Amanda Rodrigues de Almeida Torres

**Expressão do fator de crescimento insulina símile I (IGF-I) na patogenia da
pancitopenia na leishmaniose visceral em hamster**

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

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientadora: Prof^a. 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

Torres, Amanda Rodrigues de Almeida

Expressão do fator de crescimento insulina símile I (IGF-I) na
patogenia da pancitopenia na leishmaniose visceral em hamster /
Amanda Rodrigues de Almeida Torres. – São Paulo, 2014.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São
Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

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

Descritores: 1. LEISHMANIOSE VISCERAL. 2. PANCITOPENIA
ANIMAL. 3. MEDULA ÓSSEA. 4. FATORES DE CRESCIMENTO. 5.
HAMSTERES

USP/IMTSP/BIB-07/2014.

A Deus pela minha existência e coragem.

A meu esposo Flávio, minhas filhas Isabela e Luiza, que iluminaram de maneira especial os meus pensamentos e meus dias.

A meus pais Rosemeire e José Carlos por todo amor, companheirismo e pela educação a mim oferecida. A minha irmã Mariana por todo seu amor, apoio, amizade e incentivo. A minha avó Neide e Pida (in memoriam) por todo seu amor e suas orações. Meus primos Carol, Nathália, Máira, Renan, Murilo e Vinícius. Tia Isabel, Tio Pedro (in memoriam), Tia Rosângela, Tia Sueli, D. Nair, Seu Gil, Karine, Tânia, Fábio, Duda, Luca, Madalena, Kauane, Camila, Kauê, Tia Ana, Tia Sandra, Tio João, Fernando, Diógenes, Josy, meus padrinhos Rosely, Luciano e Isaete por todo apoio e carinho.

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível."

Charles Chaplin

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto. Em especial a Profa. Dra Hiro Goto pela oportunidade a mim oferecida, por seus ensinamentos, orientações e por ajudar a me tornar uma pessoa ainda melhor. Ao Dr Ângelo Laulleta Lindoso pelo carinho e ensinamentos.

A aluna de doutorado e amiga Flaviane Alves de Pinho por toda sua dedicação, ensinamentos, ajuda, correções, puxões de orelha. Ficando várias vezes até tarde no laboratório, inclusive em alguns finais de semana.

A Dra Samantha Ive Miyashiro e Profa. Dra Mitika K Hagiwara da Faculdade de Veterinária e Zootecnia da Universidade São Paulo por suas orientações, ensinamentos e treinamentos em hematologia.

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

Agradeço também ao Biotério de experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP e todos seus funcionários, além dos animais que cederam suas vidas em prol do nosso trabalho.

À FAPESP (Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo) pela bolsa de de mestrado para o desenvolvimento do projeto nº (2011/04271-3). À CAPES pela bolsa de mestrado. Ao LIM-38 (HC-FMUSP) por apoio ao projeto.

A Dra. Sandra Regina Castro Soares e a funcionária Elisabete Ourique que foram como mães dentro e fora do laboratório.

Gostaria de agradecer em especial a amiga Ive Maíra de Carvalho Dantas pelo companheirismo em todos os experimentos relacionados a este projeto e principalmente pela amizade. A todos os alunos, ex-alunos e funcionários do laboratório: Aline Martins, Amanda Castanheira, Amanda Texeira, Ana Paula, Ms. André Fonseca, Arianne Leal, Ms. Beatriz Celeste, Camila Sato, Carole Mansour, Dra. Célia Vendrame, Ms. Christiane Ozaki, Daiane Barros Dias, Ms. Débora Picanço, Eunice Bonfim, Dra. Edna Souza, Dr. Eduardo Sanchez, Egon, Filipe Cunha, Guilherme Barssotti, Dr. Igor Silva, Jucene, Dra. Luíza Reis, Renata Elen, Ms. Sara Boni, Simone Petri, Luis e Orlando. Além dos amigos, professores,

funcionários e alunos dos laboratórios vizinhos, como Ariane Sanchez, Ms. Edite Kanashiro, Dra Carmem Arroyo, Dra. Guita Elephant, Jhonatan, Dra Kelly, Ligia, Dra Telma, Dr Paulo Cotrim, Mariane, Mussya Rocha, Pâmela, Ms. Thaynan Martins, William Roldan entre outros, pelo carinho e simpatia.

RESUMO

Torres ARA. Expressão do fator de crescimento insulina símile I (IGF-I) na patogénia da pancitopenia na leishmaniose visceral em hamster (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade São Paulo; 2014.

A leishmaniose visceral é uma infecção grave que leva a pancitopenia. Quando se trata de disfunções medulares decorrentes de infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* há poucas abordagens descrevendo as alterações na mielopoiese e os mecanismos que levam a pancitopenia na LV. Alguns estudos demonstram uma relação importante entre a pancitopenia e o fator de crescimento *insulin-like growth factor-I* (IGF-I), no entanto, o seu papel endógeno na hematopoiese ainda não está claro. Propomos estudar a influência desse fator na hematopoiese e sua relação com o desenvolvimento da pancitopenia em hamsteres infectados por via intra-peritoneal com 2×10^7 de amastigotas por *L. (L.) infantum*. Avaliamos em 90 e 120 dias pós-infecção a LDU (*Leishman-Donovan units*) no baço e fígado, quando observamos tendência à progressão da infecção. Aos 60 dias pós-infecção, os animais com LV desenvolveram a plaquetopenia como primeira alteração hematológica, e a partir dos 90 dias pós-infecção, a anemia, e a leucopenia com reduções significantes nos leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos. Já aos 120 dias de infecção, os leucócitos totais diminuíram significantemente acompanhados por uma redução de linfócitos, monócitos e eosinófilos. A partir desses dados, focamos a análise da medula óssea nos hamsteres com 90 e 120 pós-infecção. No mielograma, vimos alterações somente nos hamsteres com LV aos 90 dias pós-infecção, com um aumento significativo na proporção células mielóides imaturas: células mielóides maduras. Na biópsia da tíbia, houve um aumento significativo da celularidade quando comparados com seu respectivo controle, apenas no período de 90 dias pós-infecção. Em adição, observamos uma proliferação e/ou infiltrado macrofágico significativo nos hamsteres com LV, mas sem diferença estatística nos períodos de 90 e 120 dias pós-infecção. Na avaliação semi-quantitativa de fibras de reticulina, somente aos 90 dias pós-infecção, observamos aumento significativo nos infectados comparados aos controles,

caracterizando um quadro fibrótico. Foi medida a expressão de mRNA de IGF-I por PCR em tempo real, aos 90 e 120 dias pós-infecção, onde ocorreu um aumento significativo da expressão de IGF-I nos animais infectados em relação aos controles aos 90 dias. Como expostos, os hamsteres com LV apresentam alterações hematológicas como anemia, leucopenia e plaquetopenia, e ainda alterações na medula óssea como aumento da celularidade, proliferação macrofágica e fibrose acompanhados por um aumento da expressão de IGF-I. Assim podemos concluir que nossos dados indicam que o hamster se constitui num bom modelo para o estudo da patogênese da pancitopenia e das alterações medulares decorrentes da infecção por *L.(L.) infantum*. Neste modelo, ocorre alteração da expressão de IGF-I durante a evolução da infecção com possível papel na patogenia da pancitopenia.

Descritores: Leishmaniose visceral. Pancitopenia animal. Medula óssea. Fatores de crescimento. Hamsteres.

ABSTRACT

Torres ARA. Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the pathogenesis of pancytopenia in visceral leishmaniasis in hamsters (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade São Paulo, 2014.

Visceral leishmaniasis is a serious infection that leads to pancytopenia. When it comes to spinal cord dysfunction resulting from infection *Leishmania (Leishmania) infantum* there are few approaches describing the changes in myelopoiesis and mechanisms that lead to pancytopenia in LV. Some studies have shown a significant relationship between pancytopenia and insulin-like growth factor-growth factor I (IGF-I), however, their endogenous role in hematopoiesis is still not clear. We propose to study the influence of this factor in hematopoiesis and its relationship to the development of pancytopenia in hamsters infected intraperitoneally with 2×10^7 amastigotes by *L. (L.) infantum*. Evaluated at 90 and 120 days post-infection the LDU (*Leishman-Donovan units*) in the spleen and liver, when we observed a tendency to progression of the infection. At 60 days post-infection, animals with LV developed thrombocytopenia as the first hematologic changes, and from 90 days post-infection, anemia, and leukopenia with significant reductions in total leukocytes, lymphocytes and neutrophils. Already at 120 days of infection, total leukocytes decreased significantly accompanied by a decrease lymphocytes, monocytes and eosinophils. From these data, we focus on the analysis of the bone marrow in hamsters with 90 and 120 post-infection. The myelogram changes seen only in hamsters with LV at 90 days post-infection, with a significant increase in the proportion immature myeloid cells: mature myeloid cells. Biopsy of the tibia, there was a significant increase in cellularity compared with their respective control, only 90 days post-infection. In addition, we observed a proliferation and / or infiltration significant macrophage in hamsters with LV, but no statistical difference in the periods of 90 and 120 days post-infection. In semi-quantitative assessment of reticulin fibers, only at 90 days post-infection, we observed a significant increase in infected compared to controls, featuring a fibrous framework. MRNA expression of

IGF-I was measured by real-time PCR, at 90 and 120 days post-infection, where a significant increase in IGF-I expression in infected animals compared to controls at 90 days occurred. As set out, the present hamsters VL hematological disorders such as anemia, leukopenia and thrombocytopenia, as well as changes in bone marrow cellularity increased, macrophage proliferation and fibrosis accompanied by a reduction in IGF-I expression. Thus we can conclude that our data indicate that the hamster is a good model to study the pathogenesis of pancytopenia and marrow changes resulting from infection by *L. (L.) Infantum*. In this model, alteration of IGF-I expression during the course of infection with a possible role in the pathogenesis of pancytopenia.

Descriptors: Visceral leishmaniasis, Pancytopenia, Bone marrow, Insulin-like growth factor I and Hamster.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	(A) Amastigotas (setas) de <i>Leishmania sp.</i> em amostra de paciente de medula óssea. (B) Promastigotas de <i>Leishmania sp.</i> cultivadas <i>in vitro</i>	19
Figura 2-	Ciclo Biológico da Leishmaniose.....	20
Figura 3-	Taxa de sobrevivência de hamsters infectados com 2×10^7 formas amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> . Grupo controle (N=10 animais) e grupo infectado (N=10 animais).....	35
Figura 4-	Carga parasitária no baço e fígado de hamster com LV. Contagem de LDU em baço (A) e fígado (B) de hamsters infectados com LV com 90 e 120 dias pós-infecção (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75). Presença de formas amastigotas em imprint de baço (C) e fígado (D). Hamsters foram infectados intraperitonealmente com 2×10^7 amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	36
Figura 5-	Número absoluto de plaquetas no sangue periférico (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) de hamsters infectados com 2×10^7 de amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> e hamsters controles de acordo com o tempo de infecção. *P < 0,05, teste de Mann-Whitney.....	40
Figura 6-	Morfometria das células da medula óssea de hamsters saudáveis. A: eritróide imaturo, B: eritróide maduro, C: mielóide imaturo, D: neutrófilo, E: eosinófilo, F: macrófago, G: linfócito, H: plasmócito, I: megacariócito imaturo, J: megacariócito maduro. Coloração: Rosenfeld. Microscopia óptica 100x.....	43

