2003; 117 (4): 285-90.

Dameshek W , Miller EB. The megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura, a form of hypersplenism. *Blood*. 1946; 1: 27-50.

Daneshbod Y, Dehghani SJ , Daneshbod K. Bone marrow aspiration findings in kala-azar. *Acta Cytol*. 2010; 54 (1): 12-24.

Davidson DE, Jr., Dill GS, Jr., Tingpalapong M, Premabutra S, Nguen PL, Stephenson EH, et al. Canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia) in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1975; 6 (4): 540-3.

Davies EV, Singleton AM , Blackwell JM. Differences in *Lsh* gene control over systemic *Leishmania major* and *Leishmania donovani* or *Leishmania mexicana mexicana* infections are caused by differential targeting to infiltrating and resident liver macrophage populations. *Infect Immun*. 1988; 56 (5): 1128-34.

Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE , Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013; 14 (10): 986-95.

de Bruin AM, Demirel O, Hooibrink B, Brandts CH , Nolte MA. Interferon-gamma impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood*. 2013; 121 (18): 3578-85.

de Luna R, Ferrante M, Severino L, Ambrosio R, Piantedosi D, Gradoni L, et al. Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *J Comp Pathol*. 2000; 122 (2-3): 213-6.

Deane LM , Deane LP. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1962; 4: 198-212.

Deane LM , Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como reservatórios da *L. donovani* em área endêmica da calazar no Ceará. Hospital. 1955; 48: 61-70.

Dey A , Singh S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. Indian J Med Microbiol. 2006; 24 (3): 165-70.

Dhingra KK, Gupta P, Saroha V, Setia N, Khurana N , Singh T. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral Kala Azar: a review. Indian J Pathol Microbiol. 2010; 53 (1): 96-100.

Dilber E, Erduran E , Isik Y. Visceral leishmaniasis and Coombs' positive hemolytic anemia: a rare association in an infant treated with liposomal amphotericin B. Turk J Pediatr. 2002; 44 (4): 354-6.

Donahue RE, Wang EA, Stone DK, Kamen R, Wong GG, Sehgal PK, et al. Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. Nature. 1986; 321 (6073): 872-5.

Drumond KO , Costa FA. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2011; 53 (1): 3-11.

Engwerda CR, Ato M , Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends Parasitol. 2004; 20 (11): 524-30.

Fan J, Char D, Bagby GJ, Gelato MC , Lang CH. Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by tumor necrosis factor. Am J Physiol. 1995; 269 (5 Pt 2): R1204-12.

Faria A , Andrade H. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. Rev Pan-Amaz Saude 2012; 3: 47-57.

Ferrer L. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD, editors. Current veterinary therapy XI. Philadelphia: WB Saunders, 1992. P. 266-70.

Ferroglio E, Maroli M, Gastaldo S, Mignone W , Rossi L. Canine leishmaniasis, Italy. Emerg Infect Dis. 2005; 11 (10): 1618-20.

Foglia Manzillo V, Restucci B, Pagano A, Gradoni L , Oliva G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. Vet Rec. 2006; 158 (20): 690-4.

Franca-Silva JC, da Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, da Costa CA, Mayrink W, et al. Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. Vet Parasitol. 2003; 111 (2-3): 161-73.

Gao JL, Wynn TA, Chang Y, Lee EJ, Broxmeyer HE, Cooper S, et al. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. J Exp Med. 1997; 185 (11): 1959-68.

Gentek R, Molawi K , Sieweke MH. Tissue macrophage identity and self-renewal. *Immunol Rev.* 2014; 262 (1): 56-73.

Ghalib HW, Whittle JA, Kubin M, Hashim FA, el-Hassan AM, Grabstein KH, et al. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *J Immunol.* 1995; 154 (9): 4623-9.

Gibson LF, Piktel D , Landreth KS. Insulin-like growth factor-1 potentiates expansion of interleukin-7-dependent pro-B cells. *Blood.* 1993; 82 (10): 3005-11.

Giunchetti RC, Mayrink W, Genaro O, Carneiro CM, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA, et al. Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.* 2006; 135 (2-3): 100-7.

Gkolfinopoulou K, Bitsolas N, Patrinos S, Veneti L, Marka A, Dougas G, et al. Epidemiology of human leishmaniasis in Greece, 1981-2011. *Euro Surveill.* 2013; 18 (29): 20532.

Goto H , Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012; 26 (2): 293-307.

Grabstein KH, Urdal DL, Tushinski RJ, Mochizuki DY, Price VL, Cantrell MA, et al. Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science.* 1986; 232 (4749): 506-8.

Grimaldi G, Jr., Teva A, Ferreira AL, dos Santos CB, Pinto I, de-Azevedo CT, et al. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP(R) CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106 (1): 54-9.

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Alvar J, et al. Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. *Res Vet Sci.* 2000; 69 (3): 249-53.

Guerra LL, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Martins-Filho OA, Reis AB , Correa-Oliveira R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2009; 104 (3): 611-22.

Halvorsen S , Bechensteen AG. Physiology of erythropoietin during mammalian development. *Acta Paediatr Suppl.* 2002; 91 (438): 17-26.

Hamilton JA , Anderson GP. GM-CSF Biology. *Growth Factors.* 2004; 22 (4): 225-31.

Hasegawa WY. Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral celular (tese) São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2005.

Harvey J. Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. 1thed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2001.

Heidenreich S, Gong JH, Schmidt A, Nain M , Gemsa D. Macrophage activation by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Priming for enhanced release of tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E2. *J Immunol.* 1989; 143 (4): 1198-205.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999; 354 (9185): 1191-9.

Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K , Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999; 10 (1): 41-60.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S , Sachs JD. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med.* 2006; 3 (5): e102.

Hotez PJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C , Breman JG. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis.* 2004; 38 (6): 871-8.

Humbel RE. Insulin-like growth factors I and II. *Eur J Biochem.* 1990; 190 (3): 445-62.

Humble JG, Jayne WH , Pulvertaft RJ. Biological interaction between lymphocytes and other cells. *Br J Haematol.* 1956; 2 (3): 283-94.

Ihle JN. Interleukin-3 and hematopoiesis. *Chem Immunol.* 1992; 51: 65-106.

Jacobsen SE, Ruscetti FW, Dubois CM , Keller JR. Tumor necrosis factor alpha directly and indirectly regulates hematopoietic progenitor cell proliferation: role of colony-stimulating factor receptor modulation. *J Exp Med.* 1992; 175 (6): 1759-72.

Jansen JH, Wientjens GJ, Fibbe WE, Willemze R , Kluin-Nelemans HC. Inhibition of human macrophage colony formation by interleukin 4. *J Exp Med.* 1989; 170 (2): 577-82.

Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science.* 2011; 332 (6035): 1284-8.

Johnson GR, Gonda TJ, Metcalf D, Hariharan IK , Cory S. A lethal myeloproliferative syndrome in mice transplanted with bone marrow cells infected with a retrovirus expressing granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *EMBO J.* 1989; 8 (2): 441-8.

Jones JJ , Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev.* 1995; 16 (1): 3-34.

Kar M , Ghosh A. Pancytopenia. *J Indian Acad Clin Med.* 2002; 3: 229-34.

Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest.* 1993; 91(4): 1644-8.

Kaye P , Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9 (8): 604-15.

Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK , Johnson AJ. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet Pathol.* 1984; 21 (1): 74-9.

Keller DC, Du XX, Srour EF, Hoffman R , Williams DA. Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures. *Blood.* 1993; 82 (5): 1428-35.

Khazen W, M'Bika J P, Tomkiewicz C, Benelli C, Chany C, Achour A, et al. Expression of macrophage-selective markers in human and rodent adipocytes. *FEBS Lett.* 2005; 579 (25): 5631-4.

Khodke K, Marwah S, Buxi G, Yadav R , Chaturvedi N. Bone Marrow Examination in Cases of Pancytopenia. *J Indian Acad Clin Med.* 2001; 2: 55-9.

Killick-Kendrick R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990; 65 Suppl 1: 37-42.

Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med.* 2010; 1: 13-9.

Kitagawa M, Saito I, Kuwata T, Yoshida S, Yamaguchi S, Takahashi M, et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 1997; 11 (12): 2049-54.

Kopterides P, Halikias S , Tsavaris N. Visceral leishmaniasis masquerading as myelodysplasia. *Am J Hematol.* 2003; 74 (3): 198-9.

Koury MJ , Rhodes M. How to approach chronic anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012; 2012: 183-90.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A , Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999; 35 (5): 376-83.

Kumar R , Engwerda C. Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunol.* 2014; 3: 1-6.