Figura 7-	Avaliação da celularidade da medula óssea de hamsters com LV e hamsters controles. Exame histopatológico da medula da tíbia (H-E). (A) Hamster controle; medula óssea normocelular. (B) Hamster com LV; medula óssea hipercelular. Análise semiquantitativa (escore; mediana e percentis 25 e 75) da celularidade: (C) 90 dias pós-infecção e (D) 120 dias pós-infecção.....	47
Figura 8-	Exame histopatológico da medula óssea. (A) Hamster controle. (B) Hamster infectado; proliferação macrofágica focal. (C) Hamster infectado; proliferação macrofágica difusa. H-E.....	48
Figura 9-	Porcentagem da área ocupada por macrófagos em hamsteres infectados com 90 e 120 dias pós-infecção.....	49
Figura 10-	Análise da presença de fibras reticulares em hamsteres com LV. Análise semiquantitativa (escore; mediana e percentis 25 e 75) aos 90 (A) e 120 (B) dias pós-infecção e controles respectivos. *P< 0,05 em relação ao respectivo controle (teste de Mann-Whitney). Análise histopatológica em hamster controle (C) e hamster com LV (D). Coloração: reticulina.....	50
Figura11-	Curva da temperatura de <i>melting</i> de IGF-I (azul) e β -actina (verde).....	51
Figura 12-	Expressão de mRNA de IGF-I em hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de <i>L.(L.) infantum</i> , com 90 (A) e 120 (B) dias de infecção e hamsteres controles. *P <0,05, teste de Mann-Whitney.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sequência de iniciadores (<i>primers</i>) com número de acesso, temperatura de anelamento e tamanho do produto amplificado.....	34
Tabela 2-	Alterações hematimétricas da série eritrocitária de hamsteres infectados com <i>L. (L.) infantum</i> aos 90 e 120 dias pós-infecção e hamsteres controles.....	38
Tabela 3-	Alterações hematimétricas da série leucocitária de hamsteres infectados com <i>L. (L.) infantum</i> aos 90 e 120 dias pós-infecção e hamsteres controles.....	39
Tabela 4-	Mielograma dos hamsteres com LV aos 90 e 120 dias pós-infecção e hamsteres controles.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV	Leishmaniose visceral
LT	Leishmaniose tegumentar
LVC	Leishmaniose visceral canina
IGF-I	<i>Insulin-like growth factor I</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
d.C	Depois de Cristo
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
cDNA	<i>Complementary desoxirribonucleic acid</i>
HE	Hematoxilina-eosina
µm	Micrômetro
N	Número de animais
PCR	Reação de cadeia polimerase
VCM	Volume corpuscular médio
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
LDU	<i>Leishman Donovan Units</i>
CSFs	<i>Colony-stimulating factors</i>
MI	Mielóide imaturo
MM	Mielóide maduro
EI	Eritróide imaturo
EM	Eritróide maduro
IMT	Instituto de Medicina Tropical
USP	Universidade São Paulo

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Leishmanioses.....	17
1.2 Parasito e ciclo biológico.....	18
1.3 Leishmaniose visceral.....	21
1.4 Pancitopenia.....	22
1.5 Medula óssea.....	24
1.6 Fator Insulina Símile (IGF-I) nas leishmanioses.....	27
2 OBJETIVO.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Hamster.....	30
3.2 Parasito.....	30
3.3 Infecções dos animais e protocolo experimental.....	30
3.4 Exame hematimétrico.....	31
3.5 Mielograma.....	31
3.6 Histopatologia da medula óssea.....	32
3.7 Avaliação da carga parasitária por microscopia óptica.....	32
3.8 Expressão de mRNA de IGF-I.....	33
3.8.1 Extração de RNA.....	33
3.8.2 Obtenção de cDNA.....	33
3.8.3 PCR em tempo real para avaliar a expressão de mRNA de IGF-I.....	33
3.9 Considerações éticas.....	34
3.10 Análise estatística.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Evolução da infecção em hamsteres com LV.....	35
4.1.1 Taxa de sobrevivência.....	35
4.1.2 Estabelecimento da infecção.....	36
4.2 Perfil hematológico.....	37
4.2.1 Série eritrocítica.....	37
4.2.2 Série leucocítica.....	38
4.2.3 Série plaquetária.....	40
4.3 Alterações na medula óssea.....	40
4.3.1 Caracterização morfológica das células da medula óssea normal.....	40
4.3.2 Mielograma de hamsteres com LV.....	44
4.4 Análise histopatológica da medula óssea.....	46

4.5 Expressão de mRNA de IGF-I na medula óssea de hamsteres com LV e hamsteres controles	50
5 DISCUSSÃO.....	53
6 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61
ANEXOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e se estabelecem em células do sistema fagocítico mononuclear, podendo apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro, em tegumentar (LT) e visceral (LV) (Gontijo e De Carvalho, 2003; Piscopo e Mallia, 2006).

A leishmaniose tegumentar foi relatada pela primeira vez no século I d.C., quando peças arqueológicas foram encontradas no Equador e no Peru, estas apresentavam lesões de pele e deformidades faciais. Posteriormente, essas patologias que causavam a desfiguração do nariz e boca ficaram conhecidas como “lepra branca” devido à similaridade com lesões causadas por micobactérias (Basano e Camargo, 2004). A LT tem grande importância mundial, devido à sua ampla distribuição geográfica e pelo número de pessoas infectadas anualmente (Goto e Lindoso, 2010).

Ao contrário da LT, a LV é uma doença sistêmica caracterizada desde casos assintomáticos a sintomáticos graves, e em alguns casos, se não tratada pode levar ao óbito. Essa doença foi descrita na Grécia em 1835 quando então era denominada "ponos" ou "hapoplinakon", mas em 1869, foi nomeada por médicos indianos de calazar, conhecida também como “febre negra” (Marzochi et al., 1981). Uma das primeiras e mais importantes descrições clínicas dessa doença, foi em 1900, quando Leishman e Donovan identificaram certos organismos em esfregaços provenientes do baço de humanos. Mais tarde, em 1903, Ross confirmou que era uma nova espécie e propôs que o protozoário fosse denominado como *Leishmania donovani* (Ross, 1903a, 1903b).

Atualmente, as leishmanioses são consideradas uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente regiões pobres e países em desenvolvimento. Apresentam uma larga distribuição geográfica e são relatadas inclusive em áreas não endêmicas. São considerada um dos principais problemas de

saúde pública, com uma prevalência mundial de 12 milhões de casos/ano e uma incidência de 1,5 milhões de casos de LT e 500.000 casos de LV (Alvar et al., 2012).

Muito se tem feito no intuito de desenvolver uma vacina efetiva para combater a doença, diversos antígenos tem sido identificados e caracterizados como potenciais candidatos, porém até o momento, nenhuma vacina totalmente efetiva foi produzida (Coler e Reed, 2005).

1.2 Parasito e Ciclo Biológico

Os parasitos causadores das leishmanioses pertencem ao filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, e está organizada em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Viannia* compreende quatro complexos bem definidos: *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) lainsoni*. O subgênero *Leishmania* compreende onze complexos: *Leishmania (Leishmania) hertigi*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) enrietti*, *L. (L.) arabica*, *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) gerbilli*, *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* (Thomaz-Soccol et al., 1993).

Em seu ciclo biológico, as leishmânias apresentam-se sob duas formas morfológicamente distintas: amastigota e promastigota (Figura 1). A forma amastigota é encontrada no hospedeiro vertebrado dentro de células mononucleares, particularmente, em macrófagos, com característica arredondada (3 a 6 µm de diâmetro) e sem flagelo externo, com núcleo grande e esférico que pode ocupar cerca de 1/3 do corpo do parasito. Além disso, tem cinetoplasto bem visível com forma parecida com bastonete. As formas amastigotas multiplicam-se dentro dos vacúolos de macrófagos por divisão binária simples (Killick-Kendrick, 1990).

Durante o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero, o inseto vetor adquire macrófagos infectados com o parasito na forma amastigota, que se transformam no tubo digestivo do flebotomíneo, em formas promastigotas. Estas medem cerca de 14 a 20 µm de diâmetro, possuem flagelo externo, o núcleo é

arredondado ou oval e o cinetoplasto localiza-se na porção posterior do parasito. Nessa fase os parasitos dividem-se por divisão binária. As formas promastigotas evoluem de formas não infectivas para infectivas por meio de trocas estruturais em suas moléculas de superfície, até atingirem uma forma flagelada promastigota metacíclica, uma forma losangular adelgada de 10 a 15 μm com um longo flagelo na extremidade (Sacks e Perkins, 1984).

Figura 1.(A) Amastigotas (setas) de *Leishmania* sp. em amostra de paciente de medula óssea. Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/diagnosis.html>. (B) Promastigotas (seta) de *Leishmania* sp. cultivadas *in vitro*. Fonte: http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.html.

As espécies de leishmânias são transmitidas de animais silvestres ou domésticos para o homem através da picada de insetos vetores das espécies dos subgêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Lewis e Ward, 1987). Essa transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo do vetor infectado que inocula promastigotas metacíclicas no hospedeiro, por meio da saliva do vetor que assume grande importância na infectividade (Hall e Titus, 1995). Estas formas infectivas serão fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, onde serão diferenciadas em amastigotas sendo que o número de parasitos aumenta no interior da célula até que a mesma se rompe liberando novas formas amastigotas

que serão fagocitadas por outras células desencadeando o processo patológico no hospedeiro (Figura 2) (Killick-Kendrick, 1990).

Figura 2. A leishmaniose é transmitida pela picada de fêmeas de flebotomíneos. Os flebotomíneos injetam promastigotas metaciclícas durante o repasto sanguíneo (1). Promastigotas são fagocitadas por macrófagos (2) e se diferenciam em amastigotas (3). Amastigotas multiplicam-se nos macrófagos até se romperem e atingirem outros tecidos dependendo em parte das espécies de leishmânia (4), dando origem as manifestações clínicas da leishmaniose. Flebotomíneos infectados durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado ingerem macrófagos infectados com amastigotas (5). No intestino do inseto vetor os parasitos se diferenciam em promastigotas (6, 7), que se multiplicam e migram para a proboscíde (8), para infectar um novo hospedeiro. Fonte: http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.html.

No Brasil, a leishmaniose tegumentar é causada, principalmente, pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a leishmaniose visceral, pela *Leishmania (Leishmania) infantum* (Laison e Shaw, 1987).

1.3 Leishmaniose Visceral

A LV é uma enfermidade infecciosa generalizada crônica que no Brasil é causada por protozoário da espécie *L. (L.) infantum*, que acomete preferencialmente órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (baço, fígado e medula óssea), podendo ser fatal ao hospedeiro (Bryceson, 1996; Duarte, 2000; Lindoso e Goto, 2009). A LV está em segundo lugar na mortalidade e no quarto lugar em morbidade entre as doenças tropicais, com 20.000 a 40.000 mortes por ano. É considerada uma doença endêmica e crescente, de grande importância na saúde pública pela sua expansão e letalidade (Lainson e Shaw, 1987).

No Brasil desde a década de 1980, a distribuição geográfica da LV vem se expandindo, particularmente para áreas urbanas, com o aparecimento de 3.000 novos casos a cada ano (Brasil, 2006). O cão é considerado o principal reservatório peri-doméstico e urbano da LV por apresentar alto parasitismo cutâneo (Canela et al., 2004).

A LV em humanos é caracterizada por febre irregular, esplenomegalia, hepatomegalia acompanhadas de pancitopenia, hipergamaglobulinemia, caquexia e desidratação podendo chegar a quadros letais (Farrell, 1976; Rodrigues et al., 1992; Badaró et al., 1986). As complicações infecciosas e as hemorragias são os principais fatores de risco na LV, sendo que o diagnóstico precoce é fundamental para o tratamento e ações profiláticas eficazes (Brasil, 2006).

Na leishmaniose visceral canina (LVC), o cão desenvolve a LV em sua forma plena semelhante à doença humana. Os sinais clínicos são variáveis, mas dentre as principais manifestações clínicas, o cão pode apresentar alterações hematológicas como anemia, leucopenia e plaquetopenia, bem como hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, hiperproteinemia, hepatoesplenomegalia e caquexia (Ciaramella, 1997; Noli, 1999). No entanto, nos cães, as lesões dermatológicas são frequentes ao contrário dos casos humanos, nos quais são vistas em humanos co-infectados com HIV após o tratamento (Ciaramella et al., 1997; Zijlstra et al., 2003; Alvar, 2004).