Kumar PV, Vasei M, Sadeghipour A, Sadeghi E, Soleimanpour H, Mousavi A, et al. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2007 29(2): 77-80.

Kumar R , Nylen S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol.* 2012; 3: 251.

Kurkjian KM, Mahmutovic AJ, Kellar KL, Haque R, Bern C , Secor WE. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A.* 2006; 69 (5): 353-8.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Dendrick R. editors. *The leishmaniasis in biology and medicine.* London: Academic Press; 1987; 1-20.

Lafuse WP, Story R, Mahylis J, Gupta G, Varikuti S, Steinkamp H, et al. Leishmania donovani infection induces anemia in hamsters by differentially altering erythropoiesis in bone marrow and spleen. *PLoS One.* 2013; 8 (3): e59509.

Lang RA, Metcalf D, Cuthbertson RA, Lyons I, Stanley E, Kelso A, et al. Transgenic mice expressing a hemopoietic growth factor gene (GM-CSF) develop accumulations of macrophages, blindness, and a fatal syndrome of tissue damage. *Cell.* 1987; 51 (4): 675-86.

Leclercq V, Lebastard M, Belkaid Y, Louis J , Milon G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice: a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. *J Immunol.* 1996; 157 (10): 4537-45.

Lelchuk R, Graveley R , Liew FY. Susceptibility to murine cutaneous leishmaniasis correlates with the capacity to generate interleukin 3 in response to leishmania antigen in vitro. *Cell Immunol.* 1988; 111 (1): 66-76.

Leontides LS, Saridomichelakis MN, Billinis C, Kontos V, Koutinas AF, Galatos AD, et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol.* 2002; 109 (1-2): 19-27.

Long E, Huynh HT , Zhao X. Involvement of insulin-like growth factor-1 and its binding proteins in proliferation and differentiation of murine bone marrow-derived macrophage precursors. *Endocrine.* 1998; 9 (2): 185-92.

Lukes J, Mauricio IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104 (22): 9375-80.

Malla N , Mahajan RC. Pathophysiology of visceral leishmaniasis - some recent concepts. *Indian J Med Res.* 2006; 123 (3): 267-74.

Martin A, Marques L, Soler-Palacin P, Caragol I, Hernandez M, Figueras C, et al. Visceral leishmaniasis associated hemophagocytic syndrome in patients with chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2009; 28 (8): 753-4.

- Martinez-Moreno A, Martinez-Cruz MS, Blanco A , Hernandez-Rodriguez S. Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 1993; 51 (1-2): 49-59.
- Marwaha N, Sarode R, Gupta RK, Garewal G , Dash S. Clinico-hematological characteristics in patients with kala azar. A study from north-west India. *Trop Geogr Med.* 1991; 43 (4): 357-62.
- Mauricio IL, Stothard JR , Miles MA. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 2000; 16 (5): 188-9.
- Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L , Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. *Pediatrics.* 1999; 104 (5): e65.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W , Coe JE. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol.* 2001; 166 (3): 1912-20.
- Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood.* 1986; 67 (2): 257-67.
- Metcalf D. The Florey Lecture, 1991. The colony-stimulating factors: discovery to clinical use. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1991; 333 (1266): 147-73.
- Metcalf D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood.* 1993; 82 (12): 3515-23.
- Metcalf D, Begley CG, Nicola NA , Johnson GR. Quantitative responsiveness of murine hemopoietic populations in vitro and in vivo to recombinant multi-CSF (IL-3). *Exp Hematol.* 1987; 15 (3): 288-95.
- Michel G, Simonin G, Perrimond H , Coignet J. [Syndrome of activation of the mononuclear phagocyte system. Initial manifestation of visceral leishmaniasis]. *Arch Fr Pediatr.* 1988; 45 (1): 45-6.
- Migone L. Un caso de kala-zar a Asunción (Paraguay). *Bull Soc Path Exot.* 1913; 6: 118-20.
- Mirkovich AM, Galelli A, Allison AC , Modabber FZ. Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin Exp Immunol.* 1986; 64 (1): 1-7.
- Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andres M, Gonzalez F, Castillo JA, et al. Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1994; 88 (4): 491-3.
- Momo C, Jacintho AP, Moreira PR, Munari DP, Machado GF , Vasconcelos Rde O. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Med Int.* 2014; 2014: 150582.

Moreno J , Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* 2002; 18 (9): 399-405.

Moreno J, Nieto J, Chamizo C, Gonzalez F, Blanco F, Barker DC, et al. The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 71 (3-4): 181-95.

Murphy AJ , Tall AR. Proliferating macrophages populate established atherosclerotic lesions. *Circ Res.* 2014; 114 (2): 236-8.

Murray HW, Stern JJ, Welte K, Rubin BY, Carriero SM , Nathan CF. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. *J Immunol.* 1987; 138 (7): 2290-7.

Nicolato RdC, de Abreu RT, Roatt BM, Aguiar-Soares RD, Reis LE, Carvalho M, et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS One.* 2013; 8 (12): e82947.

Nicolle C , Comte M. Recherches sur kala-azar entreprises a l'Institut Pasteur de Tunis, IV. Origine canine du kala-azar. *Arch Inst Pasteur Tunis.* 1908; 3: 59-62.

Nobes P , Carter A. Reticulocyte counting using flow cytometry. *J Clin Pathol.* 1990; 43: 675-8.

Nylen S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S , Sacks D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med.* 2007; 204 (4): 805-17.

Nylen S , Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007; 28 (9): 378-84.

O'Neill H. Niches for Extramedullary Hematopoiesis in the Spleen Niche. 2012; 1: 12-6.

Perez LE, Chandrasekar B, Saldarriaga OA, Zhao W, Arteaga LT, Travi BL, et al. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol.* 2006; 176 (9): 5519-28.

Petanides TA, Koutinas AF, Mylonakis ME, Day MJ, Saridomichelakis MN, Leontides LS, et al. Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med.* 2008; 22 (4): 866-72.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (9): e45.

Pinelli E, Gonzalo RM, Boog CJ, Rutten VP, Gebhard D, del Real G, et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected

macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. *Eur J Immunol.* 1995; 25 (6): 1594-600.

Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994; 62 (1): 229-35.

Pinelli E, Rutten VP, Bruysters M, Moore PF, Ruitenbergh EJ. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum*-infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T-cell proliferation and gamma interferon production. *Infect Immun.* 1999; 67 (1): 237-43.

Pinho FA, Magalhaes NA, Silva KR, Carvalho AA, Oliveira FL, Ramos-Sanchez EM, et al. Divergence between hepatic insulin-like growth factor (IGF)-I mRNA expression and IGF-I serum levels in *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013; 151 (1-2): 163-7.

Pippard MJ, Moir D, Weatherall DJ, Lenicker HM. Mechanism of anaemia in resistant visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* 1986; 80 (3): 317-23.

Queiroz MJ, Alves JG, Correia JB. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *J Pediatr (Rio J).* 2004; 80 (2): 141-6.

Quesenberry PJ. Synergistic hematopoietic growth factors. *Int J Cell Cloning.* 1986; 4 (1): 3-15.

Raskin R, Messick J. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and Evaluation. *Vet Clin Small Anim* 2012; 42: 23-42.

Ratajczak MZ, Kuczynski WI, Onodera K, Moore J, Ratajczak J, Kregenow DA, et al. A reappraisal of the role of insulin-like growth factor I in the regulation of human hematopoiesis. *J Clin Invest.* 1994; 94 (1): 320-7.

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

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Giunchetti RC, Guerra LL, Carvalho MG, Mayrink W, et al. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin Exp Immunol.* 2006; 146 (2): 303-11.

Rennick D, Yang G, Muller-Sieburg C, Smith C, Arai N, Takabe Y, et al. Interleukin 4 (B-cell stimulatory factor 1) can enhance or antagonize the factor-dependent growth of hemopoietic progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84 (19): 6889-93.

Ristic M, Huxsoll DL, Weisiger RM, Hildebrandt PK, Nyindo MB. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. *Infect Immun.* 1972; 6 (3): 226-31.

Roberts MT. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* 2005; 75-76: 115-30.

Rodriguez-Tarduchy G, Collins MK, Garcia I , Lopez-Rivas A. Insulin-like growth factor-I inhibits apoptosis in IL-3-dependent hemopoietic cells. *J Immunol.* 1992; 149 (2): 535-40.

Ross R. Further notes on leishman's bodies. *Br Med J.* 1903; 2 (2239): 1401.

Sacks DL, Lal SL, Shrivastava SN, Blackwell J , Neva FA. An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *J Immunol.* 1987; 138 (3): 908-13.

Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A , Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood.* 2000; 96 (4): 1342-7.