Em modelo experimental, o hamster (*Mesocricetus auratus*) é a espécie animal mais susceptível a infecção por *L. donovani* e *L. (L.) infantum* (Requena et al.,

2000; Melby et al., 2001). Desde a sua utilização no estudo das leishmanioses, os estudos experimentais nos hamsteres propiciaram informações acerca dos aspectos da relação parasito-hospedeiro e ciclo biológico, bem como o seu emprego na manutenção de parasitos (Pearson e Roberts, 1990). Diversos estudos mostraram que os hamsteres com LV podem apresentar desde infecção assintomática até um quadro sintomático grave, inclusive evoluindo para casos letais (Melby et al., 2001). O quadro clínico-patológico é bem semelhante à doença ativa observada no homem e cão, como hiperglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, caquexia e imunodepressão (Pearson e Robert, 1990).

Como visto na LV, as alterações hematológicas são frequentes e a sua forma mais grave leva a uma diminuição de todas as células do sangue periférico, no entanto, poucos estudos abordam os mecanismos envolvidos nesse processo, particularmente, em hamsteres.

1.4 Pancitopenia

A pancitopenia é a diminuição global das células do sangue periférico (leucócitos, eritrócitos e plaquetas). Várias são as causas de pancitopenia em humanos, mas, de forma geral, podem ser divididas em dois grupos: distúrbios medulares e não medulares. No primeiro grupo podem ser citadas a anemia aplásica, anemia megaloblástica, mielodisplasia, mielofibrose, doenças linfoproliferativas e carcinomas com envolvimento medular. No segundo grupo estão o hiperesplenismo, efeito de drogas, as doenças inflamatórias (como lúpus eritematoso sistêmico) e infecciosas (Kar e Ghosh, 2002).

A maioria dos humanos com LV ativa apresentam pancitopenia e alguns com sintomas como sangramentos pela trombocitopenia (desde leves sufusões a hemorragias graves), infecções decorrentes de neutropenia intensa, palidez progressiva, usualmente de início insidioso, com alguns indivíduos tolerando baixos níveis de hemoglobina sem queixas e/ou repercussões hemodinâmicas (Alter e Young, 2003).

A teoria mais aceita sobre a pancitopenia é a do hiperesplenismo, sendo este caracterizado por uma hiperplasia acentuada do sistema fagocítico mononuclear na medula óssea, esplenomegalia e alguma citopenia periférica (Cartwright et al., 1948). Entretanto, outro estudo vem reportando hemofagocitose e mielodisplasia como possíveis causas (Gagnaire et al., 2000; Yarali et al, 2002).

Khodke et al. (2001), promoveu um estudo em medula óssea de 50 humanos com pancitopenia, e observaram que a mesma parece estar associada a uma diminuição na produção de células hematopoiéticas, em consequência de destruição do tecido da medula por toxinas ou talvez supressão do crescimento normal e diferenciação. Foi observado que 14% desses humanos tinham LV e que os mesmos apresentavam níveis de ferro normal não sendo detectada nenhuma evidência ligada ao hiperesplenismo.

Muitos trabalhos reportam as citopenias no sangue periférico, tanto em humanos, cães e/ou modelo experimental de forma isolada. Para os casos de anemia, o achado mais comum é a anemia do tipo normocítica e normocrômica, na qual diferentes fatores são considerados responsáveis por essa alteração como epistaxe, hemólise associada com hiperesplenismo, inflamação generalizada, insuficiência renal e hipoplasia ou aplasia da medula óssea (Anosa e Idowu, 1983; Keenan et al., 1984; Slappendel e Greene, 1990; Koutinas et al., 1999). Além disso, outros trabalhos demonstraram em humanos e hamsteres com LV que o tempo de vida de eritrócitos estava diminuído, já em cães ocorria uma diminuição na fluidez lipídica dos eritrócitos e/ou mudanças nos mecanismos de citoaderência nos receptores ligantes de eritrócitos no baço (Knight et al., 1967; Biswas et al., 1995; De Luna et al., 2000). Vale acrescentar, que estudos realizados por Lafuse et al. (2013), hamsteres infectados com *L. donovani* apresentavam uma inibição da eritropoiese em decorrência de citocinas que induziam apoptose dos eritroblastos.

Outra alteração comum na LV é a leucopenia, em torno de 75% dos humanos desenvolvem essa alteração com uma linfocitose relativa e uma marcada diminuição de neutrófilos e eosinófilos (Cartwright et al., 1948; Marwaha et al., 1991). Ainda não se tem resultados evidentes sobre os mecanismos envolvidos nesse processo, mas segundo Queiroz (2004), a hipoplasia ou depressão medular pode ser a principal responsável pela leucopenia. Em cães com LV, há relatos de casos em que

ocorra uma leucocitose associada a uma neutrofilia no início da infecção (Bourdoiseau et al., 1997), mas em casos mais avançados da doença é frequente a leucopenia nesses animais sendo atribuída a uma disfunção medular afetada pelo intenso parasitismo na medula óssea, como também, pela mobilização dessas células para diferentes órgãos (Alvar et al., 2004). Em hamsteres, muitos estudos relatam com frequência a presença de leucopenia nesses animais com LV, no entanto, nenhum deles explica nesse modelo os fatores relacionados a essa alteração (Carrilo et al., 2014).

As plaquetas também estão diminuídas principalmente nas fases mais adiantadas da doença, propiciando o aparecimento de hemorragias (Michalick e Genaro, 2010). Em humanos com LV, em torno de 40-65% dos casos desenvolvem trombocitopenia (Queiroz et al., 2004). Helmi et al. (1993), no Iraque, e Rahim et al. (1998) no Paquistão, encontraram trombocitopenia em torno de 80-90% dos humanos. O sequestro esplênico é a principal causa atribuída a essa diminuição plaquetária no sangue periférico (Varma e Nassem; 2010). Em adição, o hiperesplenismo e a deficiência na formação de plaquetas também podem levar a esse quadro hematológico (Dameshek e Miller, 1975). Na LVC, as causas são multifatoriais como deficiência na agregação plaquetária e no endotélio, bem como esplenomegalia, alterações na trombocitopoiese e/ou falha renal e hepática (Ferrer, 1992; Ciaramella et al., 2005; Petanides et al., 2008).

A gravidade das alterações hematológicas pode servir como biomarcadores para determinação do prognóstico da doença (Costa et al., 2010). Logo, entender os mecanismos envolvidos nessa alteração e os possíveis fatores que desencadeiam todo o processo é essencial para a busca de novas intervenções terapêuticas complementares para os protocolos já utilizados.

1.5 Medula Óssea

A gênese das alterações hematológicas seja da série vermelha ou da série branca muitas vezes está relacionada a disfunções medulares (Diebold et al., 2000), portanto, um estudo detalhado da medula óssea possibilita identificar a capacidade

hematopoiética do indivíduo, uma vez que a medula óssea é o principal órgão hematopoiético e importante órgão linfóide primário e secundário (Picker e Siegelman, 1999).

A medula óssea é um dos maiores órgãos do corpo (Lund, 2000), chegando a 3% do peso corporal de ratos adultos (Schermer, 1967), 2% em cães (Jain, 1986) e 5% em humanos (Picker e Siegelman, 1999), sendo considerado o principal órgão responsável pela hematopoiese na fase adulta dos animais (Wang e Wagers, 2011).

O tecido hematopoiético é uma estrutura complexa e extremamente organizada composta por células-tronco hematopoiéticas, células sanguíneas maduras, células estromais que formam o tecido de sustentação essencial para o processo de maturação e/ou diferenciação das células precursoras. Para que a produção das células sanguíneas e linfóides ocorra é necessário um microambiente capaz de oferecer fatores de crescimento que suporte a proliferação, maturação e diferenciação das células (Travlos, 2006). Estudos recentes em modelo murino, mostram a complexidade estrutural desse compartimento e a sua organização em nichos para que a hematopoiese aconteça de forma eficiente. Os nichos são estruturas compostas por células estromais perivasculares, células endoteliais, macrófagos, células reticulares com alta expressão de CXCL12 e células do sistema nervoso como neurônios simpáticos e células de Schwann não-mielinizantes, que atuam na permanência das células precursoras nos nichos até a sua completa diferenciação. Eles são designados de acordo com a sua localização em nichos endosteais e perivasculares (Friedenstein et al, 1974; Song et al., 2010).

Como visto, a medula óssea é um compartimento bem organizado e que qualquer interferência na sua função pode interferir na produção celular local, provocando displasias que refletem diretamente no sangue periférico e/ou órgãos linfóides (Kopterides et al., 2003). Quando se trata de disfunções medulares decorrentes de infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*, há poucos estudos descrevendo as alterações na mielopoiese e os mecanismos que levam a pancitopenia na LV, necessitando de aprofundamento de estudos nessa área.

A técnica de histopatologia é muito importante para a avaliação da medula óssea, pois nos proporciona informações sobre a arquitetura do tecido ósseo

(celularidade, hemorragia, linhagens celulares, alterações estromais, lesão e necrose), além de informações da estimativa das reservas de ferro (Travlos, 2006). Outro exame importante é o mielograma que permite traçar um perfil celular da medula óssea a partir da contagem diferencial das células nucleadas. Este exame é importante para a identificação de displasias celulares e para detectar alterações nas diferentes linhagens celulares (Weiss, 2010). Em caso de hamsteres, poucos estudos têm caracterizado o perfil do mielograma (Trincão, 1949), particularmente, quando desafiados com *L. (L.) infantum*.

Pouco se sabe na LV acerca das alterações na medula óssea, é sabido que a *Leishmania* pode causar perturbações na medula óssea levando a uma diminuição de produção das células sanguíneas (Abreu et al., 2011). Estudos mais recentes, particularmente, em cães com LV demonstraram no mielograma uma hiperplasia mieloide, aumento de macrófagos, monócitos, plasmócitos e células de Mott, e alterações na série eritróide como eritrofagocitose, hipoplasia eritróide e displasias (Anosa e Idowu, 1983; Yamaguchi et al., 1983; Foglia et al., 2006). Em humanos, o aspirado da medula óssea revelou alterações megaloblásticas como consequência da diseritropoiese e displasias nas células mielóides e megacariócitos, aumento de linfócitos e plasmócitos, e eritrofagocitose (Yarali et al., 2002; Dhingra et al., 2010). No exame histopatológico, foi visto presença de granulomas, displasia megacariocítica e aplasia medular em humanos e/ou cães com LV. Em alguns casos, mielofibrose e aumento na deposição de ferro foram relatados (Dhingra et al., 2010).

Acredita-se que a pancitopenia na LV resulta por um lado, da inflamação crônica, difusa e focal da medula óssea e de outro lado pela retirada da célula reticular de sua função nobre hemocitoformadora para a de fagocitose e formação de plasmócitos, em detrimento da produção de células da linhagem sanguínea (Meira et al., 1948).

Muito embora o hiperesplenismo seja o mecanismo mais defendido na evolução da pancitopenia, ainda existem muitas controvérsias para explicar a queda global das células do sangue periférico. Desta forma, avaliamos as alterações hematológicas e as características morfológicas do aspirado e biopsia de medula óssea de hamsteres com LV, uma vez que nesse modelo são poucos estudos que exploram os efeitos da infecção leishmaniotica na hematopoiese.

1.6 Fator de crescimento insulina-símile I (IGF-I) nas leishmanioses

A hematopoiese é controlada por diversos fatores de crescimento e seus inibidores que formam uma via de sinalização que modula a proliferação e diferenciação celular (Majka et al., 2001). Os fatores de crescimento insulina-símile (Insulin-like growth factor – IGFs), embora não pertençam aos fatores clássicos de crescimento importantes na hematopoiese, podem exercer efeitos biológicos variáveis e importantes nesse processo (Zumkeller, 2002).

IGF é um membro da família dos hormônios de crescimento da insulina, filogeneticamente bem conservado, com massa molecular de aproximadamente 7,5 kDa. São encontrados dois tipos de IGF: IGF-I e IGF-II, que promovem a proliferação e diferenciação celular em diversos tecidos via receptores específicos, os receptores de IGF tipo I (IGF-IR) e tipo II (IGF-IIR) (Zumkeller e Schofield, 1995). Esse fator de crescimento está presente na circulação e a maior parte encontra-se ligada a proteínas ligantes de IGF-I, as IGFBPs (IGF-*bindings proteins* 1-6) que mantêm a biodisponibilidade desta molécula (Nagaoka et al., 1990).

O IGF-I é um importante promotor do crescimento de células hematopoiéticas *in vitro* (Ratajczak et al., 1994). Segundo Rodriguez-Tarduchy et al., 1992), o IGF-I estimula a sobrevivência e proliferação de precursores hematopoiéticos dependentes de IL-3 *in vitro* na ausência de IL-3. Foi visto ainda que o IGF-I tem uma atividade semelhante à eritropoietina (Epo), que age em progenitores eritróides circulantes indicando que há uma via alternativa independente de Epo (Correa e Axelrad, 1991). Além disso, IGF pode aumentar a eficiência da proliferação de clones de células progenitoras hematopoiéticas como resultado da estimulação positiva em células com receptores do tipo I de IGF-I (Ratajczak et al., 1994) e a combinação de IGF-I e hormônios esteróides que aumentam a síntese de DNA induzida por Epo e fator de célula tronco (*stem cell factor* –SCF), em células eritróides progenitoras dependentes de Epo/SCF (Panzenbock et al., 1998). IGF-I estimula também a granulopoiese em medula óssea de humanos (Merchav et al., 1993) e IGF-II promove a formação de colônias de monócitos e granulócitos de células hematopoiéticas *in vitro* (Schuwartz et al, 1993). Em adição, *in vivo* há dados sugestivos da participação de IGF-I na hematopoiese em camundongo (Welniak et al., 2004).

Um aspecto a ser abordado, é que as células estromais da medula óssea sintetizam e secretam IGF-I e IGFBPs (Abboud et al., 1991). Esse fato é importante uma vez que discutimos anteriormente que as células estromais são elementos fundamentais para a manutenção dos precursores hematopoiéticos nos nichos endosteais e/ou perivasculares, e que esse fator de crescimento, produzido por essas células, é efetor na estimulação de células progenitoras (Zumkeller, 2002).

Com base no exposto, sugerimos que IGF-I pode ser um fator importante na patogênese da pancitopenia. Assim, avaliamos durante o meu projeto de mestrado a influência desse fator de crescimento nas alterações medulares e hematológicas em hamsteres com LV.

3 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a expressão de IGF-I na patogenia da pancitopenia na leishmaniose visceral em hamsteres.

Objetivos específicos

- Avaliar o tempo e a eficiência da infecção
- Avaliar as alterações hematológicas dos hamsteres infectados
- Avaliar as características morfológicas do aspirado de medula óssea de hamsteres sadios e infectados
- Avaliar as alterações histopatológicas da tíbia dos hamsteres infectados
- Avaliar a expressão de mRNA de IGF-I na pancitopenia

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Hamsteres

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) não isogênicos, machos, com 45 a 60 dias de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo, em ambiente com ventilação natural, com ração (Purina Brasil) e água à vontade.

3.2 Parasitos

Cepa de *Leishmania (Leishmania) infantum*, MHOM/BR/1972/LD46, foi mantida em hamsteres com inoculações intraperitoneais periódicas de homogeneizado de baço de animais infectados.

3.3 Infecções dos animais e protocolo experimental

Os animais de manutenção infectados com *L. (L.) infantum* foram eutanasiados em câmara de CO₂ para a remoção do baço. O mesmo foi macerado em meio RPMI 1640 (GIBCO, EUA) e filtrado em gaze estéril. Passamos esse macerado quatro vezes, progressivamente, em agulhas de 19G, 21G e 24G e a suspensão foi centrifugada a 250 x g a 4°C por 10 minutos, seu sobrenadante submetido a nova centrifugação nas mesmas condições e, em seguida, foi submetido a nova centrifugação por 30 minutos a 1200 x g a 4° C. O precipitado contendo as formas amastigotas foi ressuspendido em meio RPMI 1640 e contadas em camara de Neubauer. A concentração de parasitos foi acertada para 2x10⁷/mL. Em nosso experimento, 2x10⁷ parasitos foram inoculados, por via intraperitoneal, em cada animal.

Após 30 dias de infecção, iniciamos a coleta de sangue periférico e medula óssea em intervalos de 30 dias. Para a coleta de sangue, os animais foram anestesiados com isoflurano (ISOTHANE, Baxter Healthcare of Puerto Rico, EUA) com concentração alveolar mínima de 1,5%, sendo administrado por via inalatória e em seguida sacrificados em câmara de CO₂.

Inicialmente, realizamos um experimento piloto (N=10 controles e N=10 infectados) com objetivo de padronizar o tempo de observação, ou seja, para determinar a taxa de sobrevivência dos animais, a eficiência da infecção e observar qual o melhor período para avaliação hematológica e detecção de um possível quadro pancitopênico. Com base nos resultados obtidos, decidimos acompanhar a infecção dos animais até 120 dias (N=14 controles e N=10 infectados).

3.4 Exame Hematimétrico

O sangue periférico foi coletado por punção retro-orbitária e transferido para tubos contendo 10% ácido etileno di-amino tetra-acético - EDTA. O exame hematimétrico do sangue periférico foi realizado por técnica automatizada em equipamento Vet ABC (Horiba ABC – França), além de contagem diferencial de células em esfregaço sanguíneo, corado com corante Rosenfeld e analisado por microscopia óptica (Zeiss).

3.5 Mielograma

Os animais infectados e sadios foram anestesiados com isoflurano (ISOTHANE, Baxter Healthcare of Puerto Rico, EUA) com concentração alveolar mínima de 1,5%, sendo administrado por via inalatória, para a coleta do aspirado de medula óssea da crista ilíaca com auxílio de agulha hipodérmica (21G) e seringa de 3 mL para o preparo do esfregaço em lâminas. O mesmo foi corado com Rosenfeld para análise citológica. As alterações foram avaliadas por contagem diferencial em um total de 500 células, de acordo com Harvey (2001).

3.6 Histopatologia da medula óssea

Para exame histopatológico, coletamos a tíbia e fixamos em formol a 10% tamponado com fosfato 0,01 M pH 7,4 para posterior descalcificação em ácido fórmico 10% e processamento por técnica de rotina. Foram obtidos cortes de 3 a 4 μm de espessura e corados com hematoxilina-eosina (H-E), coloração de Perls e coloração de reticulina. Estas foram analisadas à microscopia de luz. Para a avaliação quantitativa da proliferação macrofágica foram selecionadas aleatoriamente 10 regiões de cada tecido, sendo que as mesmas correspondiam a uma área de 1.190 μm^2 . A análise morfométrica foi realizada utilizando o software Image Pro-Plus.

No exame histopatológico, os resultados foram analisados de forma semi-quantitativa, mensurando-se a localização, distribuição e intensidade da lesão, numa escala de 0 a 5 onde: 0= normal, 1= mínima ou duvidosa, 2= média, 3=moderada, 4=moderadamente severa e 5=severa. Na avaliação histopatológica com coloração de Reticulina, a análise também foi feita de forma semi-quantitativa, de acordo com a distribuição e intensidade de fibras reticulares, numa escala de 1 a 3 onde: 1= normal a leve, 2= moderada e 3= severa.

3.7 Avaliação da carga parasitária por microscopia óptica

Foram preparados os *imprints* de fígado e baço em lâminas, submetidos à coloração por Panótico (Newprov, Paraná, Brasil). A contagem de formas amastigotas de leishmânia e células mononucleares foram realizadas em microscópio de luz (Zeiss), segundo o método descrito por Stauber (1958). Contaram-se 1000 células ou leishmânias de cada amostra e a *Leishman Donovan Unit* - LDU foi calculada segundo a fórmula: $\text{LDU} = \text{n}^\circ \text{ amastigota} / \text{n}^\circ \text{ células} \times \text{peso do órgão (mg)} \times 2 \times 10^4$

3.8 Expressão de mRNA de IGF-I

3.8.1 Extração de RNA

Aproximadamente, 200 μ L do aspirado de medula óssea foram coletados para extração de RNA total. A amostra foi transferida para um microtubo contendo 400 μ L de meio RPMI. Depois, as células foram centrifugadas a 290 x g por 10 minutos, 4°C, e, aproximadamente 5×10^6 células foram ressuspensas com TRIZOL (Invitrogen, EUA) e armazenadas a -80°C. Iniciamos a extração após o descongelamento das amostras seguindo as recomendações do fabricante. A dosagem do RNA foi feita por NanoDrop ND-1000 UV-Vis espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), com a integridade das amostras demonstrada pelo escore 260/280 (1,8-2,0 foram considerados aceitáveis).

3.8.2 Obtenção do cDNA

Para a obtenção do cDNA utilizamos a transcrição reversa para a síntese do cDNA a partir do RNA total, sendo realizada nas seguintes condições: 1 μ g de RNA total foi misturado com 4 μ L de High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante.

3.8.3 PCR em tempo real para avaliar a expressão de mRNA de IGF-I

Utilizamos 1 μ L de cDNA (1000 ng/ μ L), adicionamos 10 μ L de Sybr Green (2x) (Applied Biosystems) e *primer* a 150 nM, num volume final de 20 μ L, a placa foi centrifugada e submetida à amplificação em ciclos de 95° por 10 minutos; 95°C por 15 segundos; 58°C por 1 minuto, 70°C por 1 minutos, por 44 ciclos, em termociclador (Applied Biosystem StepOne Real Time PCR System).

Na Tabela 1, seguem as sequências dos *primers* utilizados para reação com cDNA de IGF-I e da β -actina.

Tabela 1. Sequência de iniciadores (*primers*) com número de acesso, temperatura de anelamento e tamanho do produto amplificado

Primer	Sequência	Número de acesso	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto (pb)
IGF-I	Senso 5' GGCTTTTACTTCAACAAGCCCACA3'	GQ366702	58	127
	Antisenso: 5' CATCTCCAGCCTTCTCAGATCACA3'			
Beta-actina	Senso: 5' CTCCTTCCTGGGTATGGAATCCT 3'	AJ312092	58	103
	Antisenso: 5' CAGACAGCACTGTGTTGGCATAGA 3'			

A quantificação da expressão de IGF-I, com base no controle interno (β -actina), foi realizada segundo Pfaffl et al. (2001).

3.9 Considerações éticas

Todos os procedimentos efetuados neste projeto foram autorizados pela Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP sob nº CPE-IMT 20011/109 (ANEXO 1).

3.10 Análise Estatística

Para a análise estatística empregamos testes não paramétricos Kruskal Wallis, com o pós-teste de Dunn, ou Mann-Whitney e os resultados apresentados como mediana e percentis de 25% e 75%. O nível de significância foi estabelecido em 5%. Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados e a apresentação das variáveis mensuradas em tabelas e gráficos utilizando os softwares Excel 2010 e GraphPad Prism 5.

4 RESULTADOS

4.1 Evolução da infecção em hamsteres com LV

4.1.1 Taxa de sobrevivência

Iniciamos o trabalho avaliando a evolução da infecção e a taxa de sobrevivência dos animais, assim como a evolução das alterações hematimétricas. Não encontramos nenhum dado na literatura sobre o período em que começam as alterações no sangue periférico de hamsteres com LV infectados especificamente com a cepa de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD46), necessitando desses estudos iniciais.

A avaliação da taxa de sobrevivência foi realizada nos animais infectados até 225 dias. Vimos que 10% dos animais infectados começaram a morrer a partir de 130 dias pós-infecção, e aos 225 dias após a infecção, a taxa de sobrevivência diminuiu para 40% (Figura 3). Desta forma, padronizamos os experimentos para avaliar as alterações hematológicas até 120 dias pós-infecção.

Figura 3- Taxa de sobrevivência de hamsteres infectados com 2×10^7 formas amastigotas de *L.(L.) infantum*. Grupo controle (N=10 animais) e grupo infectado (N=10 animais).