Scholzen T , Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182 (3): 311-22.

Shahriar D, Reza MP, Reza AM, Faramarz S. Cytological clues of bone marrow findings in Kala-azar. *Diagnostic Cytopathol.* 1999 Apr; 20(4): 208-211.

Shalita-Chesner M, Katz J, Shemer J , Werner H. Regulation of insulin-like growth factor-I receptor gene expression by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 176 (1-2): 1-12.

Silva LS. Erliquiose e anaplasmoses canina em Teresina, Piauí (dissertação). Teresina: Universidade Federal do Piauí; 2010.

Sinha R, Datta U , Sehgal S. Importance of bone marrow culture for diagnosis of Kala azar. *Scand J Infect Dis.* 1993; 25 (6): 787-9.

Sivan B, Lilos P , Laron Z. Effects of insulin-like growth factor-I deficiency and replacement therapy on the hematopoietic system in patients with Laron syndrome (primary growth hormone insensitivity). *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2003; 16 (4): 509-20.

Sjogren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, et al. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96 (12): 7088-92.

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

Smelt SC, Cotterell SE, Engwerda CR , Kaye PM. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol.* 2000; 164 (7): 3681-8.

Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, et al. The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 2000; 90 (1-2): 37-45.

- Solano-Gallego L, Miro G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2011; 4: 86.
- Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniosis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol*. 2001; 39 (2): 560-3.
- Sonoda Y, Okuda T, Yokota S, Maekawa T, Shizumi Y, Nishigaki H, et al. Actions of human interleukin-4/B-cell stimulatory factor-1 on proliferation and differentiation of enriched hematopoietic progenitor cells in culture. *Blood*. 1990; 75 (8): 1615-21.
- Soon L, Flechner L, Gutkind JS, Wang LH, Baserga R, Pierce JH, et al. Insulin-like growth factor I synergizes with interleukin 4 for hematopoietic cell proliferation independent of insulin receptor substrate expression. *Mol Cell Biol*. 1999; 19 (5): 3816-28.
- Stasi R, Brunetti M, Bussa S, Conforti M, Martin LS, La Presa M, et al. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha predict response to recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndrome. *Clin Lab Haematol*. 1997; 19 (3): 197-201.
- Sundar SR, M. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9: 951-8.
- Tafuri WL, de Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL. Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*. 2001; 96 (3): 203-12.
- Temiz F, Gurbuz BB, Leblebisatan G, Ozkan A, Canoz PY, Harmanogullari S, et al. An association of leishmaniosis and dyserythropoiesis in children. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2014; 30 (1): 19-21.
- Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*. 2006; 34 (5): 548-65.
- Tropia de Abreu R, Carvalho M, Carneiro CM, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, et al. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with leishmania (*Leishmania*) chagasi. *PLoS One*. 2011; 6 (5): e18873.
- Valentinis B, Romano G, Peruzzi F, Morriene A, Prisco M, Soddu S, et al. Growth and Differentiation Signals by the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor in Hemopoietic Cells Are Mediated through Different Pathways. *J Biol Chem*. 1999; 30: 12423-30.
- van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26 (2): 309-22.
- Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral leishmaniosis/kala azar. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2010; 26 (3): 78-82.

- Vellenga E, de Wolf JT, Beentjes JA, Esselink MT, Smit JW , Halie MR. Divergent effects of interleukin-4 (IL-4) on the granulocyte colony-stimulating factor and IL-3-supported myeloid colony formation from normal and leukemic bone marrow cells. *Blood*. 1990; 75 (3): 633-7.
- Vidal S, Tremblay ML, Govoni G, Gauthier S, Sebastiani G, Malo D, et al. The *Ity/Lsh/Bcg* locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the *Nramp1* gene. *J Exp Med*. 1995; 182 (3): 655-66.
- Wajant H, Pfizenmaier K , Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003; 10 (1): 45-65.
- Walton RM, Modiano JF, Thrall MA , Wheeler SL. Bone marrow cytological findings in 4 dogs and a cat with hemophagocytic syndrome. *J Vet Intern Med*. 1996; 10(1): 7-14.
- Wang CQ, Udupa KB , Lipschitz DA. Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol*. 1995; 162 (1): 134-8.
- Warren MK , Ralph P. Macrophage growth factor CSF-1 stimulates human monocyte production of interferon, tumor necrosis factor, and colony stimulating activity. *J Immunol*. 1986; 137 (7): 2281-5.
- Weiss G , Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med*. 2005; 352 (10): 1011-23.
- Welniak LA, Karas M, Yakar S, Anver MR, Murphy WJ , LeRoith D. Effects of organ-specific loss of insulin-like growth factor-I production on murine hematopoiesis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2004; 10 (1): 32-9.
- Werneck GL. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2010; 26: 644-5.
- White AC, Jr., Castes M, Garcia L, Trujillo D , Zambrano L. *Leishmania chagasi* antigens recognized in cured visceral leishmaniasis and asymptomatic infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1992; 46 (2): 123-31.
- Woodruff AW, Topley E, Knight R , Downie CG. The anaemia of kala-azar. *Br J Haematol*. 1972; 22 (3): 319-29.
- Woody BJ , Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1991; 21 (1): 75-98.
- Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96 (13): 7324-9.
- Yamaguchi R, French T, Simpson C , Harvey J. *Leishmania donovani* in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1983; 19: 723-6.