4.1.2 Estabelecimento da infecção

Para avaliar a progressão da infecção, a LDU foi determinada em baço e fígado. A LDU teve tendência ao aumento no baço dos animais com LV com a progressão da doença entre 90 e 120 dias. No fígado, a contagem de LDU foi similar nos animais com 90 e 120 dias pós-infecção (Figura 4).

Figura 4- Carga parasitária no baço e fígado de hamster com LV. LDU em baço (A) e fígado (B) de hamsters com LV com 90 e 120 dias pós-infecção (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75). Presença de formas amastigotas (↑) em *imprint* de baço (C) e fígado (D). Hamsters foram infectados intraperitonealmente com 2×10^7 amastigotas de *L.(L.) infantum*.

4.2 Perfil hematológico de hamsteres com LV

Quando acompanhamos o período de infecção, inicialmente até 225 dias, sendo que a cada 30 dias, realizamos o exame hematológico nos animais. Vimos que as alterações hematológicas iniciaram a partir de 60 dias pós-infecção nos animais com LV, atingindo inicialmente a série plaquetária. As outras séries (eritrocítica e leucocítica) apresentaram alteração a partir dos 90 dias pós-infecção. Desta forma, apresentaremos aqui os dados referentes ao período de surgimento das alterações hematemétricas nas diferentes séries em experimentos acompanhados até 120 dias pós-infecção nos animais com LV, pelo fato da taxa de sobrevivência diminuir a partir dos 130 dias. Os resultados são de dois experimentos independentes que foram analisados em conjunto.

4.2.1 Série eritrocítica

Quando analisamos a série eritrocítica, vimos que a partir dos 90 dias pós-infecção, as hemácias, a concentração de hemoglobina, o hematócrito e o valor corpuscular médio (VCM) diminuíram, mas sem alteração na concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) nos animais infectados em comparação ao grupo controle. Essas alterações caracterizam uma anemia microcítica normocrômica. No entanto, no período de 120 dias pós-infecção, embora os animais infectados apresentassem uma tendência a diminuição nesses parâmetros, não vimos diferença estatisticamente significativa quando comparamos com o grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2- Alterações na série eritrocítica (mediana e percentis 25 e 75) em hamsters infectados com *L. (L.) infantum* aos 90 e 120 dias pós-infecção e hamsters controles

	90 dias pós-infecção		120 dias pós-infecção	
	Controle (N=16)	Infectado (N=20)	Controle (N=15)	Infectado (N=17)
Hemácias($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8,3 (8,0-8,5)	7,9 (7,4-8,3)*	8,0 (7,5-8,4)	7,7 (7,4-8,1)
Hemoglobina (g/dL)	14,0 (13,3-14,7)	12,8 (12,1-14,3)*	13,3 (12,1-13,5)	12,7 (11,8-13,1)
Hematócrito (%)	41,5 (40,2-42,4)	38,2 (36,2-42,1)*	40,8 (37,9-43,0)	39,3 (37,9-40,7)
VCM (fm^3)	50,0 (49,0-51,0)	49,0 (48,0-50,7)*	51,0 (50,0-51,0)	51,0 (49,0-51,5)
CHCM (g/dL)	34,2 (32,3-35,0)	33,4 (33,3-34,2)	31,8 (31,5-32,4)	31,9 (31,2-32,5)

*P< 0,05 em relação ao respectivo controle (teste de Mann-Whitney).

Tabela 3- Alterações na série leucocítica (mediana e percentis 25 e 75) em hamsters infectados com *L. (L.) infantum* aos 90 e 120 dias pós-infecção e hamsteres controles

(No. células /mm ³)	90 dias pós-infecção		120 dias pós-infecção	
	Controle (N=16)	Infectado (N=20)	Controle (N=15)	Infectado (N=17)
Leucócito Total	11.100 (8.075-13.050)	9.100 (6.625-10.075)*	10.300 (8.400-11.000)	7.000 (5.500-9.750)*
Linfócito	8.165 (5.822-9.766)	7.238 (4.440-7.889)*	7.224 (6.237-8.125)	5.104 (3.824-7.090)*
Monócito	0,0 (0,0-100,0)	0,0 (0,0-100,0)	100,0 (0,0-100,0)	0,0 (0,0-50,0)*
Neutrófilo	2.267 (1.530-3.104)	1.837 (1.069-2.419)*	2.299 (1.700-3.266)	1824 (516-2.877)
Eosinófilo	44 (0-177)	0 (0-71)	1.848 (92-2.496)	150 (0-1.168)*

*P< 0,05 em relação ao respectivo controle (teste de Mann-Whitney).

4.2.2 Série leucocítica

Quando avaliamos o número absoluto de leucócitos no sangue periférico, vimos que os animais infectados tinham uma diminuição significativa em relação aos animais controles, a partir dos 90 dias pós-infecção. Com a evolução da doença, essa alteração se manteve aos 120 dias pós-infecção (Tabela 3).

Na contagem diferencial dos leucócitos, aos 90 dias pós-infecção, os hamsters infectados apresentaram uma diminuição significativa no número absoluto de linfócitos e neutrófilos. Com a evolução da doença, aos 120 dias pós-infecção, a contagem absoluta de linfócitos, monócitos e eosinófilos nos animais infectados estava menor quando comparada ao grupo controle (Tabela 3).

4.2.3 Série plaquetária

Na contagem de plaquetas, vimos aos 60 e 90 dias pós-infecção uma diminuição significativa nos animais infectados em relação ao grupo controle. (Figura 5).

Figura 5- Número absoluto de plaquetas no sangue periférico (mediana e intervalo entre percentis 25 e 75) de hamsters infectados com 2×10^7 de amastigotas de *L.(L.) infantum* e hamsters controles de acordo com o tempo de infecção. * $P \leq 0,05$, teste de Mann-Whitney.

4.3 Alterações na medula óssea

4.3.1 Caracterização morfológica das células da medula óssea normal

Iniciamos o estudo com a identificação e caracterização das células da medula óssea do hamster sadio, uma vez que não encontramos na literatura nenhum estudo detalhado da morfologia dessas células nessa espécie animal. Para isso, baseamos-nos em estudos realizados por Travlos (2006) que descreveu a morfologia das células da medula óssea em diferentes espécies de mamíferos e especificamente, em roedores.

Da série eritróide, as células eritróides imaturas eram redondas, contendo núcleo bem centralizado caracterizado por cromatina delicada e nucléolos evidentes (Figura 6A). A proporção núcleo:citoplasma era alta e citoplasma de coloração basofílica. Já a célula eritróide madura tinha uma diminuição na proporção núcleo:citoplasma e um citoplasma de coloração pouco basofílica (Figura 6B). O núcleo apresentava cromatina bem compactada. Nessa fase de maturação, não se observam nucléolos evidentes. O tamanho da célula eritróide madura vai diminuindo com o grau de maturação.

Na série mielóide, as células mielóides imaturas apresentam grande proporção núcleo:citoplasma, núcleo central com borda irregular, com cromatina delicada e nucléolos visíveis (Figura 6C). O citoplasma é de coloração basofílica e apresenta grânulos de coloração acidofílica. À medida que essas células passam pelo processo de maturação, tornando-se células mielóides maduras, elas perdem os grânulos citoplasmáticos, o núcleo sofre segmentação e os nucléolos desaparecem, com exceção dos eosinófilos e mastócitos que permanecem com grânulos citoplasmáticos evidentes. Em alguns polimorfonucleares, o núcleo é segmentado, mas assume uma forma de anel (Figura 6D), também chamados como *donut*. Essa característica é peculiar de roedores (Yang et al., 2013). O citoplasma assume uma coloração acidofílica.

Em relação aos demais tipos celulares, o monócito é similar ao do homem e pode ter um núcleo com forma variada (Figura 6E). O macrófago é uma célula com baixa proporção núcleo:citoplasma e que apresenta granulações diferentes em seu citoplasma, que não são comumente visualizadas no estado inativo dessas

células em outras espécies (Figura 6F). O linfócito, em geral, é uma célula pequena com citoplasma escasso e pouco basofílico, tem uma grande proporção núcleo:citoplasma (Figura 6G). O plasmócito é uma célula ovóide com núcleode cromatina condensada localizado na periferia do citoplasma, este é de coloração basofília, mas com uma região negativa (não corada) próxima ao núcleo (Figura 6H).

Da série megacariocítica, o megacariócito imaturo é uma célula grande em relação às outras séries, mas pequeno em relação ao megacariócito maduro. Apresenta citoplasma de coloração basofílica e, uma alta proporção núcleo:citoplasma (Figura 6I). O núcleo é grande e sem segmentações. O megacariócito maduro é uma célula com baixa proporção núcleo:citoplasma e que apresenta grânulos em seu citoplasma. Além disso, é uma célula multinucleada (Figura 6J).

Figura 6- Características morfológicas das células da medula óssea de hamsteres sadios (↑). A: eritróide imaturo, B: eritróide maduro, C: mielóide imaturo, D: neutrófilo, E: eosinófilo, F: macrófago, G: linfócito, H: plasmócito, I: megacariócito imaturo, J: megacariócito maduro. Coloração: Rosenfeld. Microscopia óptica 100x.

4.3.2 Mielograma de hamsteres com LV

Após a caracterização morfológica das células do aspirado de medula óssea, iniciamos a contagem diferencial das células no mielograma. Neste exame, fizemos a análise apenas nos animais com 90 e 120 dias pós-infecção, já que foi a partir dos 90 dias pós-infecção que o animal desenvolveu o quadro pancitopênico.

A análise do mielograma dos animais com 90 dias de infecção revelou um aumento significativo na relação de maturação mielóide em relação aos animais controles. Nos demais parâmetros avaliados, observamos uma tendência de aumento no índice de maturação eritroide (Tabela 4).

Tabela 4 - Mielograma dos hamsteres com LV aos 90 e 120 dias pós-infecção e hamsteres controles

	90 dias pós-infecção		120 dias pós-infecção	
	Controle (N=4)	Infectado (N=5)	Controle (N=7)	Infectado (N=4)
Mielóide:Eritróide	4,4 (3,4-6,1)	4,6 (3,3-12,9)	8,1 (4,6-9,1)	6,3 (5,0-7,1)
Mielóide Imaturo: Mielóide Maduro	0,01 (0,01-0,02)	0,09 (0,07-0,09)*	0,05 (0,03-0,06)	0,05 (0,03-0,09)
Eritróide Imaturo: Eritróide Maduro	0,1 (0,02-0,4)	0,4 (0,2-1,2)	0,2 (0,2-0,5)	0,2 (0,1-0,3)
Mielóide Imaturo (%)	0,7 (0,4-4,4)	5,2 (4,0-6,1)	2,4 (1,8-3,4)	3,0 (1,9-4,9)
Mielóide Maduro (%)	59,6 (51,4-68)	59,8 (56,4-67,9)	60,6 (50,7-68,0)	59,8 (56,4-67,9)
Eritroide Imaturo (%)	0,5 (0,05-4,7)	3,6 (2,0-4,4)	2,0 (2,0-3,2)	1,5 (0,5-3,2)
Eritroide Maduro (%)	3,0 (1,9-13,3)	10,0 (3,2-14,2)	6,2 (4,2-9,8)	9,1 (8,3-9,6)
Linfócito (%)	33,2 (19,3-43,6)	22,8 (16,4-25,1)	30,8 (15,8-32,6)	23,7 (19,1-26,0)
Plasmócito (%)	0,3 (0,0-2,0)	0,6 (0,2-1,0)	1,0 (0,4-2,4)	1,5 (0,6-1,7)
Monócito/Macrófago (%)	0,3 (0,05-1,9)	0,4 (0,2-0,5)	0,2 (0,2-0,4)	0,2 (0,0-0,5)
Megacariócito (%)	0,1 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,2)	0,0 (0,0-0,1)

*P< 0,05 em relação ao respectivo grupo controle (teste de Mann-Whitney).

Nos animais com 120 dias de infecção, o mielograma não revelou alterações nos parâmetros analisados entre os hamsteres com LV e o grupo controle (Tabela 4).