Yang M, Busche G, Ganser A , Li Z. Morphology and quantitative composition of hematopoietic cells in murine bone marrow and spleen of healthy subjects. *Ann Hematol.* 2013; 92 (5): 587-94.

Yarali N, Fisgin T, Duru F , Kara A. Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. *Am J Hematol.* 2002; 71 (3): 191-5.

Zhang Y, Harada A, Bluethmann H, Wang JB, Nakao S, Mukaida N, et al. Tumor necrosis factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF alpha in vitro. *Blood.* 1995; 86 (8): 2930-7.

Zoller EE, Lykens JE, Terrell CE, Aliberti J, Filipovich AH, Henson PM, et al. Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation. *J Exp Med.* 2011; 208 (6): 1203-14.

Zoumbos N, Symeonidis A, Kourakli A, Katevas P, Matsouka P, Perraki M, et al. Increased levels of soluble interleukin-2 receptors and tumor necrosis factor in serum of patients with myelodysplastic syndromes. *Blood.* 1991; 77 (2): 413-4.

APÊNCICE

APÊNDICE A – Ficha de avaliação das manifestações clínicas

Identificação
Animal nº _____
Sexo: Macho (☐) Fêmea (☐); Cor: _____
Peso: _____ Kg; Idade: _____
Procedência: _____
Diagnóstico: Sorológico _____ Parasitológico _____
Cultura _____

Exame clínico
Emagrecimento: Sim (☐) Não (☐) Alopecia: Sim (☐) Não (☐)
Descamação furfurácea na pele (seborréia): Sim (☐) Não (☐) Queratite: Sim (☐) Não (☐)
Lesões na pele: Sim (☐) Não (☐)
- Localização: Focinho (☐) Orelha (☐) Extremidades (☐) Outros _____
Ulcerações na pele: Sim (☐) Não (☐)
- Localização: Focinho (☐) Orelha (☐) Extremidades (☐) Outros _____
Despigmentação no focinho: Sim (☐) Não (☐)
Nódulos Subcutâneos: Sim (☐) Não (☐) Onicogribose: Sim (☐) Não (☐) Conjuntivite: Sim (☐) Não (☐)
Edema: Sim (☐) Não (☐) Apatia: Sim (☐) Não (☐)
Febre: Sim (☐) Não (☐) Mucosas pálidas: Sim (☐) Não (☐)
Coriza: Sim (☐) Não (☐) Tosse: Sim (☐) Não (☐) Epistaxe: Sim (☐) Não (☐) Espirro: Sim (☐) Não (☐)
Dispneia: Sim (☐) Não (☐) Incoordenação motora: Sim (☐) Não (☐)
Hiperestesia: Sim (☐) Não (☐)
Paresia do trem posterior: Sim (☐) Não (☐)
Fezes sanguinolentas: Sim (☐) Não (☐) Diarréia: Sim (☐) Não (☐)
Linfonodos superficiais aumentados: Sim (☐) Não (☐) Qual? _____

ANEXO

ANEXO A – Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso dos Animais do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-7066/8650 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 1º de dezembro de 2010.

Ilmo (a)

Dra. Hiro Goto

(aos cuidados de Flaviane Alves de Pinho)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2010/077** e intitulado "A patogênese da pancitopenia na leishmaniose visceral canina", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Paulo Cotrim

Coordenador da Comissão de Pesquisa e Ética do IMTSP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do IMTSP