4.4 Análise histopatológica da medula óssea

Para complementar os dados obtidos no mielograma, realizamos um exame histopatológico da medula da tíbia nos animais com LV e no grupo controle. As principais lesões observadas nos hamsteres infectados foram aumento de celularidade (Figura 8 A e B) e proliferação macrofágica.

Quando analisamos a celularidade, vimos que os hamsteres com LV apresentaram um aumento significativo na celularidade quando comparados aos animais controles, a partir dos 90 dias pós-infecção (Figura 7 C e D).

Figura 7- Avaliação da celularidade da medula óssea de hamsters com LV e hamsters controles. Exame histopatológico da medula da tíbia (H-E). (A) Hamster controle; medula óssea normocelular. (B) Hamster com LV; medula óssea hipercelular. Análise semiquantitativa (escore; mediana e percentis 25 e 75) da celularidade: (C) 90 dias pós-infecção e (D) 120 dias pós-infecção. * $P < 0,05$ em relação ao controle (teste de Mann-Whitney).

Uma alteração que se destacou nos animais com LV foi a proliferação macrofágica. Esta já estava presente nos animais infectados a partir dos 90 dias com intensidade variando de média a moderada com distribuição multifocal e/ou difusa. Esse padrão de lesão permaneceu nos animais com 120 dias de infecção, mas com intensidade mais severa em alguns casos (Figura 8).

Figura 8- Exame histopatológico da medula óssea. (A) Hamster controle. (B) Hamster infectado; proliferação macrofágica focal. (C) Hamster infectado; proliferação macrofágica difusa. H-E.

Realizamos uma análise quantitativa da área ($1.190 \mu\text{m}^2$) ocupada pela proliferação macrofágica selecionando 10 campos aleatórios do tecido, vimos que em média 2% da área estava ocupada por macrófagos, a partir dos 90 dias pós-infecção, nos animais com LV. A área ocupada nos animais com LV, a partir dos 120 dias de infecção, aumentou para 6% em média, embora não tenha sido um aumento significativo nesse período. O padrão de lesão parece evoluir com a progressão da doença (Figura 9).

Proliferação macrofágica em hamsteres com LV

Figura 9- Morfometria da medula óssea. Porcentagem da área ocupada por macrófagos em hamsteres infectados com 90 e 120 dias pós-infecção.

Para complementar os dados da análise histopatológica, avaliamos nos animais infectados a ocorrência de deposição de ferro e aumento de fibras reticulares, alterações essas descritas em humanos com LV (Rocha-Filho et al., 2000; Yarali et al., 2002). Para tanto, realizamos colorações específicas em biopsia de medula óssea.

Não observamos deposição de ferro em células da medula óssea dos animais com LV quando comparados com os animais controles. Em contrapartida, observamos nos animais infectados um aumento significativo das fibras reticulares nos hamsteres com 90 dias pós-infecção em comparação aos animais controles (Figura 11 A). A distribuição das fibras reticulares nos animais com 90 dias de infecção era de distribuição multifocal e/ou difusa com intensidade variando de média a severa. No período de 120 dias pós-infecção, os animais com LV não apresentavam uma alteração importante desse parâmetro (Figura 10 B).

Figura 10- Análise da presença de fibras reticulares em hamsteres com LV. Análise semiquantitativa (escore; mediana e percentis 25 e 75) aos 90 (A) e 120 (B) dias pós-infecção e controles respectivos. * $P < 0,05$ em relação ao respectivo controle (teste de Mann-Whitney). Análise histopatológica em hamster controle (C) e hamster com LV (D). Coloração: reticulina.

4.4 Expressão de mRNA de IGF-I na medula óssea em hamsteres com LV e hamsteres controles

Na padronização da reação de PCR em tempo real para avaliarmos a expressão de mRNA de IGF-I, as curvas de dissociação à temperatura de *melting*, para o gene IGF-I e controle interno (β -actina), revelaram um pico único em uma

temperatura de 81,91°C e 79,08°C, respectivamente, demonstrando a amplificação correta do gene alvo sem produtos inespecíficos (Figura 12).

Figura 11- Curva da temperatura de *melting* de IGF-I (azul) e β -actina (verde).

Após a etapa de padronização, avaliamos a expressão de mRNA de IGF-I na medula óssea de hamsteres com 90 e 120 dias de infecção e hamsteres controles. Vimos que os animais infectados no período de 90 dias de infecção tiveram um aumento significativo na expressão de mRNA de IGF-I quando comparamos com seu grupo controle (Figura 12 A), enquanto que no período de 120 dias pós-infecção, não vimos diferença significativa em relação ao grupo controle (Figura 12 B).

Figura 12- Expressão de mRNA de IGF-I em hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *L.(L.) infantum*, com 90 (A) e 120 (B) dias de infecção e hamsteres controles. *P < 0,05, teste de Mann-Whitney.

5 DISCUSSÃO

A infecção experimental em hamster com as espécies de *Leishmania* causadoras de LV vem sendo utilizada como ferramenta para o estudo dos mecanismos imunopatológicos desde 1967 (Ott et al., 1967; Goto e Lindoso, 2004). O aspecto mais relevante na utilização desse modelo experimental é a suscetibilidade do hamster. Este desenvolve um quadro patológico similar ao homem e ao cão, como alterações hematológicas marcadas por leucopenia e anemia, emagrecimento, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia e ausência de resposta de células T específicas a *Leishmania*, podendo chegar a óbito (Rodrigues et al., 1992; Requena, et al., 2000).

Um elemento a ser explorado na LV é o mecanismo patológico que leva a alterações hematológicas. Muito embora, as citopenias no sangue periférico sejam descritas tanto em humanos, cães e/ou modelos experimentais desde os primeiros relatos de casos (Sakkas et al., 2007), ainda não se tem um estudo detalhado dos componentes celulares e dos fatores que participam desse processo com enfoque na medula óssea, já que este é o principal órgão hematopoiético e alvo de replicação de *Leishmania*. Desta forma, propomos no nosso estudo avaliar as alterações hematimétricas em dois períodos de infecção e os eventos patológicos na medula óssea.

O nosso primeiro desafio foi detectar o período que começam as alterações hematológicas em hamsteres infectados com a cepa de *L. (L.) infantum*, MHOM/BR/1972/LD46, pois não encontramos suporte na literatura que fornecessem dados com essa cepa de *Leishmania* e com a mesma abordagem. Assim, realizamos um experimento, no qual acompanhamos a infecção até 225 dias. Durante todo o período, analisamos a taxa de sobrevivência dos animais e o estabelecimento da infecção com a contagem de LDU. Nessa etapa, vimos uma queda na taxa de sobrevivência dos animais a partir dos 130 dias pós-infecção. Para avaliarmos o estabelecimento da infecção fizemos a contagem de LDU aos 90 e 120 dias pós-infecção, quando observamos progressão da infecção, mais evidente na avaliação da LDU no baço. Ao compararmos nossos dados na literatura, vimos que a disseminação do parasito e

o desenvolvimento de sinais clínicos da doença dependem da quantidade de parasitos no inóculo e da via utilizada, mas em geral a infecção se estabelece e progride em hamsteres (Binhazim et al., 1993; Requena et al., 2000; Riça-Capela et al., 2003, Kaye et al., 2004). Com base nesses parâmetros, os dados a serem discutidos aqui serão referentes apenas às alterações observadas até 120 dias pós-infecção.

A primeira alteração hematológica observada nos animais com LV foi a trombocitopenia. Esta teve início a partir dos 60 dias de infecção com uma diminuição em torno de 16% em comparação ao grupo controle e se manteve até os 90 dias pós-infecção. Esse dado é bastante interessante, pois a maioria dos estudos em hamsteres com LV descrevem alterações apenas na série eritrocítica e/ou leucocítica (Marzochi et al., 2004). Em geral, em humanos com LV, a trombocitopenia aparece na fase mais crônica da doença com uma incidência em torno de 55-65% (Marwaha et al., 1991; Al-Jurrayan et al., 1995) e em cães em torno 29,3% dos casos (Ciaramella et al., 2005; Petanides et al., 2008). Em casos humanos, os trabalhos referem-se ao sequestro esplênico como a principal causa da destruição plaquetária, mas em cães, estudos abordam que a plaquetopenia também pode ser resultado de alterações no endotélio devido a vasculite, esplenomegalia, alterações na trombocitopoiese ou falha renal e hepática (Ferrer, 1992; Ciaramella et al., 2005). Na série eritrocítica, vimos alterações nos animais com LV apenas aos 90 dias de infecção no número de hemácias, níveis de hemoglobina e no VCM caracterizando uma anemia microcítica normocrômica. Aos 120 dias pós-infecção, não houve diferença significativa entre os grupos. A literatura descreve a anemia normocrômica normocrômica como o principal achado em humanos e cães com LV (Michalick e Genaro, 2010). As principais causas já relatadas são hemólise, sequestro de eritrócitos no baço, diminuição da fluidez lipídica da membrana dos eritrócitos, eritropoiese inefetiva, falha renal crônica, perda de sangue e mecanismos auto-imunes (Gagnaire et al., 2000; Yarali et al., 2002; Lafuse et al., 2013).

Na série leucocítica, as alterações surgiram a partir dos 90 dias pós-infecção com uma diminuição de 23,6% dos leucócitos totais nos animais com LV em relação ao grupo controle. Além disso, na contagem diferencial, vimos uma diminuição no número de linfócitos e neutrófilos, caracterizando um quadro de leucopenia com linfopenia e neutropenia absoluta. Aos 120 dias pós-infecção, a

diminuição do número total de leucócitos manteve-se nos hamsteres infectados com 23,0% em comparação aos hamsteres controle, seguida por uma linfopenia, monocitopenia e eosinopenia absoluta. Em humanos com LV, a leucopenia, neutropenia e eosinopenia são encontradas frequentemente em estudos clínicos e laboratoriais (Campos, 1995; Pearson, 1996; Berman, 1997). Na LVC, estudos mostram ocorrência de leucopenia moderada ou grave devido à queda nos valores relativos e absolutos de monócitos, eosinófilos, e principalmente de linfócitos (Costa-Val et al., 2007; Reis et al., 2006a). Em relação aos fatores que causam a leucopenia na LV, alguns estudos relatam o hiperesplenismo como principal causa (Cartwright et al., 1948), no entanto, para outros estudos, particularmente em cães com LV, a leucopenia 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).

Nas nossas condições experimentais, o hamster com LV desenvolve alterações hematológicas significantes, culminando com a pancitopenia em um período de 90 dias pós-infecção. A pancitopenia é uma alteração que contribui para a severidade da doença ativa na LV, mas ainda não se conhece bem em hamsteres experimentalmente infectados. Quando aprofundamos para descobrir as causas que levam às alterações hematológicas, basicamente dois fatores são apontados: disfunção medular e/ou destruição periférica dessas células. Como a medula óssea é o principal órgão hematopoiético, focamos nosso estudo na análise desse órgão em hamsteres com LV. Primeiramente, realizamos o mielograma, um exame que permite avaliar a proporção mielóide:eritróide (M:E), e as possíveis alterações displásicas nas células da medula óssea, pois é um indicador importante da atividade hematopoiética na medula óssea (Travlos, 2006, 2011)

O mielograma dos hamsteres com LV revelou alteração significativa no índice de maturação mielóide desses animais após 90 dias de infecção, com esse dado indicando um aumento nos precursores celulares da linhagem mielóide. Esse aumento não refletiu no aumento das células mielóides maduras, o que sugere um distúrbio na maturação e/ou diferenciação dessas células. Nos demais parâmetros, principalmente na proporção M:E não observamos diferença estatisticamente

significante nos períodos de 90 e 120 dias pós-infecção. Reis et al. (2006) viram em seu estudo que a proporção M:E aumentada pode estar associada à hiperplasia mielóide, resultante do aumento das linhagens de granulócitos, enquanto que uma redução da proporção M:E é atribuída à hiperplasia eritróide, resultante do aumento da série eritroide. Não observamos no mielograma alterações displásicas nas séries mielóide e eritróide.

No mielograma dos hamsteres com LV, não observamos alterações e prosseguimos com o exame histopatológico. Este foi essencial para a detecção de lesões importantes na medula óssea, destacando aqui o aumento da celularidade e a proliferação macrofágica. O aumento da celularidade foi maior aos 90 dias pós-infecção. Esse aumento representa uma hiperplasia nas células da medula óssea devido ao processo infeccioso. A proliferação macrofágica, foi observada nos animais com LV quando comparados aos sadios onde essa lesão estava ausente. Os animais com LV apresentaram uma lesão de intensidade média a severa, no entanto, sem diferença significativa entre os animais infectados com 90 e 120 pós-infecção. Em outros estudos, o de Natami et al. (2000) reportaram aumento do número de macrófagos na medula óssea de cães com LV, e Bathia et al. (2011) também descreveram aumento do número de macrófagos em 81,2% dos casos humanos com LV. Outros estudos relataram hiperplasia monocítica em órgãos linfoides, como medula óssea, linfonodos e baço (Mylonakis et al., 2005; Barrouin-Melo et al., 2006; Giunchetti et al., 2008).

No exame histopatológico, partimos para uma análise mais detalhada da medula óssea utilizando corantes específicos para determinação de fibrose e/ou depósito de ferro. Alguns estudos já descreveram em humanos e/ou cães, que a LV é uma doença sistêmica e basicamente fibrótica (Corbett et al., 1993; Souza et al., 2014). Com essa abordagem, tentamos identificar se as alterações observadas na medula óssea, particularmente a proliferação macrofágica, induziam e/ou estavam acompanhadas por uma lesão fibrótica. Vimos que os infectados apresentaram um aumento significativo desta proliferação. Em nossos animais ficou claro o aumento de fibras reticulares nos animais infectados em comparação aos controles. Destacamos que o padrão de lesão fibrótica foi mais severo nos hamsteres com 90 dias pós-infecção e que o aumento das fibras reticulares estava presente nas regiões com

proliferação macrofágica tanto de distribuição difusa como também focal com característica de granuloma. No estudo desenvolvido por Rocha Filho et al. (2000) fez-se um acompanhamento em humanos com calazar e descreveram que estes apresentavam fibrose na medula óssea. A deposição de ferro não foi observada em nossos animais, em contraste ao descrito em outros estudos onde a deposição de ferro foi observada nos tecidos de humanos e/ou cães com LV (Dhingra et al., 2010; Souza et al., 2014).

Na LV, sabemos que o hamster é um modelo suscetível e desenvolve a doença em sua forma plena, mas um fato interessante é que em todos os parâmetros avaliados no exame hematimétrico, mielograma e exame histopatológico, as diferenças das alterações foram significantes nos hamsteres com LV aos 90 dias pós-infecção, com aparente estabilização ou tendência à normalização na fase posterior. A leucopenia foi a única alteração que se manteve após esse período. A nossa expectativa era que a partir do momento que os animais apresentassem um quadro pancitopênico, essa alteração e as demais observadas na medula óssea se mantivessem com a progressão do quadro infeccioso.

A leucopenia foi a única alteração hematológica que permaneceu aos 120 dias pós-infecção. Esse dado é bastante interessante, pois como não vimos alterações significantes na medula óssea nesse período, o dado pode sugerir que o recrutamento de leucócitos para outros órgãos, seja possivelmente o principal mecanismo da diminuição dessas células no sangue periférico (Alvar et al., 2004).

Com relação a série eritrocítica, vimos que na LV já foram relatados diferentes mecanismos que promovem alteração nesse compartimento celular em outras espécies mas não em hamster. Um estudo de Lafuse et al. (2013) demonstrou um aumento de progenitores eritróides no baço e medula óssea de hamster infectado com *L. donovani*, com anemia. Nesse estudo, os autores sugerem que esta alteração seja em decorrência da inibição da eritropoiese por citocinas que induzem a apoptose de eritroblastos. No nosso caso, no mielograma vimos uma tendência de aumento nos progenitores eritróides de hamsteres com LV com 90 e 120 dias pós-infecção, entretanto, somente aos 90 dias esses animais apresentaram anemia. Assim, parece haver uma recuperação aos 120 dias pós-infecção, já que não vimos diferenças entre os animais controles e animais infectados, nos níveis de hemoglobina e número de

eritrócitos. Uma possível explicação é que aconteça uma hematopoiese extramedular no baço.

Em roedores, vários fatores podem estimular a hematopoiese extramedular no baço, particularmente, a eritropoiese (Kim, 2010). Realizamos o exame histopatológico de baço e fígado em nossos animais e não vimos indicativos de hematopoiese extramedular. No entanto, em *imprint* de baço dos animais infectados, na maioria dos casos havia a presença de eritroblastos em diferentes graus de diferenciação (dados não mostrados), sugerindo uma possível hematopoiese extramedular nesse órgão. Alguns autores relatam que no exame citológico de baço, a presença frequente de eritroblastos em diferentes estágios de maturação pode ser indicativa de hematopoiese (Johns e Christopher, 2012).

Ainda focando nas alterações hematológicas, a plaquetopenia foi a primeira alteração observada no sangue periférico dos hamsteres com LV. Quando analisamos a medula óssea desses animais, não detectamos displasias importantes nos megacariócitos. Logo, com base no que já tem sido descrito na literatura, a destruição plaquetária no baço pode ser a principal causa nesse modelo (Varma e Nassem, 2010).

Não observamos muitas alterações no mielograma, que nos permitissem o entendimento das alterações observadas no sangue periférico, desta forma o exame histopatológico da medula óssea foi fundamental para esclarecer o comprometimento desse órgão na infecção leishmaniótica, com intensa proliferação e/ou infiltrado de macrófagos em todos os casos. Alguns estudos descrevem um aumento de macrófagos em medula óssea de humanos e cães com LV, no entanto, não vimos nenhum estudo que tenha esclarecido o papel dessas células, particularmente na hematopoiese (Anosa e Idowu, 1983). Com a limitação do nosso estudo, não conseguimos caracterizar essas células, mas acreditamos que a resposta para os mecanismos que levem a dishematopoiese estejam diretamente relacionados ao papel funcional desse componente celular na medula óssea.

Após a tentativa de caracterizar todos os eventos relacionados ao sangue periférico e a medula óssea de hamsteres com LV, buscamos ainda entender que fatores pudessem estar relacionados às lesões observadas na medula óssea.

O IGF-I é um importante promotor de crescimento celular, produzido por vários tipos celulares, inclusive macrófagos (Arkins et al., 1993; Ratajczak et al., 1994). Sabe-se que IGF-I estimula progenitores mielóides e eritróides no processo de maturação e/ou diferenciação, mas o conhecimento da sua função, particularmente, no processo hematopoiético é ainda incipiente (Correa e Axelrad, 1991; Zumkeller, 2002). Nos dados obtidos em nosso estudo, IGF-I parece ter uma participação importante nas células da medula óssea dos animais com LV, pois havia um aumento significativo do mesmo nos hamsteres infectados em relação ao grupo controle, aos 90 dias pós-infecção.

Visto que a presença de macrófagos foi uma lesão importante na medula óssea de hamsteres com LV e que alguns trabalhos mostraram que as mesmas produzem IGF-I (Rom et al., 1988), sugerimos que esse aumento de IGF-I esteja relacionado a essas células. Não vimos diferenças no mielograma que evidenciassem alguma displasia que representasse problemas de maturação e/ou diferenciação das células, o que nos leva a pressupor que o aumento de IGF-I esteja contribuindo para a manutenção do processo hematopoiético e que fatores extramedulares sejam os principais responsáveis pela citopenia periférica observada nesses animais. Os macrófagos estromais fazem parte dos elementos celulares que são essenciais para a manutenção das interações entre as células hematopoiéticas e o estroma na medula óssea (Geffner et al., 1990). Já foi demonstrado que essas células produzem IGF-I e suas proteínas ligadoras (Nagaoka et al., 1990). Além disso, o IGF-I exerce uma influência direta nas células hematopoiéticas. Há estudos relatando que doses fisiológicas de IGF-I aumentaram diretamente o crescimento de *Unidade Formadora de Colônia Eritroblástica* (CFU-E) sem depender de outros fatores de crescimento e/ou diferenciação (Claustres et al., 1987). Considerando essas informações e o fato da *Leishmania* poder infectar macrófagos estromais (Murray et al., 1992) e poder induzi-los a produzir fatores que aumentam a mielopoiese (Cotterell et al., 2000), sugere-se a importância dessas células na gênese das lesões na medula óssea. Como não se tem nenhum estudo descrevendo detalhadamente a função e a localização dos macrófagos na medula óssea na LV, estudo aprofundado destes aspectos são necessários em estudos futuros.

6 CONCLUSÃO

- a) Hamster infectado com *L.(L.) infantum* mostrou ser um bom modelo experimental para o estudo da patogenia da pancitopenia da LV;
- b) Hamster desenvolve pancitopenia quando infectados por *L. (L.) infantum*;
- c) A infecção induz um aumento na celularidade e na proliferação e/ou infiltrado macrofágico na medula óssea;
- d) O aumento de fibras reticulares na medula óssea sugere um padrão de lesão fibrótica na LV em hamster;
- e) O aumento de IGF-I na medula óssea dos hamsteres com LV, com pancitopenia, parece ser um fator importante na mielopoiese.

REFERÊNCIAS

Abboud SL, Bethel CR, Aron DC. Secretion of insulinlike growth factor I and insulinlike growth factor-binding proteins by murine bone marrow stromal cells. *J Clin Invest.* 1991 Aug; 88(2): 470-5.

Abreu RT, Carvalho MG, Carneiro CM, Giunchetti RC, Carvalho AT, Martins-Filho AO et al., Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *PLoS.* 2011; 6(5):e18873.

Al-Jurayyan NA, Al-Nasser MN, Al-Fawaz IM, Al Ayed IH, Al Herbish AS, Al-Mazrou AM et al., The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. *J Trop Pediatr.* 1995; Jun; 41(3): 143-8.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012; 7(5): e35671.

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

Alter BP, Young NS. Bone marrow failure syndromes. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT, Oski FA, editors. *Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood.* 6th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2003.216-37.

Anosa VO, Idowu AL. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1983. Sep;30(8):600-8.

Arkins S, Rebeiz N, Biragyn A, Reese DL, Kelley KW. Murine macrophages express abundant insulin-like growth factor-I class I Ea and Eb transcripts. *Endocrinology.* 1993; Nov; 133(5):2334-43.

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; Dec; 154(6):1003-11.

Barrouin-Melo SM, Laranjeira DF, Santos SO, Chagas-Júnior AD, Paixão M, Aguiar PH et al. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006 Jun 15;111(3-4):251-61.

Basano SA, Camargo, ALM. Leishmaniose tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7(3):328-37.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*. 1997 Apr;24(4):684-703.

Bhatia P, Haldar D, Varma N, Marwaha R, Varma S. A case series highlighting the relative frequencies of the common, uncommon and atypical/unusual hematological findings on bone marrow examination in cases of visceral leishmaniasis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;3(1):e2011035.

Binhazim AA, Chapman WL, Shin SS, Hanson WL. Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania infantum* in hamsters and dogs. *Am J Vet Res* 1993 Jan; 54(1):113–20.

Biswas T, Jayanta KP, Khudiram N, Ghosh DK, Ghosal J. Lipid peroxidation of erythrocytes during anemia of the hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1995 May 24;146(2):99–105.

Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-André I, Chabanne L. Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1997 May; 56(3-4):345-51.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

Bryceson, A.D.M. Leishmaniasis. In Cook, G.C. editor. *Manson's Tropical Diseases*. London: WB Saunders Company. 1996.1213-45.

Campos Jr D. Características do calazar na criança. Estudo de 75 casos. *Pediatria (Rio J)*. 1995; 71: 261-5.

Canela J R, Alves CJ M, Rodrigues GC. Perfil diagnóstico de leishmaniose visceral em humanos adultos admitidos no Hospital Universitário Clemente Faria. *Unimontes Cient Montes Claros*. 2004; 6(2):107-11.

Carrillo E, Jimenez MA, Sanchez C, Cunha J, Martins CM, da Paixão Sevá A et al. Protein malnutrition impairs the immune response and influences the severity of infection in a hamster model of chronic visceral leishmaniasis. *PLoS One*. 2014 Feb 25; 9 (2): e89412.

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

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

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 Nov;141(21):539-43.

Claustres M, Chatelain P, Sultan C. Insulin-like growth factor I stimulates human erythroid colony formation in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Jul;65(1):78-82.

Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol*. 2005 May;21(5):244-9.

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

Corbett CE, Duarte MI, Bustamante SE. Regression of diffuse intralobular liver fibrosis associated with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1993 Nov; 49(5):616-24.

Correa PN, Axelrad AA. Production of erythropoietic bursts by progenitor cells from adult human peripheral blood in an improved serum-free medium: role of insulin like growth factor 1. *Blood*. 1991 Dec 1;78(11):2823-33.

Costa CH, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Jul-Aug;43(4):386-92.

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 Apr; 68 (4): 1840-48.

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

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 Feb-Apr;122(2-3):213-6.

Diebold J, Molina T, Camilleri-Broët S, Le Tourneau A, Audouin J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy review. *Histopathology*. 2000 Sep;37(3):199-211.

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 Jan-Mar;53(1):96-100.

Duarte, MIS. Patologia das principais doenças tropicais no Brasil. Leishmania (calazar). In: Brasileiro Filho, G. editor. Bogliolo Patologia. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000; 1215-75.

Farrell JP. Leishmania donovani: acquired resistance to visceral leishmaniasis in the golden hamster. *Exp Parasitol*. 1976 Aug;40(1):89-94.

Ferrer L. Leishmaniasis. In: Kirk RW, Bonagura JD editores. *Current Veterinary Therapy XI*. WB Saunders, USA, 1992. 266-70.

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

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974 Apr; 17(4):331-40.

Gagnaire MH, Galambrun C, Stéphan JL. Hemophagocytic syndrome: A misleading complication of visceral leishmaniasis in children--a series of 12 cases. *Pediatrics*. 2000 Oct;106(4):E58.

Geffner ME, Bersch N, Lippe BM, Rosenfeld RG. Hintz RL, Golde DW. Growth hormone mediates the growth of T-lymphoblast cell lines via locally generated insulin-like growth factor I. *J. Clin Endocrinol Metab*. 1990;71(2):464-9.

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

Gontijo B, de Carvalho Mde L. [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Jan-Feb;36(1):71-80.

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Apr; 8(4):419-33.

Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2004 Apr; 37(4):615-23.

Hall LR , Titus RG. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 1995; 155(7):3501-06.

Harvey JM. Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. Philadelphia W. B. Saunders Company. 2001; 1 ed. p 228.

Helmi Ferial I, Al-Allawi, Nasir AS, Al-Attar, Adil M. Hematological changes in kala azar: a study of 82 Iraqi patients. J Community Med. 1993; 69: 85-90.

Jain NC. Clinical interpretation of changes in leukocyte numbers and morphology. In Schalm's Veterinary Hematology. 1986; 4th edition, p. 821–37.

Johns JL, Christopher MM. Extramedullary hematopoiesis: a new look at the underlying stem cell niche, theories of development, and occurrence in animals. Vet Pathol. 2012; May; 49 (3): 508-23.

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

Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunol Rev. 2004 Oct; 20:239-53.

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; 21:74–79.

Khodke K, Marwash S, Buxi G, Yadav,R.B ; Chaturvedi,N.K. Bone Marrow Examination in Cases of Pancytopenia. J Indian Acad Clin Med 2001; 2:55-59.

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(1):37-42.

Kim CH. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. J Blood Med 2010; 1:13-19.

Knight R, Woodruff AW , Pettitt LE. The mechanism of anaemia in kala-azar. A study of 2 patients. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1967; 61(5): 701-5.

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

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.

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.

Lainson, R.; Shaw, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W and Killick-Kendrick R. eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Academic Press, London. 1987; 1-120.

Lewis DJ, Ward RD. Transmission and Vectors. In: Peters, W.; Killick-Kendrick, R. eds. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press 1987; 235-262.

Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 2009; 160(2): 311-318.

Lund JE. Toxicologic effects on blood and bone marrow. In Schalm's *Veterinary Hematology*, 5th edition Feldman BF, Zinkl JG. and Jain NC. Editors. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, 2000. p 44-50.

Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzkowski Z, Kowalska MA, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood* 2001; 97(10):3075-3085.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJ, Amendoeira MR Leishmaniose Visceral (Calazar). *J Bras Med*. 1981; 41(5):61-84.

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; 43:357-362.

Meira JA. Directions and trends of therapy, infectious diseases. *Rev Paul Med*. 1948; Dec; 33(6):374-8.

Melby PC, Tabares A, Restrepo BI, Cardona AE, McGuff HS, Teale JM: *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol*. 2001; 99:17-25.

Merchav S, Lake M, Skottner A. Comparative studies of the granulopoietic enhancing effects of biosynthetic human insulin-like growth factors I and II. *J Cell Physiol*. 1993 Oct; 157(1):178-83.

Michalick, MSM, Genaro O. Leishmaniose visceral Americana. In: Neves, *Parasitologia Humana*. 11ª ed. São Paulo: Atheneu; 2010. 11:67-83.

Murray HW, Squires KE, Miralles CD, Stoeckle MY, Granger AM, Granelli- et al. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J Immunol*. 1992 Mar; 15;148(6):1858-63.

Mylonakis ME, Day MJ, Leontides LS, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, Polizopoulou Z et al. Type of smear may influence thrombopoietic cell counts in the bone marrow of clinically healthy dogs. *Vet Clin Pathol*. 2005 Dec; 34(4):358-61.

Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression in the human macrophage-like cell line U937. *J Clin Invest*. 1990 Feb; 85(2):448-55.

Natami A, Sahibi H, Lasri S, Boudouma M, Guessouss-Idrissi N, Rhalem A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. *Vet Res* 2000; 31(3): 355-363.

Noli C. Leishmaniosis canina. *Waltham Focus* 1999; 9:16-24.

Ott KJ, Hanson WL, Stauber LA. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. *J Parasitol*. 1967 Jun; 53(3):641-5.

Panzenböck B, Bartunek P, Mapara MY, Zenke M. Growth and differentiation of human stem cell factor/erythropoietin-dependent erythroid progenitor cells in vitro. *Blood*. 1998 Nov 15; 92(10):3658-68.

Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1996 Jan; 22(1):1-13.

Pearson RD, Cox G, Evans T, Smith DL, Weidel D, Castracane J. Wasting and macrophage production of tumor necrosis factor/cachectin and interleukin 1 in experimental visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1990 Dec; 43(6):640-9.

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 Jul-Aug; 22(4):866-72.

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

Picker LJ, and Siegelman M.H.. Lymphoid Tissues and Organs. In *Fundamental Immunology*. 3rd Edition. Paul WE, editor. New York: Raven Press; 1993. p145-97.

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 Jun; 25(6):1594-600.

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

Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. *Postgrad Med J*. 2006 Oct;82(972):649-57. Review. Corrected and republished in: *Postgrad Med J*. 2007 Feb;83(976):649-57.

Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. *J Pediatr*. 2004; 80:141-146.

Rahim F, Rehman F, Ahmad S, Zada B. Visceral leishmaniasis in District Dir, NWFP. *J Pak Med Assoc*. 1998 Jun;48(6):161-2.

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 Jul; 94(1):320-7.

Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W et al. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006 Aug 15; 112(3-4):102-16.

Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000 Oct 31; 76(3-4):269-81.

Riça-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes G, Campino L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res*. 2003; Feb; 89 (3): 163-9.

Rocha Filho FD, Ferreira FV, Mendes Fde O, Ferreira FN, Karbage A, Alencar ML et al. Bone marrow fibrosis (pseudo-myelofibrosis) in human kala-azar. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000; Jul-Aug; 33 (4): 363-6.

Rodrigues Júnior V, Da Silva JS, Campos-Neto A. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasite Immunol*. 1992 Jan; 14(1):49-58.

Rodriguez-Tarduchy G, Malde P, Lopez-Rivas A, Collins MK. Inhibition of apoptosis by calcium ionophores in IL-3-dependent bone marrow cells is dependent upon production of IL-4+. *J Immunol* 1992; 148(5):1416-22.

Rom WN, Basset P, Fells GA, Nukiwa T, Trapnell BC, Cysal RG. Alveolar macrophages release an insulin-like growth factor I-type molecule. *J Clin Invest*. 1988 Nov; 82(5):1685-93.

Ross R. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. *Br Med J* 1903a; 2(2239):1401.

Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. Br Med J 1903; 2(2237):1261-62.

Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. Science 1984; 223(4643):1417-19.

Sakkas LI, Boulbou M, Kyriakou D, Makri I, Sinani C, Germenis A et al. Immunological features of visceral leishmaniasis may mimic systemic lupus erythematosus. Clin Biochem. 2008 Jan; 41(1-2):65-8.

Schermer S. The Blood Morphology of Laboratory Animals. Davis, Philadelphia, PA. 3rd edition. 1967; p 43–49.

Schwartz GN, Hudgins WR, Perdue JF. Glycosylated insulin-like growth factor II promoted expansion of granulocyte-macrophage colony-forming cells in serum-deprived liquid cultures of human peripheral blood cells. Exp Hematol. 1993 Oct;21(11):1447-54.

Slappendel RJ, Greene CE. Leishmaniasis. In: Mills LE. Infectious diseases of the dog and cat. Philadelphia: WB Saunders, 1990. p.769-77.

Song J, Kiel MJ, Wang Z, Wang J, Taichman RS, Morrison SJ, et al. An in vivo model to study and manipulate the hematopoietic stem cell niche. Blood 2010; 115(13):2592-00.

Souza CC, Barreto Tde O, da Silva SM, Pinto AW, Figueiredo MM, Rocha OG, et al. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. Int J Exp Pathol 2014; 95(4):260-270.

Stauber LA. Host resistance to the Khartoum strain of *Leishmania donovani*. Rice Inst Pamphlet. 1958; 45:80-96.

Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux Ja, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Ann Parasitol Hum Comp. 1993; 68(2):107-8.

Travlos GS, Hard GC, Betz LJ, Kissling GE. Chronic progressive nephropathy in male F344 rats in 90-day toxicity studies: its occurrence and association with renal tubule tumors in subsequent 2-year bioassays. Toxicol Pathol. 2011 Feb; 39(2):381-9.

Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. Toxicol Pathol. 2006; 34(5):548-65.

Trincão C, Nogueira P, Gouveia E. Quadro hemático e medular do hamster dourado (*Cricetus Auratus*). An Inst Med Trop. 1949 Lisb. 1949 Dec;6:41-6.

Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral leishmaniasis/kala azar. Indian J Hematol Blood Transfus. 2010 Sep;26(3):78-82.

Wang LD, Wagers AJ. Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011 Sep 2;12(10):643-55.

Weiss DJ. Myelodysplastic syndromes. In: Weiss, D.J.; Wardrop, K.J. Shalm's veterinary hematology. 6th ed. Iowa. Wiley Blackwell, 2010. p.467-74.

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):32-39.

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

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

Yamaguchi RA, French TW, Simpson CF, Harvey JW. *Leishmania donovani* in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis. J Am Anim Hosp Assoc. 1983;19:723-26.

Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EAG, El-Hassan IM, El-Hassan AM. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2003 Feb; 3(2):87-98.

Zumkeller W. The Insulin-like Growth Factor System in Hematopoietic Cells. Leukemia and Lymphoma. 2002; 43(3):487-91.

Zumkeller W, Schofield PN. Growth factors, cytokines and soluble forms of receptor molecules in cancer patients. Anticancer Res 1995; 15(2):343-48.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7025 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 28 de setembro de 2011.

Ilmo (a)

Dra. HIRO GOTO

(aos cuidados de Amanda Rodrigues de Almeida Torres)

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 2011/109** e intitulado "Participação do fator de crescimento insulina símile I na patogênica da pancitopenia em *Leishmaniose* visceral em hamster", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Dr. Paulo Cotrim

Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP