



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DAYANE FRANCISCA HIGINO MIRANDA

**Alterações na medula óssea de cães com leishmaniose visceral: um estudo
clínico-patológico**

TERESINA (PI)

2018

DAYANE FRANCISCA HIGINO MIRANDA

**Alterações na medula óssea de cães com leishmaniose visceral: um estudo
clínico-patológico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias/UFPI para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a Dra. Maria Socorro Pires e Cruz

Coorientadora: Prof^a Dr^a. Flaviane Alves de Pinho

TERESINA (PI)

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

M672a Miranda, Dayane Francisca Higino

Alteração na medula óssea de cães com leishmaniose visceral :
um estudo clínico-patológico / Dayane Francisca Higino Miranda
- 2018.

122 f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Piauí, Programa de
Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2018.

1. Leishmaniose visceral 2. Cão 3. Medula óssea 4. Histopatologia
5. Mielograma 6. Fibrose 7. Alopurinol I. Título.

CDD 636.089 693 64

**ALTERAÇÕES NA MEDULA ÓSSEA DE CÃES COM LEISHMANIOSE
VISCERAL: UM ESTUDO CLÍNICO-PATOLÓGICO**

DAYANE FRANCISCA HIGINO MIRANDA

Tese aprovada em: 12/03/2018

Banca Examinadora:

Maria do Socorro Pires e Cruz
Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz (Presidente) / DMV/CCA/UFPI

Lucilene dos Santos Silva
Profa. Dra. Lucilene dos Santos Silva (Interna) / Bolsista PNPB-CAPES/UFPI

Airton Mendes Conde Junior
Prof. Dr. Airton Mendes Conde Junior (Interno) / CCS/UFPI

Daniel de Araújo Viana
Prof. Dr. Daniel de Araújo Viana (Externo) / UECE

Flaviane Alves de Pinho
Profa. Dra. Flaviane Alves de Pinho (Externa) / UFBA

Luciano Santos da Fonseca
Prof. Dr. Luciano Santos da Fonseca (Externo) / UEMA

Pelo amor, conhecimento e apoio, dedico este trabalho

Aos meus pais: Francisco e Francisca,

Por tudo isso e muito mais ...

“Que dentro de nós existam 3 coisas fundamentais:

A força, a fé e Deus

A força para viver e lutar pelos sonhos e vitórias,

A fé para fazer tudo tornar possível,

E Deus para estar sempre no controle de

todas as coisas e fazendo o melhor.

Yla Fernandes

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos que me foram concedidas. A cada momento que passo, a cada obstáculo que enfrento, por me permitir amar e sonhar, agradeço por tudo!!!

Aos meus pais Francisco e Francisca pelo apoio incondicional durante a minha vida. Imagino quantos sonhos desistiram de realizar, para que eu pudesse realizar os meus. Agradeço por serem o grande exemplo de honestidade, bondade e generosidade.

Aos meus irmãos Paulo e Bruno, que sempre torcerem por mim, pelo apoio e incentivo.

Ao meu noivo, Saul, pelo amor, apoio, compreensão, sempre me incentivando em tudo;

A Sra. Joana, Sr. Otacílio, Josy, Diego e Vanessa, pelo apoio e por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao Prof. Dr. Francisco Assis Lima Costa (*in memoriam*), por ser um exemplo de professor, pesquisador e amigo. Você será sempre um dos meus maiores referenciais de sabedoria, humildade e simplicidade. Essa conquista é nossa. Saudades eternas.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Socorro Pires e Cruz, agradeço pela oportunidade oferecida, pela orientação, paciência, amizade, apoio, por sua competência e por contribuir imensamente na minha formação.

À minha coorientadora Profa. Dra. Flaviane Pinho Alves, por ser um exemplo de pessoa correta e profissional dedicada, por me ensinar a evoluir pessoalmente e profissionalmente.

À Universidade Federal do Piauí, ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal, por fornecer condições para a realização desta pesquisa.

À banca examinadora da minha qualificação composta pelo Prof. Dr. Wagner Luiz Tafuri, Profa. Dra. Marcia dos Santos Rizzo pelas contribuições dadas que foram essenciais para melhoria deste trabalho.

Ao Leopoldo Marçal, Nailson Melo, Luana Moura, Marcielly, pela disposição e imensa contribuição para a realização deste projeto.

Aos meus queridos amigos e professores do Departamento de Morfologia (CCS/UFPI), a Profa. Dra. Carla Maria, Prof. Dr. Airton Conde, Layane, Liana, Marina, Maurício, Sergio Guerra pelo incentivo, pelo convívio durante quase três anos de trabalho e pelos momentos alegres e, em especial, ao Fábio, André, Marcos e Maria Francisca por compreenderem a minha ausência e me auxiliarem no trabalho enquanto eu realizava as coletas de materiais do doutorado. Guardo vocês no meu coração.

Às professoras, aos residentes, aos estagiários e funcionários do Setor de Patologia Animal/CCA/UFPI, Profa. Dra Silvana Maria, Profa. Dra. Silvia França, Alexandra, Werner, Eglésia, Jerfferson, Emanuelle, Raquel, Rosângela, Natália e Ricardo pela acolhida, pelo convívio, compreensão e por toda a ajuda.

Ao Sr. Manoel pela amizade e o processamento do material utilizado neste trabalho.

Ao diretor do Hospital Veterinário Universitário (HVU) da UFPI, Prof. Dr. João Macedo de Sousa, e aos funcionários do Hospital Veterinário Universitário (HVU) pela colaboração.

Ao Sr. Francisco pelos cuidados prestados aos cães durante todo o período que permaneceram no canil.

Aos colegas de trabalho do Biotério Geral e Departamento de Zootecnia, Prof. Dr. Xavier, Profa. Dra. Zenaide, Prof. Dr. Daniel, Prof. Dr. Manoel, Silvéria, Adeline, Raíssa, Erika e Sávio pelo apoio e compreensão.

Aos funcionários da Gerência de Zoonose de Teresina (PI) pelo apoio e dedicação dos funcionários no fornecimento dos animais para a realização da pesquisa.

Aos cães por doarem suas vidas em contribuição ao experimento.

A todos aqueles não citados nominalmente, mas cujas contribuições foram de suma relevância em meu desenvolvimento científico e pessoal, bem como na realização deste trabalho.

A todos, minha sincera gratidão.

RESUMO

MIRANDA, D.F.H.M. **Alterações na medula óssea de cães com leishmaniose visceral: um estudo clínico-patológico**. 2018. 122f.. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

A medula óssea é considerada um dos órgãos alvos para a detecção de *Leishmania spp.* Estudos mostram que a presença do parasita causa alterações relevantes na hematopoiese e, por conseguinte, levando a citopenias periféricas comumente observadas em pacientes humanos e caninos com leishmaniose visceral (LV). Diante disso, o presente estudo teve como objetivos o estudo clínico, parasitológico e histológico da medula óssea de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*, classificados em assintomáticos e sintomáticos, bem como avaliar o efeito do tratamento com alopurinol na medula óssea e na resposta clínico-laboratorial de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Nesse contexto, foram utilizados inicialmente quarenta e seis cães classificados de acordo com o escore clínico: assintomáticos (n=9), sintomáticos (n=30), animais não infectados (n=7), os quais foram submetidos à avaliação clínico-laboratorial, histopatológico e análise fenotípica por citometria de fluxo da medula óssea. Em um segundo momento, seis cães foram submetidos ao tratamento com alopurinol, na dose de 20mg/kg, via oral, por 90 dias, os quais foram acompanhados do início do tratamento (D0) a 120 dias após o início do tratamento (D120). Análise clínica, laboratorial, parasitológica, mielograma e a análise histopatológica da medula óssea foram realizadas para investigar as modificações ocorridas na medula óssea após o tratamento. Dos cães com LV, as principais alterações clínicas observadas foram: 89% apresentaram linfadenomegalia (35/39), 41% lesões cutâneas (34/39), 38,46% lesões oculares (15/39). Anemia foi observada em 82% (32/39) dos cães, trombocitopenia em 30,78% (12/39), hipergamaglobulinemia em 64,1% (25/39). No exame histopatológico da medula óssea, os cães apresentaram aumento da celularidade, hiperplasia da série mieloide, aumento da relação M:E e aumento de macrófagos na morfometria em animais assintomáticos. Além disso, foi observado um aumento significativo de fibras de reticulina nos cães com LV, sendo em maior intensidade nos animais sintomáticos. Na medula óssea dos cães com LV, também foi observado um aumento significativo de macrófagos correlacionados positivamente com a carga parasitária (P=0,009). Pela citometria de fluxo, a intensidade média de fluorescência de MHCII em células CD14⁺ foi menor nos animais sintomáticos. Nos animais submetidos ao tratamento na avaliação clínica do D0, 100% (6/6) apresentavam linfadenomegalia, 66,7% (4/6) lesões cutâneas e 66,7% (4/6) mucosas hipocoradas. No D120, 100% (6/6) apresentavam linfadenomegalia e 50% (3/6) lesões cutâneas. Na avaliação laboratorial no D0, as alterações marcantes foram anemia em 83,3% (6/5) dos cães e 66,7% (4/6) com hiperproteinemia. No D120, houve recuperação da anemia em 83% dos animais e redução dos níveis de IgG total e das subclasses IgG1 e IgG2. Na avaliação do mielograma no D0, observou-se redução de precursores eosinofílicos (mielócito, metamielócitos e bastonetes) e de metamielócitos neutrófilos. No D120, houve redução de segmentado neutrófilo e aumento de plasmócitos. Em conclusão, alterações na celularidade e fibrose da medula óssea ocorrem em animais naturalmente infectados por *L. infantum* sendo mais acentuadas em animais sintomáticos. Animais submetidos ao tratamento com alopurinol apresentam melhora clínico-laboratorial e modificações na celularidade avaliada no mielograma.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, cão, medula óssea, histopatologia, mielograma, fibrose, alopurinol.

ABSTRACT

MIRANDA, D.F.H.M. Changes in the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis: a clinical-pathological study. (Thesis) 122f. Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2018.

Bone marrow is considered one of the target organs for the detection of *Leishmania* spp. Studies have shown that the presence of the parasite causes relevant changes in hematopoiesis and therefore leading to peripheral cytopenias commonly observed in human and canine patients with visceral leishmaniasis (VL). The aim of the present study was to study the clinical, parasitological and histological aspects of the bone marrow of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* classified as asymptomatic and symptomatic, as well as to evaluate the effect of treatment with allopurinol in the bone marrow and clinical- laboratory of dogs naturally infected by *L. infantum*. In this context, forty-six dogs classified according to the clinical score were asymptomatic (n = 9), symptomatic (n = 30), non-infected animals (n = 7), which were submitted to clinical-laboratory evaluation, histopathology and phenotypic analysis by flow cytometry of the bone marrow. In a second phase, six dogs were treated with allopurinol at a dose of 20mg / kg orally for 90 days, followed by treatment (D0) at 120 days after treatment (D120). Clinical, laboratory, parasitological, myelogram and histopathological analysis of the bone marrow were performed to investigate the changes occurred in the bone marrow after the treatment. Of the dogs with LV, the main clinical alterations observed were: 89% had lymphadenomegaly (35/39), 41% had cutaneous lesions (34/39), 38.46% had eye lesions (15/39). Anemia was observed in 82% (32/39) of dogs, thrombocytopenia in 30.78% (12/39), hypergammaglobulinemia in 64.1% (25/39). In the histopathological examination of the bone marrow, the dogs presented increased cellularity, myeloid series hyperplasia, increased M: E ratio and increased macrophages in morphometry in asymptomatic animals. In addition, a significant increase of reticulin fibers was observed in dogs with LV, being more intense in the symptomatic animals. In the bone marrow of dogs with VL, a significant increase of macrophages positively correlated with parasite load (P = 0.009) was also observed. By flow cytometry, the mean MHCII fluorescence intensity in CD14 + cells was lower in symptomatic animals. In the animals submitted to treatment in the clinical evaluation of D0, 100% (6/6) had lymphadenomegaly, 66.7% (4/6) cutaneous lesions and 66.7% (4/6) hypochromic mucous membranes. In D120, 100% (6/6)

presented lymphadenomegaly and 50% (3/6) cutaneous lesions. In the laboratory evaluation in the D0, the marked changes were anemia in 83.3% (6/5) of the dogs and 66.7% (4/6) with hyperproteinemia. In D120, anemia was recovered in 83% of the animals and the levels of total IgG and subclasses IgG1 and IgG2 were reduced. In the evaluation of the myelogram at the D0, a reduction of eosinophilic precursors (myelocyte, metamielocytes and rods) and neutrophil metamielocytes was observed. In D120, there was a reduction of the target neutrophil and increase of plasma cells. In conclusion, alterations in cellularity and fibrosis of the bone marrow occur in animals naturally infected by *L. infantum* being more pronounced in symptomatic animals. Animals submitted to treatment with allopurinol present clinical-laboratory improvement and modifications in the cellularity evaluated in the myelogram.

Key words: visceral leishmaniasis, dog, bone marrow, histopathology, myelogram, fibrosis, allopurinol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1:** Status da edemicidade da leishmaniose visceral no mundo (WHO, 2015)..... 20
- Figura 2:** (A) Alopecia periocular, (B) lesão ulcerativa no lábio, (C) perda de peso grave (Arquivo pessoal-LIV, 2016)..... 23

CAPITULO I

- Figura 1** Estratégia de *gate* utilizada para a seleção de células CD14⁺ e a expressão de MHC II em medula óssea..... 44
- Figura 2** Secção de medula óssea da crista ilíaca de cão, coloração Hematoxilina-eosina (HE). (a) aumento da celularidade intertrabecular em cão adulto naturalmente infectado com *L. infantum*, (Barra= 75µm). (b) celularidade normal em cão adulto, controle, (Barra= 75µm). (c) macrófagos com distribuição focal (seta preta) (Barra= 50µm). (d) macrófagos com distribuição difusa a coalescente (setas pretas) (Barra= 75µm). (e) aumento de precursores da linhagem mielóides (Barra= 25µm)..... 50
- Figura 3** Deposição de fibras de reticulina na medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e cães não infectados. Coloração de prata amoniacal (Gomori). Testes de Kruskal-Wallis e Dunns, *P<0,05..... 52
- Figura 4** Secção de medula óssea da crista ilíaca de cão sintomático naturalmente infectado com *L. infantum*. (a) Depósito de fibras reticulares delgadas e dispersas (Grau 1), no espaço intertrabecular óssea (Barra= 25µm). (b) Depósito de fibras reticulares delgadas com continuidade, distribuídas difusamente (Grau 2) no espaço intertrabecular óssea (Barra= 75µm). (c) Fibrose acentuada, com deposição de fibras delgadas e densas, distribuídas difusamente, no espaço intertrabecular óssea (Barra= 50µm). Coloração de prata amoniacal (Gomori)..... 53
- Figura 5** Medula óssea da crista ilíaca de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum*. (a) Aspirado demonstrando coloração negativa para Azul da Prússia (Perls) (Barra= 75µm). (b) Aspirado demonstrando aumento dos depósitos de ferro (Barra= 100 µm). Coloração de Azul da Prússia (Perls)..... 54

Figura 6 Correlação entre o estoque de ferro no aspirado e na biópsia da medula óssea de cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> . Teste de Spearman.....	55
Figura 7 Correlação entre a carga parasitária na medula óssea e a contagem de macrófagos por morfometria. Teste de Spearman.....	56
Figura 8 Intensidade média de fluorescência (IMF) de MHC II em células CD14 ⁺ monócitos/macrófagos na medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> e cães não infectados. P<0,05. Teste de Kruskal-wallis.....	57

CAPITULO II

Figura 1: Aspirado de medula óssea de cão com LV. A, mitoses atípicas (setas). B, <i>donut cells</i> (célula em rosca) (seta). C, hipersegmentação neutrofílica (setas). D. Percursos binucleados (setas). E, emperipolesi (seta). Corante Romanowsky (Barra=100µ).....	87
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

- Tabela 1** Ocorrência de sinais clínicos em cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*..... 46
- Tabela 2** Avaliação dos parâmetros laboratoriais[#] e parasitológico (molecular) de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e animais não infectados..... 48
- Tabela 3.** Avaliação das alterações histopatológicas e morfometria da medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e animais não infectados..... 51

CAPITULO II

- Tabela 1.** Frequência dos sinais clínicos e média da carga parasitária de cães naturalmente infectados por *L. infantum* "pré" e "pós" tratamento com Alopurinol..... 80
- Tabela 2.** Resultados do escore clínico, carga parasitária e hemograma dos animais antes (D0) e pós tratamento (D120) com Alopurinol..... 82
- Tabela 3.** Avaliação dos parâmetros laboratoriais[#] e imunológicos de cães infectados por *L. infantum* antes e pós-tratamento com alopurinol e animais não infectados 83
- Tabela 4.** Avaliação da celularidade relativa e taxa de maturação c medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum* ant tratamento com Alopurinol e animais não infectados..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS

%-Percentual

μL- Microlitro

μm- micrometro

A.platys- *Anaplasma platys*

Ag- antígeno

ALT- Alanina aminotransferase

CD 14⁺- Marcador de superfície celular de monócitos e granulócitos

CD11b⁺- Integrina com alta expressão nos monócitos

Cm- Centímetro

CXCL12- chemokine (C-X-C motif) ligand 1

dL- Decilitro

DNA- Ácido desoxirribonucleico

D.O.- Densidade óptica

DPP – Teste imunocromatográfico rápido em dupla plataforma

EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético

EJ:EM- Eritróide Jovem: eritróide madura

ELISA- *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

g- Grama

G-Gaudes

h- Horas

H₂SO₄3N- Ácido sulfúrico 3 normal

Hb- Hemoglobina

He- Hemácias

H-E-Hematoxilina- eosina

HRP- Peroxidase de rábano

Ht-Hematócrito

IFN-γ- Interferon gama

IgG - Imunoglobulina G

IL-Interleucina

IM- intramuscular

IMF- Intensidade média de fluorescência
kDNA- Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto
Kg- Kilograma
L. infantum-*Leishmania infantum*
LIV- Laboratório de imunologia veterinária
LVC- Leishmaniose visceral canina
LV-Leishmaniose visceral
mg- miligrama
MHC II- Molécula classe II do Complexo de Histocompatibilidade Principal
MJ:MM-Mielóide jovem: mielóide madura
mL- Mililitro
mM- milimolar
Mm³- milímetro cúbico
N- Número
ng- Nanograma
°C-Graus Celsius
OPD- Orthiphenylene diamine
PBS- Tampão fosfato salino
PCR- *Polymerase Chain Reaction*
PFA-Paraformaldeído
pH- Potencial hidrogeniônico
qPCR- Reação em cadeia de polimerase quantitativa
Relação M:E- Relação mielóide: eritróide
SFB- Soro fetal bovino
SFM- Sistema fagocítico mononuclear
SLA- Antígeno solúvel de *Leishmania*
T CD 8- Linfócito T CD8
TGF-β- Fator de transformação do crescimento beta
Th1- Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas (IL-2 e IFN-γ)
Th2- Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10)
TNF-α- Fator de necrose tumoral tipo α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 <i>Leishmania</i> e Leishmanioses.....	20
2.2 Leishmaniose visceral canina.....	22
2.3 Aspectos gerais da imunidade na LVC.....	23
2.4 Alterações hematológicas na leishmaniose visceral canina (LVC).....	24
2.5 Medula óssea.....	26
2.6 Alterações na medula óssea na LVC.....	28
2.7 Tratamento na LVC.....	29
3. OBJETIVOS.....	33
4. CAPÍTULO I.....	34
Introdução.....	36
Materiais e métodos.....	38
Resultados.....	46
Discussão.....	58
Conclusão.....	61
Agradecimentos.....	62
Referência bibliográfica do capítulo I.....	63
5. CAPÍTULO II.....	69
Introdução.....	70
Materiais e métodos.....	72
Resultados.....	79
Discussão	88
Conclusão.....	92
Agradecimentos.....	92
Referência bibliográfica do capítulo II.....	94
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	102
APÊNDICE	
ANEXO	

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) vem se espalhando gradualmente nos últimos 30 anos, sendo considerada um grave problema para a saúde pública (WERNECK, 2014). No país, epidemias de LV foram relatadas em centros urbanos como Teresina (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990), Natal (JERONIMO et al., 1994), São Luís (SILVA et al., 2008), Boa Vista (GUERRA et al., 2004), Cuiabá (MESTRE et al., 2011), Campo Grande (BOTELHO; NATAL, 2009) e Belo Horizonte (SILVA et al., 2001). Nesse cenário, os canídeos domésticos são os reservatórios domésticos da doença por apresentarem elevado parasitismo cutâneo mesmo quando clinicamente assintomáticos (DEANE, 1956; HARHAY et al., 2011; COSTA, 2012).

Na leishmaniose visceral canina (LVC), as manifestações clínicas são inespecíficas e aparecem devido ao acometimento de órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear como baço, fígado, medula óssea e linfonodos. Muito embora as lesões histopatológicas sejam classicamente descritas nesses órgãos (XAVIER et al., 2006; SOLANO-GALLEGO et al., 2011), ainda são limitadas as informações sobre o padrão histopatológico e a natureza das lesões na medula óssea de cães com LV (MOMO et al., 2014), particularmente, em abordagens que visam à busca de parâmetros com valor prognóstico e/ou preditivo e às alterações ocorridas nesse órgão após tratamento para LVC.

Assim, a medula óssea vermelha, por ser alvo para a proliferação de *Leishmania* em cães e humanos, gera modificações no funcionamento desse órgão ocasionando citopenias no sangue periférico (BOGLIOLO, 1956; DHINGRA et al., 2010; HAZNEDAROGLU et al., 2002; KUMAR et al., 2007; MOMO et al., 2014). Alterações hematológicas sempre estão presentes desde os primeiros sinais da doença (KEENAN et al., 1984), sendo a anemia a mais frequente (em torno de 50-70% dos casos) em graus variáveis de gravidade (FREITAS et al., 2012). No entanto, de acordo com a evolução da infecção, a leucopenia e trombocitopenia são observadas em diversos casos e, juntamente com a anemia, representam a forma hematológica mais grave, conhecida como pancitopenia (ALVAR et al., 2004; PETANIDES et al., 2008; FREZOULIS et al., 2017).

Com base nos principais mecanismos envolvidos nas alterações hematológicas na LVC, sabe-se que parte deles estão relacionados ao comprometimento da medula

óssea, que é observado por alterações no mielograma como hiperplasia mieloide com aumento de precursores de neutrófilos e granulócitos, aumento de macrófagos, monócitos, plasmócitos e células de Mott, alterações envolvendo a série vermelha (eritrofagocitose, hipoplasia eritróide e displasia) e displasia megacariocítica (ANOSA; IDOWU, 1983; YAMAGUCHI et al., 1983; FOGLIA MANZILLO et al., 2006). Em poucos relatos na literatura, as principais lesões histopatológicas na medula óssea vermelha de cães com LV são identificadas por presença de granulomas, displasia megacariocítica, hipoplasia de células brancas, infiltrado inflamatório constituído principalmente por plasmócitos e macrófagos, presença de hemossiderina e em casos mais graves pode ocorrer aplasia medular (TOPLU; AYDOGAN, 2011; MOMO et al., 2014), mas sem um estudo aprofundado sobre a repercussão das mesmas na progressão da doença. Em pacientes humanos com LV, como a anemia é comprovadamente um fator de risco, têm-se várias pesquisas reforçando a identificação de possíveis parâmetros na medula óssea de importância prognóstica, a saber, fibrose (KUMAR et al., 2007; TOOGHEH et al., 2010).

Diante do exposto, o comprometimento da medula óssea é evidente nos cães com LV, mas a caracterização morfológica das lesões nesse órgão é pobremente discutida na LVC. Assim, propusemos um estudo do padrão histopatológico das lesões na medula óssea em cães naturalmente infectados por *L. infantum* e o efeito do tratamento nesse órgão.

REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Leishmania* e Leishmanioses

As leishmanioses são consideradas umas das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. São relatadas como endêmicas em cinco continentes, com 310 milhões de pessoas em risco de desenvolver a doença. Aproximadamente 90% dos casos estão concentrados em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão (ALVAR et al., 2012; WHO, 2017) (Figura 1).

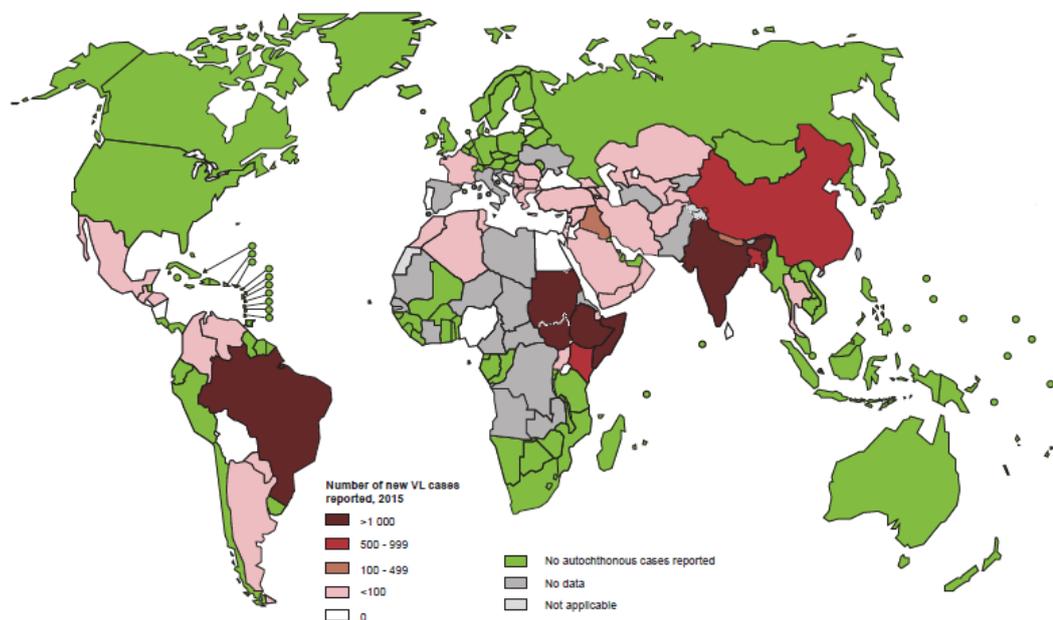


Figura 1: Status da edemicidade da leishmaniose visceral humana no mundo (WHO, 2015).

Nas leishmanioses, dependendo da espécie envolvida, tem-se a doença cutânea ou visceral. Nas leishmanioses cutâneas, as lesões podem estar presentes na pele de forma localizada ou disseminada, bem como nas mucosas. No Velho Mundo, as principais espécies são *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) donovani* e nas Américas são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana* (TORRES-GUERRERO et al., 2017). Em outros casos, disseminam-se para órgãos internos, tais como, o fígado, baço e medula óssea, causando a leishmaniose visceral (LV) que é fatal

quando não tratada (DRUZIAN et al., 2015), levando a, aproximadamente, 20.000 a 40.000 mortes por ano no mundo (WHO, 2017).

A LV é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). Caracteriza-se por uma doença endêmica zoonótica causada pelas espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (sinônimo de *L. chagasi* nas Américas) (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000; PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; REITHINGER et al., 2007).

Considerando a presença ou ausência de reservatórios animais para *Leishmania*, dois tipos básicos de ciclos epidemiológicos são observados: a forma zoonótica, geralmente causada pela *L. infantum* nas Américas, Oriente Médio, Ásia Central, China e Mediterrâneo, sendo os cães os reservatórios domésticos, e a forma antroponótica com transmissão de humanos para humanos sem envolvimento de reservatório animal, causada pela *L. donovani*, que é prevalente na África Ocidental, Bangladesh, Índia e Nepal (GRAMICCIA, 2011; PALATNIK-DE-SOUSA; DAY, 2011; ROATT et al., 2014).

No ambiente silvestre, os principais reservatórios são também canídeos, destacando-se as raposas *Cerdocyon thous* (SHERLOCK, 1996; SOUZA et al., 2010), *Lycalopex vetulus*, *Spheotos venaticus* (FIGUEIREDO et al., 2008; SOUZA et al., 2010), *Didelphis albiventris* (HUMBERG et al., 2012), gambás – *Didelphis marsupialis* (CORRECTOR et al., 1989; ZULUETA et al., 1999) e ratos – *Rattus rattus* (ZULUETA et al., 1999).

As leishmânias são transmitidas entre hospedeiros humanos e animais pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas no ato do repasto sanguíneo, sendo estas pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, encontrado no Velho Mundo e *Lutzomyia*, nas Américas (MACHADO-COELHO et al., 1999; MAROLI et al., 2013; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Aproximadamente das 900 espécies de flebotomíneos conhecidas, em torno de 70 delas tem sido implicada na transmissão da leishmaniose (READY, 2013). No Brasil, o principal vetor envolvido na transmissão do parasito é da espécie *Lutzomyia longipalpis*, mas no Estado do Mato Grosso do Sul (MS) já se tem registrado transmissão por meio da espécie *Lutzomyia cruzi* (DE OLIVEIRA et al., 2017).

As formas infectantes das leishmânias, que são transmitidas aos hospedeiros vertebrados pelos vetores, são as promastigotas metacíclicas. O parasita também

apresenta as formas paramastigota e promastigota não metacíclicas que se multiplicam no trato digestivo dos vetores e as formas amastigotas que são parasitos obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) do hospedeiro vertebrado (ALCOLEA et al., 2010).

No Brasil, a LV era uma doença predominantemente rural, mas atualmente se encontra em franca expansão e urbanização (GONTIJO; MELO, 2004; MARCONDES; ROSSI; ROSSI, 2014). De acordo com o Ministério da Saúde, dos 27 estados brasileiros, 26 estados já notificaram casos da enfermidade em humanos, sendo que no ano de 2016 foram registrados 3.200 novos casos, distribuídos em 1.523 no Nordeste, 578 na região Norte, 492 na região Sudeste, 158 na região Centro Oeste, 9 na Região Sul e 340 nas unidades federativas ignoradas, e os cinco estados com maior número de casos são o Maranhão (655), Minas Gerais (592), Pará (341) Ceará (283), e Tocantins (208) (BRASIL, 2017).

No Piauí, foram registrados entre 1990 a 2016, 1.369 casos, com 236 óbitos nesse período, a taxa de incidência da doença oscilou durante os anos, sendo que em 2016 a incidência da LV no estado foi de 5,4% (BRASIL, 2017).

A primeira grande epidemia de LV no Brasil ocorreu em Teresina (COSTA; PEREIRA; ARAÚJO, 1990; DRUMOND; COSTA, 2011). Atualmente, os municípios do Piauí onde há maior número de casos de LV são: Teresina (86,2%), Parnaíba (6,6%), Miguel Alves (5,0%) e Floriano (3,6%) (SILVA et al., 2012).

2.2 Leishmaniose visceral canina (LVC)

O cão possui grande importância epidemiológica no ciclo biológico da LV pelo fato de a prevalência canina ser alta em áreas endêmicas, uma vez que esse hospedeiro é a primeira escolha, no ambiente urbano, para o repasto sanguíneo pelo flebotomíneo e mais suscetíveis à infecção (WERNECK, 2014). Além disso, muitos cães infectados não apresentam sintomatologia da doença, porém, podem albergar parasitos na derme (DEANE, 1956; LAURENTI et al., 2013).

Em áreas endêmicas, a LVC é altamente prevalente, afetando cerca de 60% a 80% da população de cães, mas é acompanhada por uma baixa taxa de doença clínica (BERRAHAL et al., 1996; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; SILVA et al., 2012). Em Teresina, Piauí, cidade endêmica para LV, entre 1999 e 2009 foram registrados 20.969

casos de cães infectados, com prevalência de 19,27 casos/1000 cães (DRUMOND; COSTA, 2011).

Do ponto de vista imunológico, existem duas populações de cães infectados: uma que é claramente suscetível e outra resistente. Essas duas populações respondem clínico, imunológico e patologicamente diferente à infecção por *L. infantum* (COSTA, 2012).

As manifestações clínicas da LVC são variáveis, pois as características clínicas de cada animal, bem como a evolução da doença dependem de complexas interações entre o parasito e as respostas imunológicas e genéticas de cada hospedeiro (MANCIANTI et al., 1988; MAIA et al., 2010; BELO et al., 2013). As lesões cutâneas são as principais queixas dos proprietários tais como: alopecia (Figura 2A), onicogribose, descamação, lesão ulcerativa (Figura 2B), hiperqueratose, hipotricose e a presença de crostas localizadas ou generalizadas (SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014) mas podem ser observados outros sinais clínicos como hepatoesplenomegalia, linfadenopatias, cegueira, febre, hemorragia, diarreia, neuralgia, poliartrite, perda de peso grave (Figura 3B) e ceratoconjuntivite (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; SILVA et al., 2017).



Figura 2: (A) Alopecia periocular, (B) lesão ulcerativa no lábio, (C) perda de peso grave (Arquivo pessoal-LIV, 2016).

2.3 Aspectos Gerais da Imunidade na LVC

O curso da LVC está relacionado com a resposta imune do hospedeiro e com a persistência e proliferação do parasita na pele e nos órgãos internos. A resposta imune inata é responsável pela manutenção do parasita no organismo, já a resposta imune adaptativa responde pelo controle da infecção (MORENO; ALVAR, 2002).

Cães sintomáticos exibem supressão da resposta imune do tipo T *helper* 1 (Th1), estando associada com a ativação de células de perfil Th2 e predomínio de linfócitos T CD8 (PINELLI et al., 1994), havendo produção de citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β (BARBIERI, 2006; LEAL et al., 2014). Já a resistência à infecção está associada com o perfil de resposta do tipo Th1 com a secreção de citocinas IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α , envolvidas na ativação de macrófagos para eliminar amastigotas intracelulares (PINELLI et al., 1995, 1999; CORRÊA et al., 2007; LAGE et al., 2007; MENEZES-SOUZA et al., 2011).

Como visto, a infecção por *Leishmania* é controlada quando exibe um perfil de resposta mediada principalmente por células T, com a ativação de macrófagos (CARRILLO; MORENO, 2009). Essas células, mesmo sendo alvo da infecção, quando ativadas adequadamente, são eficazes na eliminação da *Leishmania* intracelular (LIU; UZONNA, 2012). No entanto, os macrófagos são modulados de maneira coordenada a expressar e/ou produzir moléculas essenciais para a sua atividade leishmanicida ou não (MAUËL, 1990; HANDMAN; BULLEN, 2002; LIU; UZONNA, 2012).

Estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de esclarecer os eventos iniciais que ocorrem após a interação dos macrófagos com a *L. infantum*, para isso são avaliados diversos marcadores de superfície expressos por monócitos/macrófagos, dentre eles o CD14 e o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHCII) (AMORIM et al., 2011). Amorim et al. (2011) demonstrou que a elevada expressão de CD14⁺CD11b⁺ e MHCII em células no sangue periférico de cães infectados com *L. infantum* estava relacionada com baixa taxa de infecção dos flebotomíneos através do xenodiagnóstico, sugerindo que a expressão desses receptores é importante para que essas células possam desempenhar sua atividade antiparasitária. Outro estudo realizado por Figueiredo et al. (2013), mostrou que o aumento da expressão de receptores, dentre eles CD14⁺ em macrófagos estava relacionado à menor carga parasitária no jejuno de cães infectados.

2.4 Alterações hematológicas na Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Estudos vêm demonstrando que o perfil hematológico pode servir como marcador para a determinação da gravidade da LVC, em particular, a anemia (REIS et al., 2006). As alterações hematológicas frequentemente relatadas são anemia, linfocitose,

eosinopenia, leucopenia, que pode ser moderada ou acentuada, e trombocitopenia (FREITAS et al., 2012).

Na LVC, a anemia é normocítica normocrômica, principalmente, em animais sintomáticos (LEAL et al., 2014). As causas de anemia podem estar associadas a perdas de sangue devido à epistaxe e ulcerações de pele, hemólise extra e intravascular associada com hiperesplenismo, processos inflamatórios, hipoplasia ou aplasia medular e deficiência nutricional (REIS et al., 2006; NICOLATO et al., 2013; ULCHAR; CELESKA; STEFANOVSKA, 2015). DE LUNA et al. (2000) demonstraram diminuição da fluidez lipídica da membrana de eritrócitos de cães com anemia decorrente da infecção por *L. infantum*, tendo como possível mecanismo para tal alteração a ocorrência de modificações de citoaderência nos receptores/ligantes de eritrócitos e aumento na rigidez celular favorecendo assim o sequestro esplênico das hemácias e sua consequente destruição, nesses animais.

As alterações leucocitárias são variáveis não sendo observado um padrão específico para a doença. Reis et al. (2006) demonstraram que, na evolução clínica da LVC, observam-se alterações hematológicas na série branca como linfocitose, em cães assintomáticos, e leucopenia caracterizada por monocitopenia, linfocitopenia e eosinopenia em cães sintomáticos. A neutrofilia pode estar presente como resposta à inflamação sistêmica e é evidente em animais com lesões cutâneas ulcerativas e com infecções bacterianas secundárias (NICOLATO et al., 2013; VIADANNA et al., 2017). As causas da leucopenia na LVC são multifatoriais sendo que a disfunção medular e/ou recrutamento de leucócitos para os órgãos afetados pelo parasito são as mais relatadas (NICOLATO et al., 2013).

A trombocitopenia é relatada em aproximadamente 15 a 50% dos animais infectados (COSTA-VAL et al., 2007; FREITAS et al., 2012), com redução mais acentuada de plaquetas em animais coinfectedos com *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* ou *A. platys* (DE TOMMASI et al., 2014). As possíveis causas de trombocitopenia no sangue periférico de cães com LV têm-se atribuído a alterações no endotélio pela vasculite, esplenomegalia, alterações na trombocitopoiese secundária a alterações imunomediadas, aumento na destruição e consumo de plaquetas, e a presença de anticorpos antiplaquetários (CORTESE et al., 2009; ULCHAR, CELESKA; STEFANOVSKA, 2015). A pancitopenia é caracterizada pela anemia, leucopenia e trombocitopenia e geralmente é observada nas fases mais avançadas da LVC. Em cães

com LV de áreas endêmicas no Mediterrâneo, a pancitopenia tem sido relatada em aproximadamente 23,5 a 33,6% dos animais (FREZOULIS et al., 2017). Dentre as principais causas relatadas sobre essa alteração, a disfunção na hematopoiese, devido à ação de citocinas inflamatórias, parece ser a principal causa (NICOLATO et al., 2013).

2.5 Medula óssea

A medula óssea (MO) é um tecido viscoso composto de um complexo microambiente que fornece suporte estrutural e nutricional essencial para a produção, diferenciação, proliferação, maturação e desenvolvimento de várias linhagens de células sanguíneas. Assim, a medula óssea é indiscutivelmente o órgão mais dinâmico e auto-renovável (ORKIN; ZON, 2008).

Histologicamente, o tecido é dividido em medula óssea vermelha e medula óssea amarela. A medula óssea vermelha é preenchida por uma rede de sinusóides e por uma camada de células endoteliais. As células hematopoiéticas e a estrutura de sustentação consistem em células reticulares, mesenquimais, endoteliais, neurais e matriz extracelular, localizados fora do espaço vascular (SHARKEY, 2010). Outra população importante são as células tronco hematopoiética (HSCs), que são células progenitoras multipotentes, extremamente raras, cuja função é manter altas taxas de geração de células sanguíneas maduras, diferenciando-se continuamente em vários tipos de células hematopoiéticas (KONDO et al., 2003; BUSCH et al., 2015). A medula óssea amarela é constituída por células mesenquimais que acumulam lipídios e não apresentam mais capacidade hematopoiética e sob certas condições que desencadeia o aumento da necessidade hematopoiética como por exemplo perda sanguínea grave, elas perdem lipídios e recuperam sua capacidade hematopoiética (GUREVITCH; SLAVIN; FELDMAN, 2007).

A celularidade varia conforme a idade e localização, em pacientes neonatos a celularidade que constitui a medula óssea vermelha é de aproximadamente 100%, gradativamente a medula óssea vermelha vai sendo substituída por tecido adiposo, e em pacientes idosos a celularidade é representada por aproximadamente 20% (WILKINS, 1992). Com relação a localização, a medula óssea é encontrada na cavidade de central de ossos chatos e longos (TRAVLOS, 2006b).

A medula óssea possui mecanismos de regulação altamente sofisticados que operam em diferentes níveis de desenvolvimento hematopoiético são necessários para promover um equilíbrio adequado entre a auto-renovação e diferenciação, a fim de assegurar que a produção celular contínua qualitativa e quantitativamente corresponda às exiências do organismo (TAKIZAWA; BOETTCHER; MANZ, 2012).

Infecções modificam significativamente a homeostasia da medula óssea, levando a profundas alterações na hematopoiese com disfunção de linhagens celulares sanguíneas, e na sua capacidade regenerativa (ZARETSKY; ENGILES; HUNTER, 2014). Esses eventos acontecem conforme o tropismo dos patógenos pelos componentes celulares da medula óssea e das respostas imunológicas do hospedeiro, portanto, sendo exploradas de forma individualizada (KING; GOODELL, 2011).

Em geral, a avaliação da medula óssea é realizada através do mielograma e do exame histopatológico (COTELINGAM, 2003; STACY; HARVEY, 2017).

A avaliação do mielograma é indicada para diferenciar precursores hematopoiéticos, determinar o aumento de linhagens de células potencialmente alteradas, bem como investigar a redução da celularidade da medula óssea em relação à contagem no sangue periférico. Também é utilizada para esclarecer a presença de células atípicas e com morfologia alterada presente na circulação sanguínea (REAGAN et al., 2011). Nos últimos anos, alguns estudos têm focado no mielograma de cães com LV na tentativa de estabelecer parâmetros indicativos de gravidade da doença (NICOLATO et al., 2013; PAPARCONI et al., 2013). A histopatologia da medula óssea é uma avaliação subjetiva e comumente utilizada para a avaliação detalhada da arquitetura *in situ*, sendo útil para determinar a média quantitativa da celularidade, estimar a proporção das séries Mielóide:Eritróide, depósito de ferro, fibrose e outras alterações, como detecção de neoplasias e estágios de malignidade, inflamação, presença de pigmentos e agentes infecciosos (COTELINGAM, 2003; TRAVLOS, 2006a). Na LVC, são poucos os relatos sobre as alterações histopatológicas nesse órgão (TAFURI et al., 2001; MOMO et al., 2014; PAOLA ET AL., 2016). A punção aspirativa e a biópsia da medula óssea são importantes métodos para a confirmação do diagnóstico de leishmaniose visceral (LV) (BATHIA et al., 2011). A punção aspirativa é considerada o padrão ouro como método de diagnóstico possuindo especificidade de 100% (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005, PAPARCONI et al., 2013).

2.6 Alterações na medula óssea na LVC

Embora muitos estudos demonstrem que a medula óssea na LV sofra mudanças consideráveis na sua composição celular (NICOLATO et al., 2013; MOMO et al., 2014; TEMIZ et al., 2014), ainda são poucas as pesquisas esclarecendo o mecanismo patogênico nesse órgão. Anosa e Idowu (1983), reportaram alterações no mielograma de um cão com leucocitose elevada, no qual observou redução no número dos precursores eritróides e aumento de precursores neutrofílicos, resultando em elevação da razão M:E de 8,12:1,00. Houve aumento, também, no número de linfócitos, plasmócitos, monócito, presença de células de Mott e foram vistos muitos macrófagos parasitados por *Leishmania*.

Foglia Manzillo et al. (2006), descreveram como alterações patológicas mais comuns na medula óssea de cães com LVC, a displasia megacariocítica, eritrofagocitose, displasia eritróide e emperipoese. Os autores propuseram que a displasia megacariocítica e eritróide provavelmente estavam correlacionadas a altos níveis de TNF- α e IFN- γ produzidos como resposta à ativação de macrófagos infectados. Em outro estudo, foi demonstrado, também pelo mielograma, que as alterações na leucopoiese e na eritropoiese estão relacionadas ao estado clínico e ao parasitismo na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum* (TRÓPIA DE ABREU et al., 2011).

Conforme status clínico, foi observado que cães sintomáticos apresentam redução de precursores eritróides, aumento de precursores neutrofílicos e neutrófilos segmentados, linfocitose e redução de precursores eosinofílicos na medula óssea que repercutiam em alterações periféricas, a citar, anemia, linfopenia e eosinopenia, respectivamente. Enquanto, cães assintomáticos apresentam discreta alteração como aumento do número de linfócitos na medula óssea (NICOLATO et al., 2013).

Em abordagens mais recentes, têm-se observado, com frequência, alterações displásicas no mielograma, dentre elas, mitose atípica em 61,5% dos casos, seguida de hipersegmentação dos granulócitos em 53,8%, metamielócitos gigantes e megacariócitos com desorganização nuclear em 23% dos animais (DE TOMMASI et al., 2014). Na análise histopatológica, a presença de granulomas difusos com formação nodular típica foi observada em 44,4% (4/9) dos cães sintomáticos, em 37,5 (3/8) nos assintomáticos e 31,25% (5/16) nos cães oligossintomáticos, outras alterações

observadas foram emperipoese e displasia em megacariócitos, redução do número de linfócitos e aplasia medular observadas com maior frequência em animais sintomáticos. Os autores atribuíram tais alterações à provável ação de mediadores inflamatórios locais estimulados pela presença da *Leishmania* (MOMO et al., 2014). Na análise morfométrica da medula óssea foi observado que animais com elevada carga parasitária apresentam redução do tecido hematopoiético (PAOLA et al., 2016).

2.7 Tratamento da LVC

Diferentes protocolos de tratamento vêm sendo utilizados em cães com LV, a maioria já estabelecidos nos países europeus (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Os principais fármacos são os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B convencional ou encapsulada em lipossomas, o sulfato de aminosidina, o alopurinol, a pentamidina e miltefosine (NOLI; AUXILIA, 2005; REGUERA et al., 2016). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprovou recentemente o uso do miltefosine (MAPA, 2016). Entretanto, as recomendações do Ministério da Saúde mantêm as medidas de proibição do tratamento da LVC com produtos de uso humano ou não registrados (BRASIL, 2006).

A opção pelo tratamento é uma alternativa à eutanásia dos cães infectados, que não tem sido o melhor método para impedir a expansão do parasito (WERNECK, 2014; SEVÁ et al., 2016). O tratamento de cães com LVC não visa somente ao aumento da expectativa de vida dos animais, mas também a diminuição da carga parasitária reduzindo, assim, o risco de transmissão da *L. infantum* (MIRÓ et al., 2011; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Os protocolos disponíveis podem promover a cura clínica de cães infectados e reduzir a carga parasitária em vários órgãos, dentre eles a pele (SILVA et al., 2012; REGUERA et al., 2016). Antes de determinar qual a melhor opção terapêutica a ser estabelecida é necessário a avaliação dos parâmetros clínico-patológicos (Solano-Gallego et al., 2011).

Os compostos antimoniais são utilizados há mais de 100 anos como fármacos de primeira linha no tratamento das leishmanioses (VIANNA, 1912). Seu mecanismo de ação possui atividade leishmanicida induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e promovendo o aumento da atividade fagocítica dos macrófagos (VOULDOUKIS et al., 2006). Em cães com LVC, os tratamentos com antimoniais normalmente induzem

melhora com remissão dos sinais clínicos e a redução da carga parasitária na medula óssea, linfonodo e pele, bem como diminuição na infectividade dos vetores (RIBEIRO et al., 2008). Outro efeito da terapia é a normalização dos parâmetros laboratoriais. Ikeda Garcia et al., (2008) observaram que cães com LV após o tratamento com antimoniato de meglumina, 57,1% deles tinham os índices hematológicos dentro dos valores de normalidade. Além disso, antes do tratamento, foram observadas no mielograma alterações como hipoplasia eritróide e granulocítica em 28,6% dos casos e que, após o tratamento, a medula óssea estava restabelecida.

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), outro fármaco utilizado no tratamento da LVC, possui toxicidade direta para o parasita por agir na membrana citoplasmática da *Leishmania* induzindo a apoptose (VINCENT et al., 2014). O fármaco é administrado sozinho mas tem sua eficácia melhorada com o uso combinado ao alopurinol (MIRÓ et al., 2009). De forma similar às outras drogas antileishmanias, há remissão dos sinais clínicos e laboratoriais, mas não é capaz de eliminar completamente o parasita em cães infectados (ANDRADE et al., 2011). Um estudo recente no Brasil avaliou a infectividade de cães com LV após tratamento com miltefosina. Após três meses de tratamento, houve redução significativa da carga parasitária na medula óssea, linfonodos e pele, bem como na taxa de infectividade, em que 74% dos cães apresentaram menor risco de transmitir o parasita ao vetor (TRAVI et al., 2018).

O alopurinol, um análogo estrutural da hipoxantina, é incorporado no RNA da *Leishmania* causando falha na tradução de proteínas, portanto atua como leishmaniostático (DENEROLLE; BOURDOISEAU, 1999; BANETH; SHAW, 2002;). Quando administrado aos cães como monoterapia antileishmania por um período de 2 a 3 meses, quase sempre leva a uma melhora clínica moderada com restauração parcial dos parâmetros laboratoriais (CAVALIERO et al., 1999; KOUTINAS et al., 2001). No entanto, com a interrupção do tratamento, na maioria dos casos, ocorre recidiva da doença (CAVALIERO et al., 1999). Por esse motivo, o alopurinol é, geralmente, administrado por longo período de tempo e sendo descritos poucos efeitos adversos (TORRES et al., 2011). Recentemente, foi reportada *in vitro* a resistência da *L. infantum* ao alopurinol sob doses crescentes do fármaco, tal informação é útil do ponto de vista da saúde pública e veterinária, por aumentar o impacto da doença no hospedeiro canino e o potencial de transmissão através dos flebotomíneos para o homem (YASURLANDAU et al., 2016).

Nesse contexto, considerando que a LV pode provocar alterações no microambiente da medula óssea e que pouco se sabe sobre as mesmas nesse órgão, o presente trabalho almejou caracterizar as lesões histopatológicas na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum* e estabelecer uma avaliação do impacto do tratamento com alopurinol nesse órgão.

Os dados serão apresentados na forma de dois artigos intitulados:

- 1) **Avaliação histopatológica da medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados com *Leishmania infantum***, seguindo as normas para publicação na revista International Journal of Experimental Pathology.

- 2) **Análise citológica e histopatológica da medula óssea de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum* tratados com Alopurinol**, seguindo as normas para publicação na revista Veterinary Parasitology.

3 OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização das alterações histopatológicas da medula óssea de cães com LVC e avaliação da influência da terapia com alopurinol nos parâmetros citológicos e histopatológicos da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em cães com LV e em cães não infectados:

1. As alterações nos exames hematológicos e bioquímicos;
2. Carga parasitária na medula óssea;
3. Alterações histopatológicas na medula óssea;
4. Depósito de ferro na medula óssea;
5. A fibrose na medula óssea;
6. A expressão de MHCII em macrófagos/monócitos CD14⁺ por citometria de fluxo;
7. A celularidade e as alterações histopatológicas da medula óssea e a titulação de IgG total, IgG1 e IgG2 em cães antes do início do tratamento e aos 120 dias após o início do tratamento com alopurinol.

4. CAPÍTULO I

Avaliação histopatológica da medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

Alterações na medula óssea de cães com LV

Dayane Francisca Higino Miranda¹, Leopoldo Fabrício Marçal¹, Luana Dias de Moura¹, Nailson de Jesus Melo², Aldina Maria Prado Barral^{3,4,5}, Manoel Barral-Netto^{3,4,5}, Debora Cavalcante Braz⁶, Hiro Goto^{7,8}, Daniel Araújo Viana⁹, Alessandra Estrela da Silva Lima¹⁰, Maria do Socorro Pires e Cruz¹¹, Flaviane Alves Pinho¹⁰

¹Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

²Graduação em Medicina veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

³Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Brazil

⁴Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

⁵Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, São Paulo, Brazil

⁶Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Brazil

⁷Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁸Departamento de Medicina Preventiva, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

⁹Laboratório de Anatomia Patológica e Patologia Clínica Veterinária-PATHOVET, Fortaleza, Ceará, Brazil

¹⁰Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

¹¹Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil

Autor para correspondência: Dayane Francisca Higino Miranda, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-550, Campus Socopo – S/N, Teresina, PI, Brasil. Telefone: +55 (86) 99972-4023, Email: dayanefhmiranda@gmail.com

Resumo

Na leishmaniose visceral canina são observadas alterações importantes na medula óssea que levam a citopenias periféricas em graus variáveis. Nesse contexto, objetivou-se caracterizar o padrão das lesões hispatológicas de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* oriundos de área endêmica Teresina-PI. Para tanto, foram avaliados sete cães não infectados e 39 cães com LV. Assim, a medula óssea foi obtida para análise histopatológica, parasitológica, e identificação de células CD14⁺ e expressão de MHC II por citometria de fluxo. Os cães infectados foram classificados em assintomáticos (N=9) e sintomáticos (N=30). No exame histopatológico da medula óssea, os cães infectados apresentaram aumento da celularidade, hiperplasia da série mielóide e aumento significativo de fibras de reticulina quando comparados aos animais controles. A análise do estoque de ferro na medula óssea revelou depósito em quantidades variáveis entre os animais. Havia também um aumento significativo de macrófagos (P=0,0014) correlacionados positivamente com a carga parasitária (r= 0,3846, P=0,0094). Pela citometria de fluxo, a intensidade média de fluorescência do MHC II em células CD14⁺ foi menor nos animais sintomáticos. Em conclusão, a presença da *L. infantum* repercute em alterações na medula óssea como hiperplasia mielóide, fibrose e expressão reduzida de MHC II em células CD14⁺, sendo que tais alterações ocorrem de forma mais acentuada em animais sintomáticos.

Palavras-chaves: cães, histopatologia, medula óssea, CD14, MHC II.

Introdução

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma zoonose com elevado impacto na saúde pública em países do Mediterrâneo e das Américas (Alvar *et al.* 2004; Otranto & Dantas-Torres 2013), sendo causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (Dantas-Torres *et al.* 2012) e transmitida pelos insetos vetores do gênero *Lutzomyia*, entre os hospedeiros mamíferos (Lainson *et al.* 1987). No ambiente peri-urbano e urbano, o cão é considerado o principal reservatório, por ser suscetível e apresentar intenso parasitismo cutâneo (Lima *et al.* 2010; Werneck 2014).

Os cães, quando infectados, podem não desenvolver sinais clínicos, mas uma população suscetível evolui para um quadro clínico grave sendo letal na maioria dos casos (Leal *et al.* 2014; Vasconcelos *et al.* 2017). No curso da infecção, o parasito tem tropismo por órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) como baço, fígado, medula óssea e linfonodos, mas pode atingir outros órgãos como rins, intestino, pulmões e coração (Alvar *et al.* 2004; Xavier *et al.* 2006; Silva *et al.* 2017). Como consequência, sinais clínicos não específicos como lesões de pele, linfadenomegalia generalizada, emagrecimento, esplenomegalia, mucosas pálidas, febre e diarreia podem ocorrer (Solano-Gallego *et al.* 2011).

Na LVC, as lesões histopatológicas em diferentes órgãos são classicamente documentadas e muitas delas têm sido consideradas a base para o entendimento da interação parasito-hospedeiro e como parâmetro para definir o perfil suscetível ou resistente do animal acometido pela infecção por *L. infantum* (Xavier *et al.* 2006; Koutinas & Koutinas 2014). Apesar disso, informações sobre a patologia e imunopatogênese na medula óssea de cães com leishmaniose visceral (LV) ainda são pouco discutidas, mesmo sabendo que a infecção causa perturbações na homeostasia

desse órgão culminando com alterações hematológicas, particularmente, a anemia que atinge em torno de 50-70% dos pacientes caninos com LV (Freitas *et al.* 2012; Ulchar *et al.* 2015; Reis *et al.* 2006a).

Estudos vêm demonstrando alterações patológicas no mielograma de cães sintomáticos com LV, como uma marcada redução da série eritróide, particularmente, dos eritroblastos ortocromáticos em associação com a anemia (Nicolato *et al.* 2013). Em contrapartida, a caracterização das lesões histopatológicas na medula óssea foram descritas em poucos relatos na literatura como presença de granulomas, displasia megacariocítica, aplasia medular, infiltrado inflamatório constituído principalmente por plasmócitos e macrófagos, hipoplasia de células brancas, bem como a presença de hemossiderina (Toplu & Aydogan 2011; Momo *et al.* 2014). Em pacientes humanos com LV, como a anemia é comprovadamente um fator de risco, existem várias pesquisas reforçando a identificação de possíveis parâmetros na medula óssea de importância prognóstica, a saber, fibrose e necrose (Rocha Filho *et al.* 2000; Kumar *et al.* 2007).

Com base no exposto, o comprometimento da medula óssea é evidente nos cães com LV, mas a caracterização morfológica das lesões nesse órgão e os possíveis marcadores prognósticos são pobremente discutidos na LVC. Assim, foi proposto, neste estudo, uma análise do padrão das lesões histopatológicas da medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* provenientes de áreas endêmica de Teresina-PI.

Material e métodos

Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPI (CEUA/UFPI) sob parecer de nº 101/15 (ANEXO A). Os procedimentos envolvendo os animais foram conduzidos de acordo com o que preconiza o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Local e período de execução

A pesquisa foi desenvolvida no Canil de Experimentação e no laboratório de Doenças Infecciosas, localizados no Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPI) da UFPI, no período de dezembro de 2015 a outubro de 2017.

População do estudo

A população do estudo foi composta por sete cães não infectados e 39 cães naturalmente infectados por *L. infantum* com idade variando de 6 meses a 9 anos, machos e fêmeas, de diferentes raças e sem raça definida. Os animais envolvidos no experimento, originários da cidade de Teresina (Piauí, Brasil, zona endêmica de LV), eram provenientes da Gerência de Zoonoses da Fundação Municipal de Saúde de Teresina/PI ou do Hospital Veterinário Universitário da UFPI, mediante esclarecimento ao tutor sobre os objetivos do experimento e assinatura do termo de doação (Apêndice).

Os animais do grupo com LVC foram selecionados com base no exame parasitológico positivo para *L. infantum* em aspirados de linfonodo, e/ou medula óssea e pele; os animais classificados como não infectados apresentavam exame parasitológico em aspirado negativo para *Leishmania*. Como critério de exclusão, animais sororeagentes diagnosticados por testes sorológicos rápidos para *Ehrlichia canis* (Alere

Erliquiose Ac test KIT®) e para cinomose canina (Alere cinomose Ag test KIT®) foram excluídos da análise.

Avaliação clínica dos animais

Todos os cães inseridos na pesquisa foram avaliados clinicamente de acordo com os seguintes parâmetros clínicos: estado nutricional, linfonodos, coloração das mucosas, onicogribose, alterações cutâneas (pelagem, alopecia, dermatite, lesões e despigmentação de pele), alterações oftalmológicas (secreção ocular e blefarite) e sangramentos. Após a avaliação, foram atribuídos escores aos sinais clínicos, conforme Silva *et al.* (2017). Animais com escore igual 3 ou >3 foram considerados assintomáticos e sintomáticos, respectivamente (Abbehusen *et al.* 2017). Assim, os cães foram divididos nos seguintes grupos: Cães infectados assintomáticos (N=9); Cães infectados sintomáticos (N= 30); e Cães não infectados (N= 7).

Coleta de material

Amostras de sangue total foram coletadas para realização dos exames laboratoriais como hemograma e bioquímico. Amostras de medula óssea foram obtidas para quantificação da carga parasitária, identificação de células CD14⁺ e expressão de MHC II por citometria de fluxo, bem como avaliação histopatológica.

Análise laboratorial

Para a realização dos exames laboratoriais foi utilizada uma amostra de 4 ml de sangue total, obtida através de venopunção, na veia jugular em tubo à vácuo contendo EDTA (Vaccuntainer, BD Lab., EUA) para exame hematológico e 4 ml de sangue em tubo seco (Vaccuntainer, BD Lab., EUA) para avaliação bioquímica. Os parâmetros hematológicos foram quantificados através de analisador hematológico automático (Modelo: hematoclin 2.8 Vet, Bioclin) e incluíam: contagem de leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$), hemácias (He/mm^3), dosagem de hemoglobina (Hb g/dL) e a determinação

do hematócrito (Ht%), além da contagem total de plaquetas. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por análise de pelo menos 100 leucócitos em esfregaços de sangue corados com corante hematológico rápido e a leitura realizada por microscopia de luz.

Para a contagem de reticulócitos foi utilizada a técnica que preconiza a adição de quantidades iguais de sangue e do corante azul de cresil brilhante na concentração de 1%. Após, seguiu com a incubação da amostra em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Em seguida, foram confeccionados esfregaços sanguíneos e contracorados com corante hematológico rápido. As contagens foram realizadas utilizando-se microscópio óptico de luz em aumento de 1000x, no qual foi realizada a contagem de reticulócitos em um total de 1000 hemácias.

As amostras de soros foram analisadas através de equipamento semi-automático (Modelo: D-250, Doles) em que se dosou as concentrações séricas de proteínas totais e suas frações (albumina e globulina) alanina aminotransferase-ALT, uréia e creatinina, utilizando kits LABTEST (Labtest Diagnóstica SA).

Obtenção de amostras da medula óssea

Para a realização do aspirado e biópsia da medula óssea, os animais foram sedados com cloridrato de xilazina (1mg/kg) e cloridrato de cetamina (10mg/kg), por via IM. Após 10 minutos, foi administrado anestésico geral, Tiopental Sódico 2,5%, na dose de 0,5 mL/kg de peso pela via intravenosa. Após atingir o plano anestésico adequado, foi realizada a tricotomia e antissepsia local. A coleta de medula óssea foi realizada conforme adaptação do protocolo proposto por Raskin & Messick (2012).

O procedimento foi realizado na crista ilíaca utilizando-se agulha de 19 G acoplada à seringa de 20 mL para a punção aspirativa de medula óssea. Os cães foram mantidos em decúbito lateral esquerdo com os membros anteriores e posteriores próximos, de modo a flexionar-se a coluna e facilitar o acesso à crista ilíaca.

Para a obtenção de amostra de biópsia de medula óssea, foram coletados também fragmentos da região da crista ilíaca, de aproximadamente 1,5 cm com o auxílio de agulha para biópsia do modelo Jamshidi.

Histopatologia da medula óssea

Coloração de Hematoxilina-eosina (H-E)

Os fragmentos de medula óssea foram inicialmente fixados *overnight* em solução contendo Lisina 75 mM, Paraformaldeído (PFA) 4% e Periodato de Sódio 10 mM, em seguida, descalcificados em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%, pH 7,0 por 72hrs. As amostras foram processadas por técnica de rotina, cortadas com 3 a 4 µm de espessura, e coradas com H-E. Os resultados dos exames histopatológicos foram analisados de forma quantitativa e semi-quantitativa em três espaços intertrabeculares (Jubb & Kennedy 2007). A análise da celularidade foi estimada conforme a idade de cada animal (Weiss 1986). As lesões foram avaliadas em uma escala de 0 a 4, adaptada de Elmore (2006) onde: 0= normal, 1 = mínima, 2 = média, 3= moderada, 4= grave. As lesões observadas foram descritas quanto à distribuição em focal ou difusa, avaliando, no mínimo, três espaços intertrabeculares. As lâminas confeccionadas foram avaliadas por dois patologistas para conferências dos achados histopatológicos.

Coloração de Perls (Azul da Prússia)

A avaliação dos estoques de ferro foi realizada a partir do esfregaço da medula óssea em lâminas de microscopia, posteriormente fixados em álcool metílico por 5 minutos, como também nos fragmentos de medula óssea, ambos corados pelo método de Perls (Azul da Prússia), que consistia em acondicionamento das lâminas em cubas de vidro contendo volumes iguais da solução de ferrocianeto de potássio a 3,0% e ácido clorídrico a 3,0% por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada e contracoradas com safranina 0,1% por 5 minutos.

A quantificação do ferro na medula óssea foi baseada na escala modificada de Cotelingam (2003) cujos escores variavam de 0 a 3, onde 0= ausente, 1=diminuído, 2=adequado e 3=aumentado.

Coloração de prata amoniacal (Gomori)

A avaliação do colágeno reticular (provavelmente tipo III), foi realizada em fragmentos de medula óssea, utilizando corantes do Kit de coloração de Reticulina (Easypath, cod nº EP-12-20021), seguindo as recomendações do fabricante. A graduação do colágeno reticular na medula óssea foi baseada na escala de Bauermeister (1971), que varia de 0 a 4, onde: 0= ausente, grau 1= presença de fibras delgadas dispersas ou localizadas focalmente no tecido, sem continuidade; grau 2= presença de depósitos de fibras delgadas com ausência de fibras densas distribuídas difusamente no tecido, com continuidade; grau 3= presença de fibras delgadas e densas, distribuídas difusamente com ausência de colagenização; grau 4= presença de depósitos de fibras densas de distribuição difusa com colagenização.

Análise histomorfométrica

A análise morfométrica dos cortes histológicos de medula óssea coradas com H-E de todos os cães foi realizada utilizando o software LeicaQwin D-1000, versão 4.1, por meio de captura de imagens e contagem manual de células da série eritróide, mielóide/granulocítica e macrófagos, em quinze campos aleatórios, sendo cinco campos selecionados por espaço intertrabecular óssea. A área quantificada correspondia a $1250\mu\text{m}^2/\text{campo}$. Os resultados das contagens de cada série foram tabulados em planilhas do programa Excel e os valores de cada linhagem quantificada por animal foram expressos em termos da média do número de células por área.

Carga Parasitária

Para a extração de DNA de células da medula óssea utilizamos o QIAamp DNA mini kit (Qiagen) conforme recomendações do fabricante. Como alvo de detecção do parasito, os iniciadores utilizados foram baseados nos minicírculos de kDNA de *L. (L.) infantum* (Número de acesso no GenBank AF169140) de acordo com Rolão (2004) sendo eles: *sense* – 5' - GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3' e *anti-sense* – 5' - GCTATATCATATGTCCAAGCACTTACCT-3' e sonda TaqMan (5' - ACCACCTAAGGTCAACCC - 3'). Para a reação de PCR quantitativo (qPCR), 5 uL de amostra de DNA (100ng) foram adicionados em uma solução contendo 12,5µL de 2x TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Applied Biosystems), 1,25 µL de cada iniciador e 1,0 µL de sonda TaqMan MGB (FAM™ dye-labeled, Applied Biosystems), para um volume final de 25 µL de reação. As amostras foram submetidas à amplificação de DNA em termociclador (Applied Biosystem StepOne Plus Real Time PCR System) com os seguintes ciclos: 95° por 10 minutos; 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto submetidos a 40 ciclos. A curva padrão para determinação da carga parasitária de *L. infantum* foi realizada por meio de diluições seriadas na razão de 1:10, partindo-se de 10⁶ até 1 parasito.

Análise fenotípica por citometria de fluxo

Combinações específicas de anticorpos monoclonais comerciais foram utilizadas para detecção da glicoproteína de superfície de cão CD14 (Mouse Anti-Human CD14, Serotec, clone MCA156A700), expressa por monócitos e macrófagos e expressão da Molécula Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC II) de cão (MHC class II, Ebioscience, clone YKIX334.2), expressa na superfície de macrófagos, células dendríticas e linfócitos B. Após a coleta do aspirado de medula óssea, as hemácias foram lisadas com ACK Lysing Buffer (Life Technologies) e, posteriormente, as células foram lavadas com PBS 1x com SFB 1%. Após essa etapa, procedeu-se com incubação com a

solução de anticorpos por 30 minutos a 4°C no escuro. Posteriormente, foram centrifugadas e lavadas novamente com PBS 1x, SFB 1% para serem fixadas com PFA 2%, estando prontas para a análise morfométrica e fenotípica por citometria de fluxo.

As amostras foram processadas no equipamento FACS CANTO II (BD Biosciences), avaliando 20.000 eventos. Os dados foram analisados no software FlowJo Versão VX (EUA). Após a seleção da população de interesse, foi realizada a seleção das células CD14⁺ para determinação da intensidade média de fluorescência (IMF) da expressão de MHC II nesse perfil celular.

A avaliação dos dados obtidos seguiu como base a estratégia de *gate* utilizada para a contagem dos monócitos/macrófagos (Figura 1).

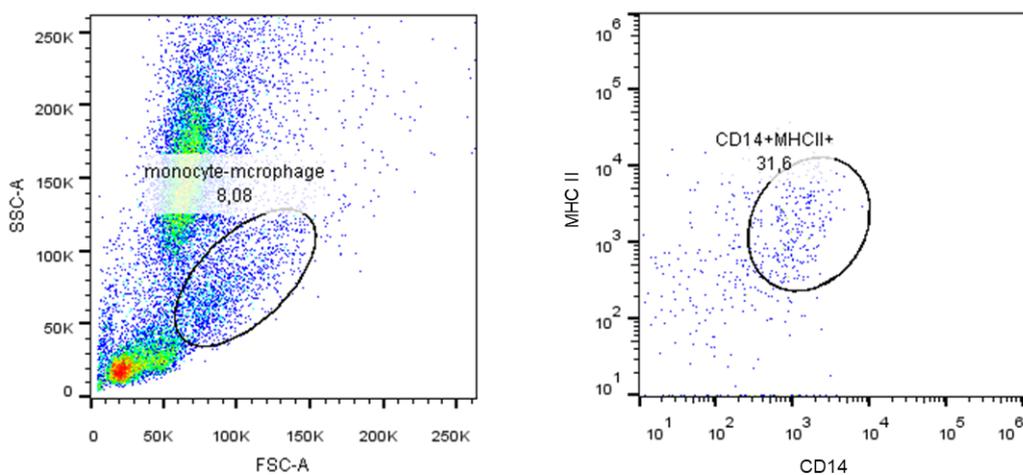


Figura 1 Estratégia de *gate* utilizada para a seleção de células CD14⁺ e a expressão de MHC II em medula óssea.

Análise estatística

Os testes estatísticos utilizados foram baseados no tipo de distribuição das variáveis, verificado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a análise estatística de dados não paramétricos tais como: ocorrência dos sinais clínicos, alterações histopatológicas, análise morfométrica e intensidade de fibrose na MO de cães com diferentes status clínicos foram aplicados os testes Mann-Whitney ou Kruskal Wallis com o pós-teste de Dunns e os resultados apresentados como mediana e percentis de 25% e 75%. Para os dados paramétricos tais como: parâmetros laboratoriais e parasitológico, foram aplicados os testes *t* ou ANOVA e testes de comparações múltiplas de Tukey e os resultados apresentados como média e desvio padrão. O teste de Spearman foi a medida de correlação linear adotada para verificar a existência de associação entre o estoque de ferro no aspirado e na biópsia e entre a carga parasitária e os macrófagos na medula óssea. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico computacional *GraphPad Prism 5.0* e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

Resultados

Perfil clínico e laboratorial de cães com LV

Trinta e nove animais com LVC foram avaliados e classificados em cães infectados assintomáticos e sintomáticos. As principais manifestações clínicas observadas foram: emagrecimento, onicogribose, linfadenomegalia, mucosas hipocoradas, alterações cutâneas (pelo opaco, despigmentação de lábio e/ou focinho, hiperqueratose de focinho, úlceras de lábio e/ou focinho, alopecia e dermatite esfoliativa) e lesões oculares (conjuntivite, opacidade de córnea e blefarite) (Tabela 1).

Tabela 1 Ocorrência de sinais clínicos em cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*

Sinais clínicos	Assintomáticos (n=9)	Sintomáticos (n=30)
Emagrecimento	2 (22%)	10 (33%)
Onicogribose	0	13 (43%)
Linfadenomegalia	5 (56%)	30 (100%)
Mucosas hipocoradas	0	6 (20%)
Lesões cutâneas	6 (67%)	28 (93%)
Lesões oculares	0	15 (50%)
Escore clínico	2 (2-3)*	7,0 (5-9) ^a

*Mediana (percentis 25 – 75).

^aP < 0,0001 (teste Mann-Whitney).

As alterações hematológicas nos cães com LV mais relevantes foram: anemia em 32/39 (82,05%) dos cães infectados; destes animais, 16/39 (41,02%) apresentaram

anemia normocítica normocrômica, 12/39 (30,77%) anemia normocítica hipocrômica, 3/39 (7,69%) anemia microcítica normocrômica e 1/39 (3,12%) anemia macrocítica hipocrômica. Os cães assintomáticos e sintomáticos apresentaram anemia acentuada quando comparados aos cães não infectados (Tabela 2). A contagem absoluta dos reticulócitos mostrou que 24/39 (61,54%) dos animais infectados apresentavam anemia arregenerativa, e 8/39 (20,51%) anemia regenerativa. O leucograma revelou leucopenia em 3/39 (7,69%) e leucocitose por neutrofilia em 8/39 (20,51%) dos animais. Trombocitopenia estava presente em 12/39 (30,8%) e trombocitose em 1/39 (2,56%) dos cães (Tabela 2).

Em relação aos exames bioquímicos, a hiperglobulinemia foi observada em 25/39 (64,1%) dos cães infectados; hipoalbuminemia em 18/39 (46,1%); elevação da aminotransferase (ALT) em 10/39 (25,64%); aumento de creatinina em 7/39 (17,9%) e ureia elevada em 3/39 (7,7%) dos animais (Tabela 2).

Tabela 2 Avaliação dos parâmetros laboratoriais[#] e parasitológico (molecular) de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e animais não infectados

Parâmetros laboratoriais e parasitológico	Grupos clínicos		
	Assintomáticos (n=9)	Sintomáticos (n=30)	Cães não infectados (n=7)
Hemácias (x10 ⁶ /μL)	4,9 (±2,14) ^a	4,5 (±1,13) ^a	6,4 (±1,40)
Hemoglobina (g/dL)	10,2 (±4,47) ^a	9,4 (±2,76) ^a	13,40 (±2,28)
Hematócrito (%)	31,8 (±13,74)	29,0 (±7,99) ^a	41,5 (±6,77)
Reticulócitos (μL)	7078 (±10703)	3580 (±6473)	6010 (±2360)
Leu. totais(10 ³ /mm ³)	12,2 (±4,44)	12,1 (±7,18)	11,4 (±4,57)
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	207,9 (±86,15)	215,6 (±157,9)	235,1 (±124,6)
ALT (U/L)	39,7 (±28,87)	33,9 (±27,24)	28,7 (±9,70)
Ureia (mg/dL)	37,7 (±16,54)	47,1 (±71,32)	34,7 (±9,39)
Creatinina (mg/dL)	1,1 (±0,31)	2,4 (±5,01)	1,0 (±0,11)
Proteína total (g/dL)	7,6 (±1,75)	8,4 (±1,95)	8,1 (±0,67)
Albumina (g/dL)	3,0 (±1,22)	2,4 (±1,18)	3,3 (±0,56)
Globulina(g/dL)	4,6 (±2,12)	5,9 (±2,27)	4,8 (±0,89)
Carga Parasitária (leish/μL)	66,2 (±64,05)	701 (±2882)	-

*Média (desvio padrão).

^aP < 0,05 (testes ANOVA e Tukey), em relação aos cães não infectados.

- Dado não quantificado.

Valores de referência: Hemácias = 5,5-8,5 (x10⁶/mm³); Hemoglobina= 12-18 g/dL; Hematócrito= 37-55%; Reticulócitos= ≤60 000/μL; Leucócitos = 6-17 x 10³/mm³; Plaquetas = 200-500 x10³/mm³ (HARVEY 2012). ALT (Alanina aminotransferase):21-73 UI/L; Ureia: 21,40-59,92 mg/dL; Creatinina: 0,50-1,50 mg/dL; Proteína Total: 5,40-7,10 g/dL; Albumina: 2,60-3,30 g/dL; Globulina: 2,70-4,40 g/dL (KANEKO *et al.* 2008).

Alterações histopatológicas na medula óssea de cães com LV

Na análise histopatológica da medula óssea dos cães com LV em comparação aos animais não infectados, as principais alterações observadas foram: aumento da celularidade em 25/39 (64,1%) (Figura 2a e b), hiperplasia megacariocítica em 11/39 (28,2%), necrose com distribuição focal em 16/39 (41,02%) e com distribuição multifocal em 3/39 (7,69%), vacuolização celular sugestiva de degeneração focal em 2/39 (5,12%) e multifocal em 2/39 (5,12%), hemorragia focal encontrava-se presente em 18/39 (46,15%) e com distribuição multifocal em 1/39 (2,56%) e macrófagos ativados com distribuição focal à difusa em 8/39 (20,5%) (Figura 2c e d).

A quantificação das células mielóides e eritróides demonstrou um aumento da celularidade com hiperplasia mielóide (Figura 2e) e consequente aumento da proporção Mielóide:Eritróide (M:E) nos animais infectados em relação aos animais controles. Também foi observado aumento do número de macrófagos nos cães assintomáticos em relação aos animais controles ($P < 0,05$) (Tabela 3).

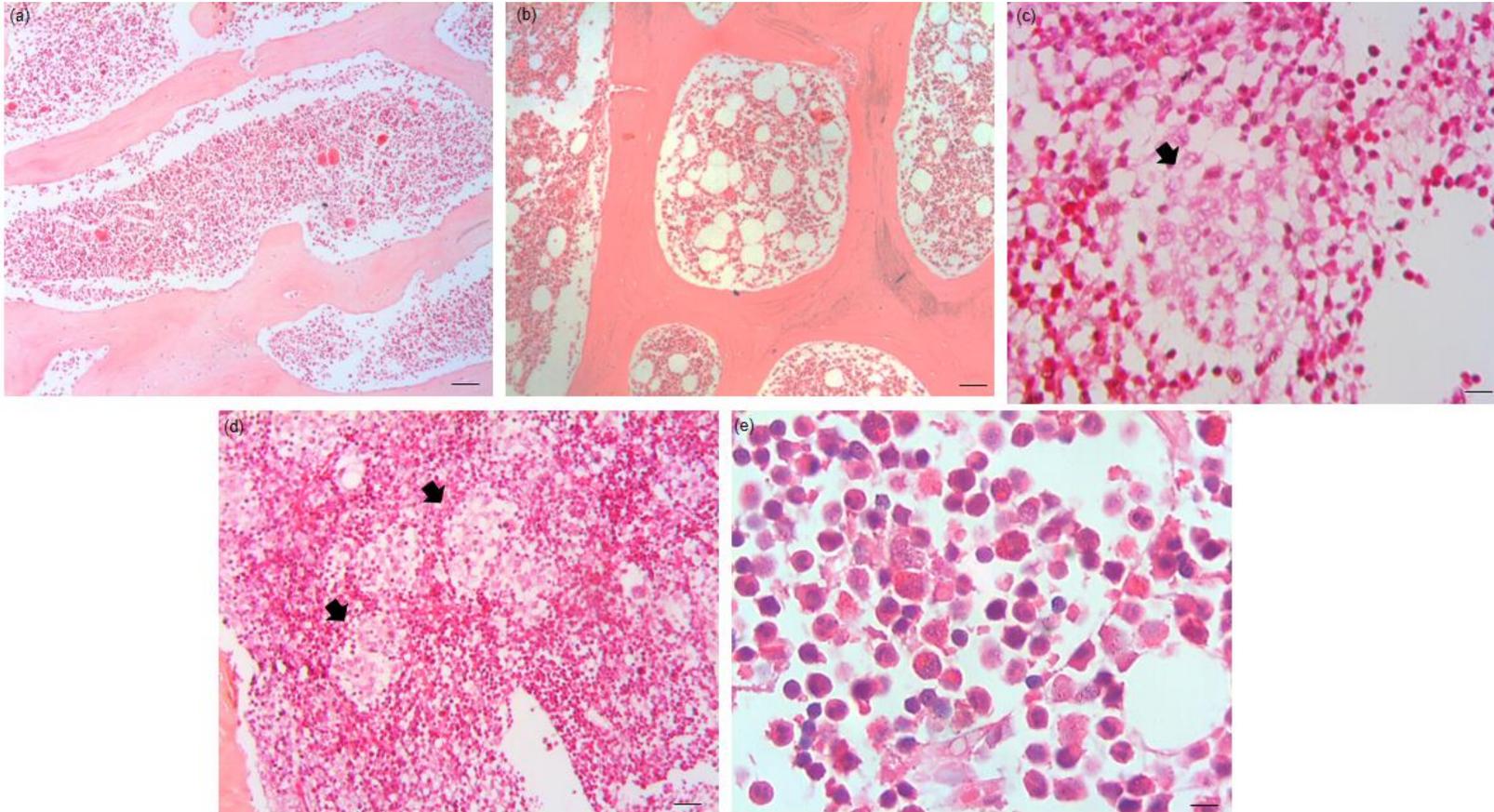


Figura 2 Secção de medula óssea da crista ilíaca de cão, coloração Hematoxilina-eosina (HE). (a) aumento da celularidade intertrabecular em cão adulto naturalmente infectado com *L. infantum*, (Barra= 75µm). (b) celularidade normal em cão adulto, controle, (Barra= 75µm). (c) macrófagos com distribuição focal (seta preta) (Barra= 50µm). (d) macrófagos com distribuição difusa a coalescente (setas pretas) (Barra= 75µm). (e) aumento de precursores da linhagem mielóides (Barra= 25µm).

Tabela 3. Avaliação das alterações histopatológicas e morfometria da medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e animais não infectados

Parâmetros histológicos	Grupos clínicos		
	Assintomáticos	Sintomáticos	Cães não infectados
Celularidade	2,0 (0-2)* ^a	2,0 (0-2) ^a	0,0 (0-1,5)
Série eritróide	23,8 (20,1-33,9)	30,8 (26,5-39,4)	33,53 (28,3-48,5)
Série mielóide	45,8 (33,9-53,2) ^a	39,13 (33,6-51,2) ^a	25,7 (24,8-31,7)
M:E	1,75 (1,35-1,96) ^a	1,28 (1,01-1,78) ^a	0,72 (0,51-0,76)
Megacariócito/espço intertrabecular	3 (2-7)	4 (2-6)	5 (4-9)
Macrófagos [#]	1,13 (0,17-2,97) ^a	0,3 (0,0-1,08)	0,0 (0,0-0,1)
Necrose	0,0 (0-1,0)	0,5 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,0)
Vacuolização celular	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
Hemorragia	1,0 (0-1,0)	0,0 (0-1,0)	1,0 (0-1,0)
Macrófagos [¥]	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,25)	0,0 (0,0-0,0)

*Mediana (percentis 25 – 75).

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

[#] Análise quantitativa

[¥] Análise semiquantitativa

Fibrose na medula óssea de cães com LV

A fibrose estava acentuada na medula óssea dos cães sintomáticos conforme a visualização do aumento das fibras de reticulina nesse órgão (Figura 3). Com relação à distribuição das fibras reticulares nos animais infectados, estas estavam dispostas no parênquima medular e constituíam-se por presença de fibras delgadas dispersas sem

continuidade (Grau 1) (Figura 4a) à fibras delgadas com continuidade (Grau 2) (Figura 4b), e por vezes apresentava fibras delgadas e densas, distribuídas difusamente com ausência de colagenização (Grau 3) (Figura 4c).

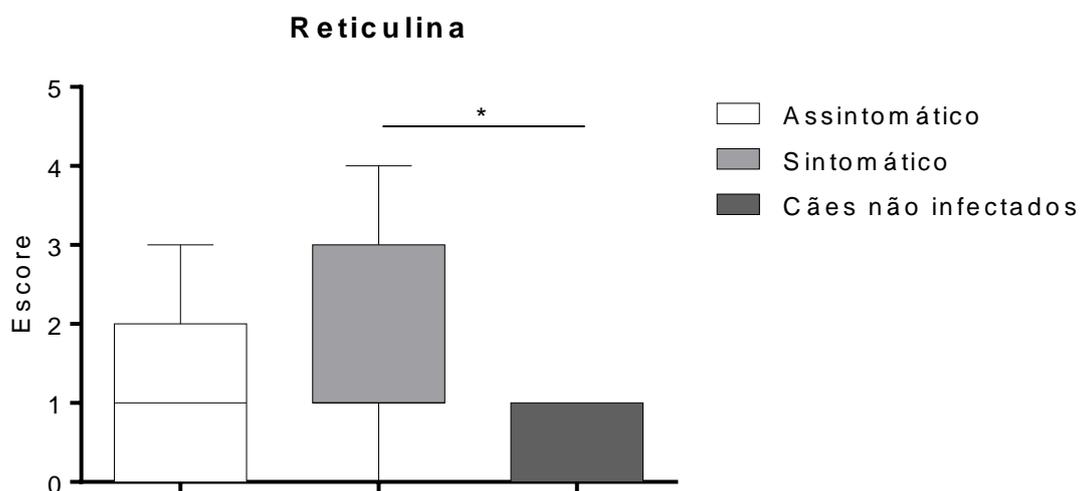


Figura 3 Deposição de fibras de reticulina na medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e cães não infectados. Coloração de prata amoniacal (Gomori). Testes de Kruskal-Wallis e Dunns, * $P < 0,05$.

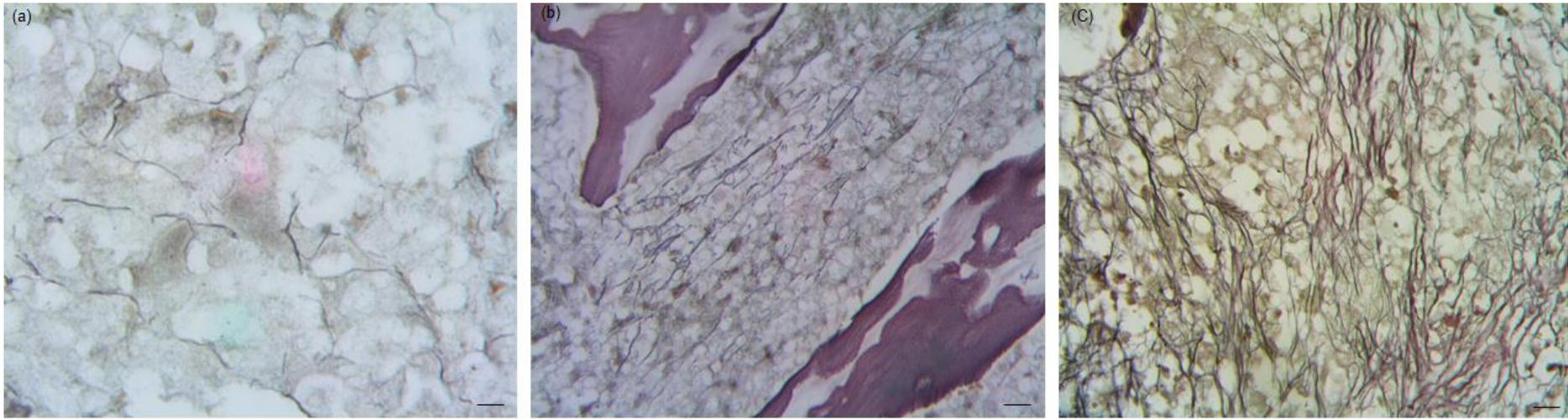


Figura 4 Secção de medula óssea da crista ilíaca de cão sintomático naturalmente infectado com *L. infantum*. (a) Depósito de fibras reticulares delgadas e dispersas (Grau 1), no espaço intertrabecular óssea (Barra= 25 μ m). (b) Depósito de fibras reticulares delgadas com continuidade, distribuídas difusamente (Grau 2) no espaço intertrabecular óssea (Barra= 75 μ m). (c) Fibrose acentuada, com deposição de fibras delgadas e densas, distribuídas difusamente, no espaço intertrabecular óssea (Barra= 50 μ m). Coloração de prata amoniacal (Gomori).

Análise dos estoques de ferro na medula óssea e anemia nos cães com LV

O estoque de ferro foi avaliado no aspirado e na biópsia da medula óssea de 23 animais infectados. Os resultados demonstraram, no aspirado de medula óssea, que 8/23 (34,8%) revelaram marcação negativa para a coloração Azul da Prússia (Figura 5a); 8/23 (34,8%) apresentaram redução nos estoques de ferro; 5/23 (21,7%) demonstraram aumento dos estoques de ferro (Figura 5b) e em 2/23 (8,7%) dos animais o estoque de ferro estava dentro dos padrões de normalidade.

Na biópsia, 5/23 (21,7%) apresentaram marcação negativa para a coloração Azul da Prússia; 5/23 (34,8%) apresentaram redução, em 8/23 (34,8%) havia aumento dos estoques de ferro e em 4/23 (17,39%) dos animais, o estoque de ferro estava dentro dos padrões de normalidade.

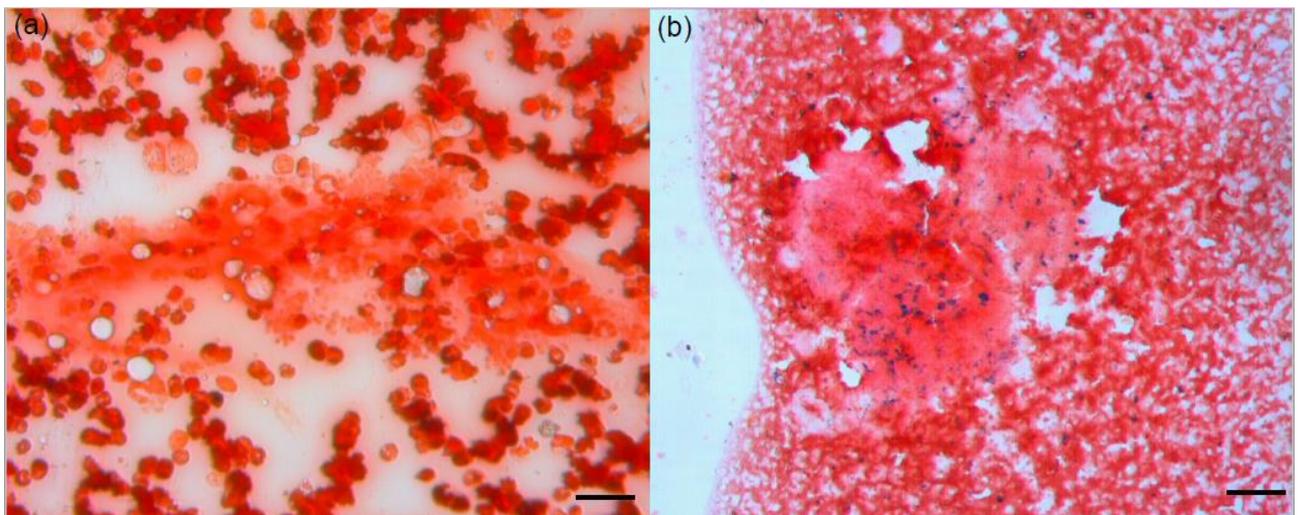


Figura 5 Medula óssea da crista ilíaca de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum*.

(a) Aspirado demonstrando coloração negativa para Azul da Prússia (Perls) (Barra= 75µm). (b) Aspirado demonstrando aumento dos depósitos de ferro (Barra= 100 µm). Coloração de Azul da Prússia (Perls).

Houve uma correlação positiva ($P=0,03$ e $r=0,3862$) entre os estoques de ferro encontrados nos aspirados e na biópsia da medula óssea (Figura 6).

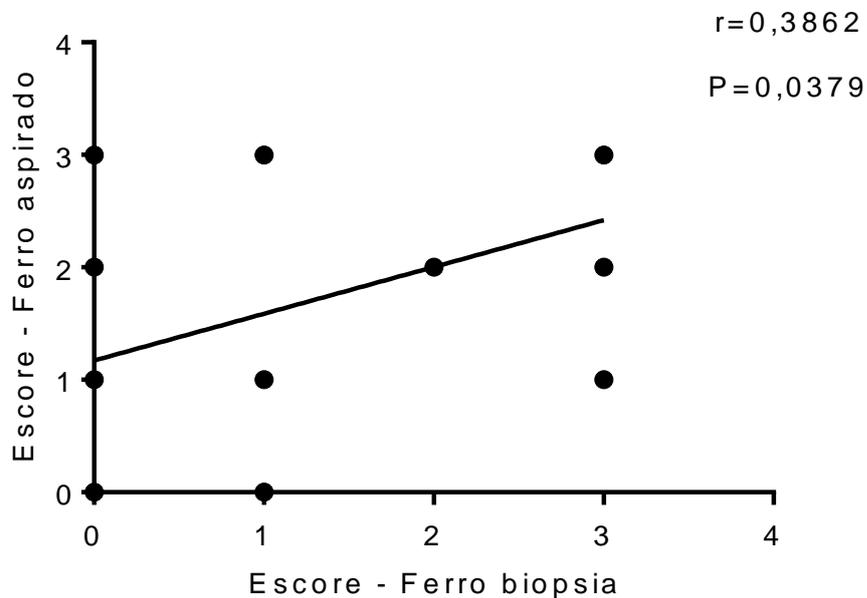


Figura 6 Correlação entre o estoque de ferro no aspirado e na biópsia da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Teste de Spearman.

Dos cães infectados que apresentavam anemia, 4/23 (17,4%) dos animais apresentaram estoque de ferro aumentado na medula óssea. Em contrapartida, 7/23 (30,4%) dos cães infectados com anemia estavam com estoque de ferro diminuído, 8/23 (34,8%) apresentaram estoques de ferro ausente e em 2/23 (8,7%) o depósito de ferro estava em quantidade adequada conforme a idade.

Correlação positiva entre macrófagos e a carga parasitária na medula óssea

Na análise comparativa entre a carga parasitária e as alterações histopatológicas na medula óssea caracterizadas nos cães com LV, foi observada uma correlação positiva entre a quantidade de macrófagos e a carga parasitária ($P=0,0094$, $r=0,3846$) (Figura 7).

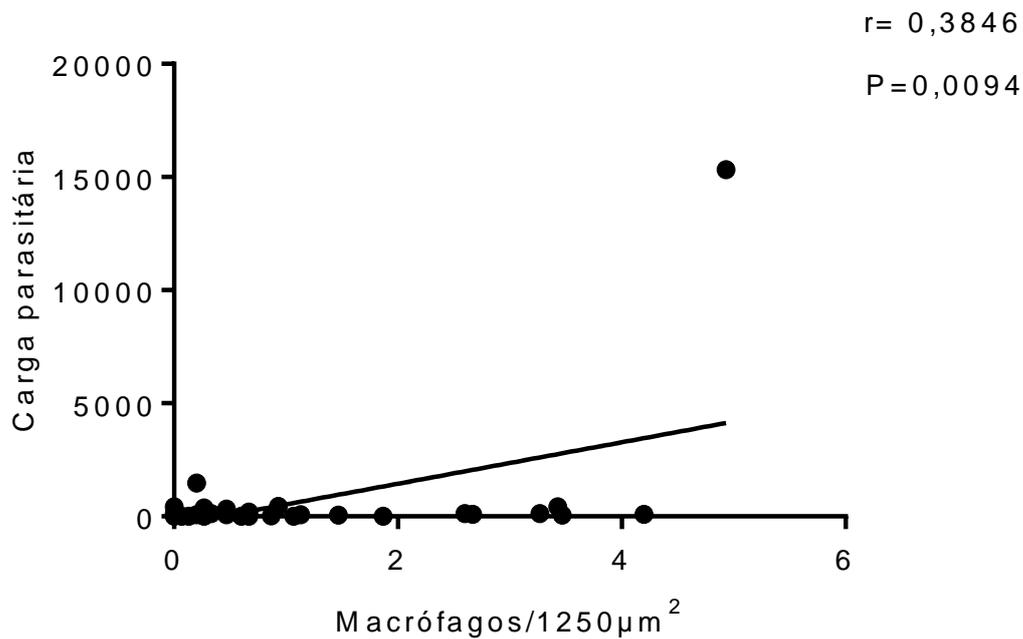


Figura 7 Correlação entre a carga parasitária na medula óssea e a contagem de macrófagos por morfometria. Teste de Spearman.

Aumento da expressão de MHC II em células CD14⁺ em medula óssea de cães com LV

Na análise da expressão de MHC II em células CD14⁺ da medula óssea, foram avaliados 30 cães, sendo 4 cães assintomáticos, 19 sintomáticos e 7 animais não infectados. Cães sintomáticos apresentaram intensidade média de fluorescência reduzida de MHC II em células CD14⁺ quando comparados aos animais não infectados (Figura 8).

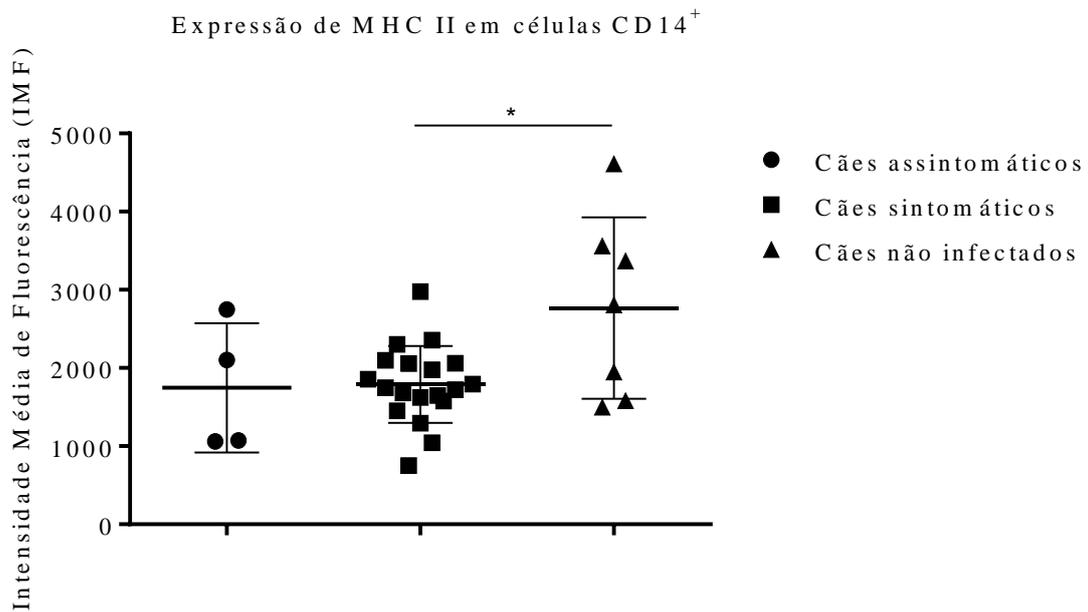


Figura 8 Intensidade média de fluorescência (IMF) de MHC II em células CD14⁺ monócitos/macrófagos na medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* e cães não infectados. $P < 0,05$. Teste de Kruskal-wallis.

Discussão

Na LVC, as alterações histopatológicas na medula óssea são pouco descritas (Momo *et al.* 2014; Paola *et al.* 2016). Assim, foi proposto, neste estudo, caracterizar as principais lesões histopatológicas na medula óssea de cães assintomáticos e sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum*. Para esse fim, caracterizamos os animais infectados com base no escore clínico em: assintomáticos e sintomáticos (Solano-Gallego *et al.* 2011; Abbehusen *et al.* 2017). Em suma, esses animais apresentavam manifestações clínicas e alterações laboratoriais comumente relatadas na literatura (Reis *et al.* 2006a; Costa-Val *et al.* 2007; Abreu-Silva *et al.* 2008; Freitas *et al.* 2012).

Nesse estudo a alteração hematológica mais evidente presente nos animais em ambos os grupos era a anemia, sendo mais acentuada nos animais sintomáticos. A anemia em cães naturalmente infectados por *L. infantum* é um dos achados laboratoriais mais comuns e normalmente tem sua causa relacionada a sangramentos, hemólise, inflamação, insuficiência renal, doença crônica e aplasia ou hipoplasia medular (Costa-Val *et al.* 2007; Freitas *et al.* 2012). Em humanos, está associada com a maior carga parasitária na medula óssea, podendo está relacionada a sinais inflamatórios, como vômitos, edema e inflamação pulmonar, sugerindo que infecções bacterianas secundárias e aumento da carga parasitária poderia desencadear anemia por inflamação (Costa *et al.* 2010).

Os cães infectados apresentaram uma medula óssea hiperclular caracterizada pelo aumento da série mielóide, o que não é inesperado quando se trata de uma doença inflamatória crônica como a LVC (Trópia de Abreu *et al.* 2011). A linhagem granulocítica, em particular, mielócitos, metamielócitos e bastonetes neutrofílicos, é o compartimento celular em expansão na medula óssea de cães infectados e correlacionado positivamente com a progressão da LVC (Trópia de Abreu *et al.* 2011; Nicolato *et al.* 2013). Pode-se inferir que a alta demanda dessas células em cães sintomáticos é em consequência da resposta inflamatória em vários órgãos afetados pela infecção, inclusive na medula óssea (Trópia de Abreu *et al.* 2011). Sabe-se que a hiperplasia

mieloide é estimulada em doenças inflamatórias agudas e/ou crônicas devido à alta produção de citocinas como GM-CSF, TNF- α e IFN- γ (Cotterell *et al.* 2000; Sawanobori *et al.* 2003; Stifter *et al.* 2005), como observado em cães com LV, que apresentam alta expressão de IFN- γ nesse órgão (Quinnell *et al.* 2001).

Dentre as lesões histopatológicas observadas na medula óssea, a fibrose se destaca em animais com quadro manifesto da doença. Os animais sintomáticos apresentaram uma fibrose mais intensa em relação aos cães não infectados. Já é sabido que a LVC é uma doença essencialmente fibrótica e que diferentes órgãos são afetados por esse tipo de lesão (Silva *et al.* 2013). Apesar disso, esse parece ser o primeiro relato que evidencia o padrão fibrótico na medula óssea em cães sintomáticos com LV.

Em geral, a fibrose na medula óssea é caracterizada pela identificação do aumento de fibras de reticulina (provavelmente colágeno tipo III) produzidas pelos fibroblastos, sob diferentes estímulos infecciosos e não-infecciosos (Rocha Filho *et al.* 2000; Kumar *et al.* 2007; Bain *et al.* 2010), influenciados pela ação de várias citocinas e fatores de crescimento, por exemplo, TGF- β , IL-4, IL-5, IL-13, fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento epidermal (Kuter *et al.* 2007; Wynn 2008; Nakayama *et al.* 2016). A LVC, como previamente exposto, é uma doença de carácter inflamatório, e que a infecção por *Leishmania* na medula óssea promove um acúmulo de células inflamatórias representadas principalmente por macrófagos e linfócitos (Momo *et al.* 2014). Em uma inflamação crônica, essas células são moduladas e transformam-se em fonte substancial de citocinas e fatores de crescimento que estimulam a síntese e a proliferação de colágeno (Kendall & Feghali-Bostwick 2014), como a IL-4, detectada na medula óssea de cães naturalmente infectados (Quinnell *et al.* 2001; Maia & Campino 2012). Além disso, foi demonstrado em pacientes humanos com LV que fibrose na medula óssea representa um prognóstico ruim (Kumar *et al.* 2007).

O aumento do estoque do ferro na medula óssea é considerado um dos fatores que contribuem para a anemia na LVC (Rodes *et al.* 1999). No entanto, tanto nos cães assintomáticos e sintomáticos com algum grau de anemia, somente quatro cães apresentaram estoque de ferro aumentado na medula óssea. Os demais apresentaram redução ou ausência de ferro nesse órgão. Tratando-se de uma amostra de cães errantes, esse achado é coerente com uma deficiência de ferro devido à uma dieta inadequada desses animais, mesmo nos animais que apresentaram anemia normocítica normocrômica, achado este comum nos estágios iniciais da deficiência de ferro (Naigamwalla *et al.* 2012). Vale destacar que, em processos inflamatórios sistêmicos, é observada uma maior captação do ferro sérico no fígado (Weiss *et al.* 1999; Soubasis *et al.* 2006; Grotto 2008), e em menor proporção em outros órgãos como baço (Vale-Costa *et al.* 2013) e linfonodos (Muirden 1970), sendo estas alterações também vistas na infecção por *L. infantum* (Albano *et al.* 2013).

O aumento de macrófagos na LVC tem sido classicamente descrito na medula óssea de cães portadores dessa enfermidade (Momo *et al.* 2014). Nesse estudo, foi observado um aumento importante dessas células na medula óssea de cães assintomáticos. Os macrófagos desempenham papéis críticos na resistência ou susceptibilidade durante a infecção por *Leishmania* (Liu & Uzonna 2012). Quando a resposta imune é orquestrada de forma a favorecer o hospedeiro, os macrófagos são ativados adequadamente, sob influência de citocinas como TNF- α e IFN- γ , e produzem quantidades significantes de óxido nítrico, um importante leishmanicida (Maia & Campino 2012; Rodrigues *et al.* 2016). Dessa forma, sugere-se que, nos animais assintomáticos, a presença de macrófagos na medula óssea estaria correlacionada à eliminação do parasita e consequente resistência à infecção (Reis *et al.* 2006b).

Mesmo diante da complexidade que envolve a ação dos macrófagos na medula óssea e as limitações deste estudo, foram utilizados marcadores de superfície como CD14 e MHC II para avaliar a importância dessas células na medula óssea de cães com LV (Amorim *et al.* 2011;

Figueiredo *et al.* 2013). Dessa maneira, o resultado de IMF de MHC II em células CD14⁺ demonstrou que cães sintomáticos apresentam redução significativa na medula óssea. Sabe-se que a modulação negativa da molécula de MHC II contribui para a susceptibilidade à infecções como as causadas por *Leishmania* (Maia & Campino 2012; Shio *et al.* 2012; Gupta *et al.* 2013).

Reis *et al.* (2006b) observaram a redução da expressão de células CD14⁺ e MHCII, associadas ao perfil de predisposição e gravidade da doença em cães sintomáticos, havendo a desregulação da resposta imune, devido a menor capacidade de apresentação de antígenos, favorecendo, assim, a disseminação do parasita no organismo.

Amorim *et al.* (2011) verificaram que cães sintomáticos com baixa expressão de MHC de classe II em monócitos CD14⁺ possuíam elevada carga parasitária na pele da orelha sendo capazes de infectar flebotomíneos. Nos cães assintomáticos o aumento de macrófagos CD14⁺ parece controlar a disseminação e replicação parasitária tecidual (Guerra *et al.* 2009). O aumento de células CD14⁺ no jejuno também parece estar associada a uma menor carga parasitária tecidual nesse órgão (Figueiredo *et al.* 2013).

Costa *et al.* (2018), avaliando *in vitro* a expressão de moléculas de superfície dentre elas CD14 e MHC classe II em macrófagos humanos infectados com *L. amazonensis*, revelaram que a modulação negativa desses marcadores está diretamente relacionada com a intensidade de infecção, sugerindo que macrófagos que contenham numerosos parasitas apresentam expressão reduzidas dessas moléculas de superfície. Dessa forma, pode-se sugerir que, nos cães sintomáticos, a baixa expressão de MHC classe II em células CD14⁺ esteja assumindo um papel que contribua para as lesões mais graves observadas nesse grupo, em particular, a fibrose (Amorim *et al.* 2011; Figueiredo *et al.* 2013).

Com base nos achados histopatológicos (hipercelularidade com hiperplasia mieloide e fibrose) e na expressão reduzida de MHC II em células CD14⁺, cães positivos para LV, sobretudo

sintomáticos apresentam alterações mais acentuadas, assim, os achados na medula óssea podem ser úteis no direcionamento do prognóstico da doença.

Declaração de financiamento

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) (Processo nº 467389/2014-4) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (**FAPEPI**) (Processo nº 301274/2015-0).

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da bolsa. Ao GEZOON, pela doação dos animais usados na pesquisa. Ao setor de Patologia Animal da Universidade Federal do Piauí, pela colaboração no processamento e suporte para a análise dos dados.

Conflitos de interesses

Os autores declaram que não possuem conflitos de interesse.

Referências

- Abbehusen M. M. C., Almeida V. dos A., Solcà M. da S. *et al.* (2017) Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. *Scientific Reports*. 7, 15914
- Abreu-Silva A. L., Lima T. B., De Macedo A. A. *et al.* (2008) Seroprevalence, clinical and biochemical data of dogs naturally infected by *Leishmania* and phlebotominae sandfly fauna in an endemic area in São Luis Island, Maranhão State, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria*. 17, 197–203.
- Albano S. G. C., Machado L. P., Santos R. S. *et al.* (2013) Alterações séricas do metabolismo do ferro em cães com leishmaniose visceral canina. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. 11, 81–81.
- Alvar J., Cañavate C., Molina R. *et al.* (2004) Canine Leishmaniasis. *Advances in parasitology*. 57, 1–88.
- Amorim I. F. G., da Silva S. M., Figueiredo M. M. *et al.* (2011) Toll Receptors Type-2 and CR3 Expression of Canine Monocytes and Its Correlation with Immunohistochemistry and Xenodiagnosis in Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE*. 6, 27679.
- Bain B. J., Clark D. M. & Wilkins B. (2010) *Bone marrow pathology*. 4^o ed. Wiley-Blackwell. 640p.
- Bauermeister D. E. (1971) Quantitation of bone marrow reticulin--a normal range. *American journal of clinical pathology*. 56, 24–31.
- Costa-Val A. P. *et al.* (2007) Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Veterinary journal*. 174, 636–643.
- Costa S. dos S., Fornazim M. C., Nowill A. E. *et al.* (2018) *Leishmania amazonensis* induces modulation of costimulatory and surface markers molecules in human macrophages. *Parasite Immunology*.
- Cotelingam J. D. (2003) Bone marrow biopsy: interpretive guidelines for the surgical pathologist. *Advances in anatomic pathology*. 10, 8–26.

- Cotterell S. E., Engwerda C. R. & Kaye P. M. (2000) Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis. *Blood*. 95, 1642–1651.
- Dantas-Torres F., Solano-Gallego L., Baneth G. *et al.* (2012) Canine leishmaniasis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in parasitology*. 28, 531–538.
- Elmore S. A. (2006) Enhanced Histopathology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology*. 34, 666–686.
- Figueiredo M. M., Amorim I. F., Pinto A. J. *et al.* (2013) Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with Leishmania infantum. *BMC Immunology*. 14, 22.
- Freitas J. C. C., Nunes-Pinheiro D. C. S., Lopes Neto B. E. *et al.* (2012) Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 45, 24–29.
- Grotto H. Z. W. (2008) Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 30, 390–397.
- Guerra L. L., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti, R. C. *et al.* (2009) Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. *Parasitology Research*. 104, 611–622.
- Gupta G., Oghumu S. & Satoskar A. R. (2013) Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. *Advances in applied microbiology*. 82, 155–84.
- Harvey, J. W. (2012) *Veterinary hematology : a diagnostic guide and color atlas*. 1ed. Elsevier/Saunders. 368p.
- Jubb K.V.F. & Kennedy P.C., P. N. (2007) Hematopoietic system. In *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5ed. Elsevier; 103–267.
- Kaneko J. J., Harvey J.W. & Bruss M. (2008) *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6ed. Elsevier/Academic Press.916p
- Kendall R. T. & Feghali-Bostwick C. A. (2014) Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Frontiers in pharmacology*. 5, 123.
- Koutinas A. F. & Koutinas C. K. (2014) Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniasis due to Leishmania infantum/chagasi. *Veterinary Pathology*. 51, 527–538.

- Kumar P. V., Vasei M., Sadeghipour, A. *et al.* (2007) Visceral Leishmaniasis: Bone Marrow Biopsy Findings. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. 29, 77–80.
- Kuter D. J., Bain B., Mufti G. *et al.* (2007) Bone marrow fibrosis: Pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *British Journal of Haematology*. 139, 351–362.
- Lainson R., Ryan L. & Shaw J. J. (1987) Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 82, 421–424.
- Leal G. de A. G., Roatt B. M., de Oliveira Aguiar-Soares, R. D. *et al.* (2014) Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*. 205, 472–482.
- Lima L. V. R., Carneiro L. A., Campos M. B. *et al.* (2010) Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 52, 259–266.
- Liu D. & Uzonna J. E. (2012) The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2, 83.
- Maia C. & Campino L. (2012) Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. *Journal of tropical medicine*. 2012.
- Momo C. *et al.* (2014) Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Medicine International*, 2014.
- Muirden K. D. (1970) Lymph node iron in rheumatoid arthritis Histology, ultrastructure, and chemical concentration. *Ann. rheum. Dis*. 29. 81-88.
- Naigamwalla D. Z., Webb J. A. & Giger U. (2012) ‘Iron deficiency anemia.’, The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne. *Canadian Veterinary Medical Association*. 53, 250–256.
- Nakayama S., Yokote T., Hiraoka N. *et al.* (2016) Interleukin-13- and Transforming Growth Factor- β - Producing Mast Cells Are Associated with Fibrosis in Bone Marrow. *Blood*. 128. 180-186.
- Nicolato R. de C., Abreu R. T. de, Roatt B. M. *et al.* (2013) Clinical Forms of Canine Visceral Leishmaniasis in Naturally *Leishmania infantum*-Infected Dogs and Related Myelogram and Hemogram Changes. *PLoS ONE*. 8.
- Otranto D. & Dantas-Torres F. (2013) The prevention of canine leishmaniasis and its impact on

public health. *Trends in Parasitology*. 29, 339–345.

Paola S., Avalos A., Maidana L. et al. (2016) Correlation of the morphometric changes in kidney and bone marrow in dogs naturally infected with *Leishmania* sp. *Compendio de Ciencias Veterinarias*. 6, 11–16.

Quinnell R. J., Courtenay O., Shaw M. et al. (2001) Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*. 183, 1421–1424.

Raskin R. E. & Messick J. B. (2012) Bone Marrow Cytologic and Histologic Biopsies: Indications, Technique, and Evaluation. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 42, 23–42.

Reis A. B., Martins-Filho O. A., Teixeira-Carvalho, A. et al. (2006a) Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*. 81, 68–75.

Reis A. B., Teixeira-Carvalho A., Giunchetti R. C. et al. (2006b) Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clinical and Experimental Immunology*. 146, 303–311.

Rocha Filho F. D., Ferreira F. V. de A., Mendes F. de O. et al. (2000) Bone marrow fibrosis (pseudo-myelofibrosis) in human kala-azar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 33, 363–366.

Rodes D. M.C., Acena M. G. (1999) Cytologic and cytochemical study of medullar iron in dog with leishmaniasis and its relation with blood and serum parameters. *Revue de Medecine Veterinaire*. 12, 965–974.

Rodrigues V., Cordeiro-da-Silva A., Laforge M. et al. (2016) Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasites & vectors*. 9, 118–131.

Rolão N., Cortes S., Rodrigues, O. R. et al. (2004) Quantification of *leishmania infantum* parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Parasitology*. 90, 1150–1154.

Sawanobori M., Yamaguchi S., Hasegawa M. et al. (2003) Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia research*. 27, 583–591.

Shio M. T., Hassani K., Isnard, A. et al. (2012) Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *Journal of tropical medicine*. 2012.

Silva L. C., Castro R. S., Figueiredo M. M. et al. (2013) Canine visceral leishmaniasis as a

- systemic fibrotic disease. *International journal of experimental pathology*. 94, 133–143.
- Silva D. T. da, Alves M. L., Spada J. C. P. *et al.* (2017). T lymphocytes and macrophages in the intestinal tissues of dogs infected with *Leishmania infantum*. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*. 26, 159–170.
- Solano-Gallego L., Miró G., Koutinas A. *et al.* (2011) LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites & Vectors*. 4, 86.
- Soubasis N., Rallis T. S., Vlemmas, J. *et al.* (2006) Serum and liver iron concentration in dogs with experimentally induced hepatopathy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 21, 599–604.
- Stifter G., Heiss S., Gastl G. *et al.* (2005) Over-expression of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow biopsies from patients with myelodysplastic syndromes: relationship to anemia and prognosis. *European Journal of Haematology*. 75, 485–491.
- Toplu N. & Aydogan, A. (2011) An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. *Parasitology Research*. 109, 1051–1057.
- Trópia de Abreu R., Carvalho M. das G., Carneiro C. M. *et al.* (2011) Influence of Clinical Status and Parasite Load on Erythropoiesis and Leucopoiesis in Dogs Naturally Infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *PLoS ONE*. 6. e18873.
- Ulchar I., Celeska, I. J. & Stefanovska, A. J. (2015) Hematological and Biochemical parameters in symptomatic and asymptomatic leishmania-seropositive dogs. *Original Scientific Article Mac Vet Rev*. 38, 175–182.
- Vale-Costa S., Gomes-Pereira S., Teixeira C. M. *et al.* (2013) Iron Overload Favors the Elimination of *Leishmania infantum* from Mouse Tissues through Interaction with Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 7, e2061.
- Vasconcelos T. C. B., Furtado M. C., Belo V. S. *et al.* (2017) Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: A systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. *Infection, Genetics and Evolution*. 227, 98-114.
- Weiss D. J. (1986) Histopathology of Canine Nonneoplastic Bone Marrow. *Veterinary Clinical Pathology*. 15, 7–11.
- Weiss G., Umlauf F., Urbanek M. *et al.* (1999) Associations between Cellular Immune Effector Function, Iron Metabolism, and Disease Activity in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*. 180, 1452–1458.

Werneck G. L. (2014) Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. *Revista de saude publica.* 48, 851–856.

Wynn T. A. (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of pathology.* 214, 199–210.

Xavier S. C., Chiarelli I. M., Lima W. G. *et al.* (2006) Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 58, 944–1000.

1 5 CAPÍTULO II

2

3 Análise citológica e histopatológica da medula óssea de cães naturalmente infectados

4 por *Leishmania infantum* tratados com Alopurinol

5

6 Dayane F.H. Miranda^{a,1}, Leopoldo F. Marçal^a, Luana D. Moura^a, Nailson J. Melo^b,7 Daniel A. Viana^c, Aldina M. P. Barral^{d,e,f}, Manoel Barral-Netto^{d,e,f}, Flaviane A. Pinho^g,8 Maria S. P. Cruz^h

9

10 ^a Pós-graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal
11 do Piauí, Teresina, PI, Brasil12 ^bGraduação em Medicina veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade
13 Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil14 ^cLaboratório de Anatomia Patológica e Patologia Clínica Veterinária-PATHOVET,
15 Fortaleza, Ceará, Brasil.16 ^dCentro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador,
17 Brazil18 ^eFaculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil19 ^fInstituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia,
20 São Paulo, Brazil21 ^gEscola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Anatomia, Patologia e
22 Clínicas, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil23 ^h Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias,
24 Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil25 ¹Autor para correspondência: Dayane F. H. Miranda, Programa de Pós-Graduação em
26 Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 64049-
27 550, Campus Socopo – S/N, Teresina, PI, Brasil. Contato:+ 55 86 99972402328 Email: dayanefhmiranda@gmail.com

29 Resumo

30

31 O alopurinol é utilizado para o tratamento, a longo prazo, de cães com
32 leishmaniose por atuar como fármaco leishmanioestático, com resultados positivos na
33 remissão dos sinais clínicos, laboratoriais e redução da carga parasitária tecidual. O
34 presente estudo visou a avaliação das modificações na medula óssea de cães infectados
35 após tratamento com alopurinol. Neste estudo foram incluídos treze cães, sendo seis
36 naturalmente infectados por *Leishmania infantum* e tratados com alopurinol (20mg/Kg),
37 administrado por via oral, uma vez ao dia, durante 90 dias e sete animais não infectados
38 (controles). A análise clínica, hematológica, citológica e histopatológica da medula óssea
39 foi realizada no pré-tratamento (D0) comparando com os resultados obtidos 120 dias após
40 o início do tratamento (D120). O uso do alopurinol promoveu redução do escore clínico
41 em 50% dos cães e redução da carga parasitária na medula óssea em 100% dos animais.
42 As análises laboratoriais pós-tratamento demonstraram recuperação da anemia no sangue
43 periférico e diminuição do número de neutrófilos e aumento de plasmócitos na medula
44 óssea. Conclui-se que o tratamento com alopurinol promoveu uma recuperação
45 significativa no quadro de anemia nos animais tratados, no entanto, sugerimos um estudo
46 detalhado e a longo prazo capaz de compreender possíveis mecanismos adicionais
47 envolvidos nas modificações da medula óssea geradas pelo uso do alopurinol para o
48 tratamento da leishmaniose visceral canina.

49 **Palavras-chaves:** cães, histopatologia, citologia aspirativa, medula óssea, leishmaniose
50 visceral, alopurinol

51

52 1. Introdução

53

54 A leishmaniose visceral (LV) é uma importante doença parasitária endêmica e
55 negligenciada no mundo (Alvar et al., 2012). Nas Américas, os cães são reservatórios
56 domésticos importantes do agente da LV denominado *Leishmania infantum* (sinônimo
57 *chagasi*) (Maurício et al., 2000), no ambiente peridomiciliar e urbano (Dantas-Torres et
58 al., 2012).

59 A LV canina (LVC) é uma enfermidade grave para animais suscetíveis e
60 caracterizada por sinais clínicos-laboratoriais inespecíficos como dermatopatias,
61 linfadenopatia, onicogribose, emagrecimento acentuado, esplenomegalia, lesões oculares,
62 doença renal, lesões por deposição de imunocomplexos nos tecidos (vasculites e artrites)
63 (Solano-Gallego et al., 2011; Silva et al., 2017). Dentre os achados laboratoriais
64 sugestivos da doença tem-se anemia normocítica, trombocitopenia, leucopenia ou
65 linfocitose, hiperproteinemia, hiperglobulinemia, hipoalbumemia e
66 hipergamaglobulinemia (Freitas et al., 2012; Ulchar et al. 2015).

67 Diferentes protocolos de tratamento vêm sendo utilizados em cães com LV, a
68 maioria já estabelecidos nos países europeus (Noli e Saridomichelakis, 2014). As
69 principais drogas são os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B convencional ou
70 encapsulada em lipossomas, o sulfato de aminosidina, o alopurinol, a pentamidina e
71 miltefosine (Noli e Auxilia, 2005; Reguera et al., 2016). No Brasil, o Ministério da
72 Agricultura, Pecuária e Abastecimento aprovou recentemente o uso do miltefosine
73 (MAPA, 2016). Entretanto, as recomendações do Ministério da Saúde mantêm as
74 medidas de proibição do tratamento da LVC com produtos de uso humano ou não
75 registrados (Brasil, 2006).

76 Os tratamentos mais comuns envolvem a utilização combinada de antimoniato de
77 meglumine com alopurinol, miltefosine associado ao alopurinol ou o uso contínuo do
78 alopurinol como monoterapia (Travi et al., 2018).

79 O alopurinol é um medicamento da classe das pirazolopirimidinas que atua no
80 metabolismo da *Leishmania* por produzir análogos inativos de inosina que são
81 incorporados no RNA do parasito inibindo a síntese proteica (Balaña-Fouce et al., 1998;
82 Helm et al., 2013), sendo extensivamente usado em vários países na terapia de LVC,

83 devido a sua baixa toxicidade, por diminui os sinais clínicos e carga parasitária, e ser de
84 baixo custo (Torres et al., 2011). Quando administrado aos cães como monoterapia
85 antileishmania por um período de 2 a 24 meses, quase sempre promove melhora clínica
86 moderada com restauração parcial dos parâmetros laboratoriais (Cavaliero et al., 1999;
87 Koutinas et al., 2001). No entanto, com a interrupção do tratamento, em geral, ocorre
88 recidiva da doença (Cavaliero et al., 1999; Travi et al., 2018). Por esse motivo, o
89 alopurinol é geralmente administrado por longo período de tempo e sendo descritos
90 poucos efeitos adversos (Noli e Saridomichelakis, 2014).

91 Com base nos principais mecanismos envolvidos nas alterações hematológicas na
92 LVC, sabe-se que parte deles estão relacionados ao comprometimento da medula óssea
93 que é observado por alterações no mielograma e no exame histopatológico (Momo et al.,
94 2014; Nicolato et al., 2013; Trópia de Abreu et al., 2011). Nesse contexto, considerando
95 que a LV pode provocar alterações no microambiente da medula óssea, e pouco se
96 conhece sobre as modificações nesse órgão após tratamento, foi proposto a avaliação do
97 efeito da terapia com alopurinol na medula óssea e na resposta clínico-laboratorial de cães
98 naturalmente infectados por *L. infantum*.

99

100 2. Materiais e métodos

101 2.1 Aspectos éticos

102 O protocolo deste estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em
103 Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), Brasil, sob
104 número 101/15 (ANEXO). Todos os procedimentos realizados com os animais foram de
105 acordo com normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

106 (COBEA). O estudo foi realizado no período compreendido entre dezembro de 2015 a
107 outubro de 2017.

108 2.2 Seleção dos animais

109 Treze cães, mestiços, machos e fêmeas, com idade de 1 a 6 anos, provenientes da
110 área endêmica de Teresina, Piauí, Brasil, foram selecionados com base no diagnóstico
111 parasitológico e sorológico positivo para *Leishmania sp.*. As amostras utilizadas para o
112 diagnóstico parasitológico eram obtidas através de aspirados de medula óssea esternal
113 e/ou linfonodo poplíteo, bem como raspado de pele (quando havia lesões cutâneas), já a
114 análise sorológica foi realizada através da utilização da plataforma DPP®
115 (Biomanguinhos). Os animais utilizados no experimento foram provenientes da Gerência
116 de Zoonoses de Teresina (GEZOON)-PI e do Hospital Veterinário Universitário
117 (HVU)/UFPI, mediante doação do tutor após informação dos objetivos da pesquisa e
118 assinatura do Termo de Doação de Animal para a Pesquisa (APENDICE). Seis cães com
119 exame parasitológico positivo foram considerados animais naturalmente infectados por
120 *Leishmania*. Sete cães com exame parasitológico negativos foram considerados animais
121 não infectados. Como critério de exclusão, animais soro-reagentes diagnosticados por
122 testes sorológicos rápidos para *Ehrlichia canis* (Alere Erliquiose Ac test KIT®) e para
123 cinomose canina (Alere cinomose Ag test KIT®) foram excluídos da análise. Após
124 seleção, os animais foram imunizados com vacina dectupla (virose) e anti-rábica, e
125 mantidos sob condições de alojamento habituais (alimentação, água, temperatura e
126 ventilação adequadas em canil apropriado do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPI),
127 com telas de proteção para evitar a entrada de flebotomíneos (vetores da LV) até a
128 conclusão do experimento.

129

130 2.3 Avaliação clínica

131 Todos os cães inseridos na pesquisa foram avaliados clinicamente de acordo com
132 os seguintes parâmetros clínicos: estado nutricional, linfonodos, coloração das mucosas,
133 alterações cutâneas (pelagem opaca, alopecia, dermatite, lesões e despigmentação de pele,
134 onicogribose), alterações oftalmológicas (secreção ocular e blefarite) e sangramentos.
135 Após a avaliação, foram atribuídos escores aos sinais clínicos, conforme Silva et al.
136 (2017).

137 2.4 Grupo experimental

138 Após a realização dos exames para diagnóstico de LV e coinfeções, os animais
139 foram divididos em dois grupos: cães infectados (N=6) e cães não infectados (N=7). Os
140 cães com LV foram tratados com Alopurinol[®] (Medley), na dose de 20mg/kg de peso
141 corporal, via oral, uma vez ao dia, durante 90 dias (Noli e Auxilia, 2005).

142 Todos os animais submetidos ao tratamento foram acompanhados e avaliados
143 quanto aos parâmetros clínicos, exames laboratoriais (hemograma e bioquímico),
144 dosagens de IgGs anti-*Leishmania*, quantificação da carga parasitária, mielograma e
145 biópsia de medula óssea, nos períodos pré-tratamento dia zero (D0) e 120 dias após o
146 início do tratamento (D120).

147 2.5 Exame laboratorial

148 Para a realização dos exames laboratoriais foi utilizada uma amostra de 4 ml de
149 sangue total, obtida através de venopunção, na veia jugular em tubo à vácuo contendo
150 EDTA 10% (Vaccuntainer, BD Lab., EUA) para exame hematológico e 4 ml de sangue
151 em tubo seco (Vaccuntainer, BD Lab., EUA) para avaliação bioquímica. Os parâmetros
152 hematológicos foram quantificados através de analisador hematológico automático
153 (Modelo: hematoclin 2.8 Vet, Bioclin) e incluíam: contagem de leucócitos totais

154 ($10^3/\text{mm}^3$), hemácias (He/mm^3), dosagem de hemoglobina (Hb g/dL) e a determinação
155 do hematócrito (Ht%), além da contagem total de plaquetas. A contagem diferencial de
156 leucócitos foi realizada por análise de pelo menos 100 leucócitos em esfregaços de sangue
157 corados com corante hematológico rápido e a leitura realizada por microscopia de luz.

158 Para a contagem de reticulócitos foi utilizada a técnica que preconiza a adição de
159 quantidades iguais de sangue e do corante azul de cresil brilhante na concentração de 1%.
160 Após, seguiu com a incubação da amostra em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Em
161 seguida, foram confeccionados esfregaços sanguíneos e contracorados com corante
162 hematológico rápido. As contagens foram realizadas utilizando-se microscópio óptico de
163 luz em aumento de 1000x, no qual foi realizada a contagem de reticulócitos em um total
164 de 1000 hemácias.

165 As amostras de soros foram analisadas através de equipamento semi-automático
166 (Modelo: D-250, Doles) em que se dosou as concentrações séricas de fosfatase alcalina,
167 proteínas totais e suas frações (albumina e globulina) alanina aminotransferase-ALT,
168 uréia e creatinina, utilizando kits LABTEST (Labtest Diagnóstica SA).

169 *2.6 Coleta da medula óssea*

170 Para a realização do aspirado e biópsia de medula óssea, os animais foram sedados
171 com associação de cloridrato de xilazina (1mg/kg) e cloridrato de cetamina (10mg/kg),
172 por via intramuscular. Após 10 minutos, foi administrado anestésico geral, Tiopental
173 Sódico 2,5%, na dose de 0,5 mL/kg de peso pela via intravenosa. Após atingir o plano
174 anestésico adequado, foi realizada a tricotomia e antissepsia local. O procedimento
175 realizou-se com base na metodologia adaptada de Raskin & Messick.(Raskin and
176 Messick, 2012) Realizou-se a coleta na crista íliaca, utilizando-se agulhas de 19 G
177 acoplada à seringa de 20 mL para a punção aspirativa da medula óssea. Aproximadamente

178 1,0 mL de aspirado de medula óssea foi obtido por coleta em EDTA a 3% diluído em
179 solução fisiológica estéril. Para avaliação do mielograma foram confeccionados
180 esfregaços em lâminas de microscopia e, em seguida, fixadas em álcool metílico e coradas
181 com corante Panótico rápido (Laborclin, ref:620529).

182 Para a obtenção de amostra de biópsia de medula óssea, foram coletados também
183 fragmentos da região da crista ilíaca, de aproximadamente 1,5 cm com o auxílio de agulha
184 para biópsia do modelo Jamshidi. Os cães foram mantidos em decúbito lateral esquerdo
185 com os membros anteriores e posteriores próximos, de modo a flexionar-se a coluna e a
186 facilitar o acesso à crista ilíaca.

187 2.7 Mielograma

188 A análise do mielograma realizou-se conforme descrita por Harvey (2012). A
189 celularidade da medula óssea foi estimada examinando-se a proporção de células *versus*
190 adipócitos presentes nas espículas e comparando a idade aproximada do animal, animais
191 jovens (25% de adipócitos e 75% de células), jovens adultos (50% de adipócitos e 50%
192 de células), animais idosos (75% de adipócitos e 25% de células).(Cowell and
193 Valenciano, 2013) Em espículas compostas por mais de 75% de células, a medula óssea
194 foi considerada hiper celular e em espículas compostas por mais de 75% de gordura, a
195 medula óssea foi considerada hipocelular. As séries eritroide, mieloide, linfoide,
196 monocítica e megacariocítica foram avaliadas quanto à frequência, maturidade e
197 morfologia, por contagem diferencial de 500 células.

198 A determinação da relação mieloide/eritroide (M:E) foi obtida dividindo-se o
199 número total de células da série mieloide pelo número total de células nucleadas da série
200 eritroide; a taxa de maturação da linhagem mielóide (MJ:MM) foi determinada dividindo-
201 se o número total de células da linhagem mieloide jovem pelo número de células da

202 linhagem mieloide madura; a taxa de maturação da linhagem eritroide (EJ:EM) foi
203 determinada dividindo-se o número total de células da linhagem eritróide jovem pelo
204 número de células eritróides nucleada madura.

205 2.8 Histopatologia da medula óssea

206 2.8.1 Coloração de Hematoxilina-eosina (H-E)

207 Os fragmentos de medula óssea foram inicialmente fixados *overnight* em solução
208 contendo Lisina 75 mM, Paraformaldeído (PFA) 4% e Periodato de Sódio 10 mM, e em
209 seguida descalcificados em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10%,
210 pH 7,0 por 72h. As amostras foram processadas por técnica de rotina, cortadas com 3 a 4
211 µm de espessura, e coradas com H-E.

212 Os resultados dos exames histopatológicos foram analisados de forma semi-
213 quantitativa em três espaços intertrabeculares.(Jubb e Kennedy, 2007) A análise da
214 celularidade foi estimada conforme a idade de cada animal (Weiss, 1986). As lesões
215 foram avaliadas em uma escala de 0 a 4, adaptada de Elmore(Elmore, 2006)onde: 0=
216 normal, 1 = mínima, 2 = média, 3= moderada, 4= grave. As lesões observadas foram
217 descritas quanto à distribuição em focal ou difusa, avaliando, no mínimo, três espaços
218 intertrabeculares. As lâminas confeccionadas foram avaliadas por dois patologistas
219 independentes.

220 2.9 Titulação dos soros por ELISA antígeno- específico anti IgG total, IgG1 e IgG2

221 Os soros dos animais infectados foram titulados de 1:400 a 1:409.600 no D0 e
222 D120. O antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) foi obtido por cultivo utilizando 1×10^{10}
223 promastigota de *Leishmania* spp. Para a detecção das respostas de anticorpos IgG total e
224 subclasses anti*Leishmania*, foram utilizadas placas de 96 poços (Maxisorb, Nunc/Thermo
225 Fisher Scientific, Rochester, NY) revestidas com 2 µg/ml de SLA em solução salina

226 tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, overnight, a 4° C. Em seguida, as placas foram
227 lavadas por 3 vezes com 200µl de PBS-Tween 0.5% (PBS-T) para serem então
228 bloqueadas durante 1 hora à temperatura ambiente com PBS-T com 5% de leite em pó
229 desnatado. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas, e adicionado 100µl de
230 soro na diluição 1:400 em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado, sendo diluído
231 seriadamente, em razão 2, até 1:409.600 e incubadas à temperatura ambiente durante 2
232 horas numa plataforma de agitação. Após esse período, as mesmas foram lavadas
233 novamente e adicionados em cada poço 100µl de anti-IgG canino total conjugado à
234 peroxidase de rábano (HRP) (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX), na diluição de
235 1:15000 em PBS-T com 5% de leite em pó desnatado, durante 1 hora. Em seguida, as
236 placas foram lavadas e adicionados 200µl do substrato, conforme descrito por (Basiri, et
237 al. 2015) (5mg de orthiphenylene diamine (OPD), 5µl de H₂O₂ e 10 ml de PBS). Para
238 parada da reação foram adicionados 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄ 3N) em cada poço
239 e, em seguida, foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro a 495 nm, sendo a
240 densidade óptica (DO) de cada poço devidamente registrada. O mesmo procedimento foi
241 realizado para dosar as subclasses de IgG (IgG1 -1:500 e IgG2- 1:30.000 (Bethyl
242 Laboratories, Montgomery, TX).

243 3.0 Carga Parasitária

244 Para a extração de DNA de células da medula óssea, utilizou-se o QIAamp DNA
245 mini kit (Qiagen), conforme recomendações do fabricante. Como alvo de detecção do
246 parasito, os iniciadores utilizados foram baseados nos minicírculos de kDNA de *L.*
247 *infantum* (Número de acesso no GenBank AF169140) de acordo com Rolão (2004),
248 sendo eles: *sense* – 5' - GGTTAGCCGATGGTGGTCTT-3' e *anti-sense* – 5' -
249 GCTATATCATATGTCCAAGCACTTACCT-3' e sonda TaqMan (5' -

250 ACCACCTAAGGTCAACCC - 3'). Para a reação de PCR quantitativo (qPCR), 5 uL de
251 amostra de DNA (100ng) foram adicionados em uma solução contendo 12,5µL de 2x
252 TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Applied Biosystems), 1,25 µL
253 de cada iniciador e 1,0 µL de sonda TaqMan MGB (FAM™ dye-labeled, Applied
254 Biosystems), para um volume final de 25 µL de reação. As amostras foram submetidas à
255 amplificação de DNA em termociclador (Applied Biosystem StepOne Plus Real Time
256 PCR System) com os seguintes ciclos: 95° por 10 minutos; 95°C por 15 segundos; 60°C
257 por 1 minuto submetidos a 40 ciclos. A curva padrão para determinação da carga
258 parasitária de *L. infantum* foi realizada por meio de diluições seriadas na razão de 1:10,
259 partindo-se de 10⁶ até 1 parasito.

260 3.1 Análise estatística

261 Foram descritas as frequências simples dos sinais clínicos, laboratoriais, histológico
262 dos cães antes e após tratamento. As medianas e quartis 25% e 75% foram utilizados para
263 avaliar as variáveis contínuas dos escores clínicos, parâmetros laboratoriais e histológico.
264 Para verificar diferenças nas distribuições das variáveis entre os parâmetros laboratoriais,
265 imunológico e do mielograma antes do tratamento (D0) e entre os animais não infectados
266 utilizou-se o teste de Mann-Whitney. E para verificar a existência de significância entre as
267 variáveis contínuas antes (D0) e 120 após o início do tratamento (D120), utilizou-se o teste
268 Wilcoxon. As análises foram realizadas por meio do programa estatístico computacional
269 *GraphPad Prism 5.0* e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

270 4.0 Resultados

271 4.1 Perfil clínico e laboratorial de cães com LV antes e após tratamento com Alopurinol

272 Nos cães infectados, os sinais clínicos mais frequentes observados no D0 foram:
273 linfadenomegalia em 100% (6/6) dos animais, seguidos de lesões cutâneas em 66,7% (4/6),
274 sendo despigmentação e hiperqueratose de focinho, úlceras cutâneas e dermatite esfoliativa

275 as mais observadas. Outras manifestações incluíam: onicogribose em 66,7% (4/6), mucosas
 276 hipocoradas em 50% (3/6), 50% (3/6) apresentavam alterações oculares tais como:
 277 secreção ocular e opacidade de córnea e emagrecimento em 16,7% (1/6), o escore clínico
 278 atribuído as manifestações clínicas variou de 3 a 13 (Tabela 1).

279 No D120, embora tenha ocorrido a melhora clínica dos animais, alguns sintomas
 280 persistiram como a linfadenomegalia em 100% (6/6) dos casos, lesões cutâneas em 50%
 281 (3/6), lesões oculares em 33,3% (2/6) e onicogribose em 16,7% (1/6), o escore clínico
 282 variou de 2 a 8 (Tabela 1).

283 Em relação à carga parasitária da medula óssea quando comparada entre os
 284 períodos D0 e D120, observou-se redução em 66,7% (4/6) dos animais, mas sem
 285 diferença significativa (Tabela 1 e Tabela 2).

286 Tabela 1. Frequência dos sinais clínicos e média da carga parasitária de cães naturalmente
 287 infectados por *L. infantum* "pré" e "pós" tratamento com Alopurinol

Sinais clínicos e carga parasitária	Cães infectados	
	D0	D120
Emagrecimento	1 (16,7%)	0
Onicogribose	4 (66,7%)	1 (16,7%)
Linfadenomegalia	6 (100%)	6 (100%)
Mucosas hipocoradas	3 (50%)	0
Lesões cutâneas	4 (66,7%)	3 (50%)
Alterações oculares	3 (50%)	2 (33,3%)
Escore clínico	4 (3-8,5)	3 (2-7,2)
Carga Parasitária	2,6 (0,0-29,0)*	0,05 (0,0-3,3)

288 *Mediana (percentis 25-75).

289 O exame hematológico dos cães infectados no D0 demonstrou anemia em 83,3%
290 (5/6) dos cães, destes 40% (2/5) apresentaram anemia normocítica normocrômica, 40%
291 (2/5) anemia normocítica hipocrômica, 20% (1/5) anemia microcítica hipocrômica. Foi
292 observada uma redução significativa nos níveis de hemoglobina no D0 comparando-se
293 aos animais não infectados. O leucograma revelou leucocitose com neutrofilia em 17%
294 (1/6) dos animais. Em relação ao número de plaquetas, 50% (3/6) dos cães apresentavam
295 trombocitopenia (Tabela 2).

296 No D120, houve uma recuperação da anemia com valores médios de eritrócitos,
297 hemoglobina e hematócritos atingindo os parâmetros de normalidade quando comparados
298 com o D0. O leucograma revelou que 50% (3/6) dos animais apresentaram leucocitose
299 com eosinofilia e, apenas um animal apresentou trombocitopenia (Tabela 2)

300 Na avaliação do perfil bioquímico D0, havia alteração nos níveis séricos de
301 fosfatase alcalina, ALT, proteínas totais, albumina e globulinas. Os níveis de fosfatase
302 alcalina estavam acima dos valores de referência em 50% (3/6); em 50% (3/6) foi
303 observado aumento dos níveis de ALT, seguido de 66,7% (4/6) dos animais apresentando
304 hiperproteinemia. Foi observado com níveis significantes, hipoalbumemia e
305 hiperglobulinemia nos animais no D0 em relação aos animais não infectados (Tabela 3).

306 As concentrações séricas de ALT, proteínas totais, albumina e globulina também
307 apresentavam alterações pós-tratamento, sendo que apenas um animal continuava com
308 níveis elevados de ALT, 100% (6/6) dos cães continuaram com hiperproteinemia, 50%
309 (3/6) com hipoalbumemia e 100% (6/6) com hiperglobulinemia (Tabela 3).

310 Após os 120 dias do início do tratamento, houve uma redução significativa dos
311 níveis séricos de IgG total, IgG1 e IgG2 nos animais infectados (Tabela 3)

312

313 Tabela 2 Resultados do escore clínico, carga parasitária e hemograma dos animais antes (D0) e pós tratamento (D120) com Alopurinol

animal	D0			D120		
	escore clínico	carga parasitária (parasita/ μ L)	hemograma	escore clínico	carga parasitária (parasita/ μ L)	hemograma
1	13	11,95	Anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia.	8	0,00	Leucocitose com eosinofilia e linfocitose absoluta
2	4	78,50	Anemia normocítica normocrômica, leucocitose com neutrofilia absoluta	3	0,11	Anemia macrocítica hipocrômica, eosinofilia absoluta
3	7	0,00	Anemia normocítica hipocromica	7	0,00	Leucocitose com eosinofilia absoluta.
4	4	1,33	Anemia microcítica normocromica, monocitopenia absoluta	2	1,73	Trombocitopenia. eosinopenia absoluta
5	3	3,93	Eosinopenia absoluta	2	8,19	Linfocitose absoluta. monocitopenia absoluta.
6	3	0,82	Hemograma normal	3	0,00	Monocitopenia absoluta.

314

315

316 Tabela 3 Avaliação dos parâmetros laboratoriais[#] e imunológicos de cães infectados por317 *L. infantum* antes e pós-tratamento com alopurinol e animais não infectados

Parâmetros laboratoriais	Grupos clínicos		
	Cães infectados		Cães não infectados
	D0 (n=6)	D120 (n=6)	(D0) (n=7)
Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	4,6 (3,7-6,5)*	6,4 (5,4-8,1) ^b	6,2 (5,4-7,4)
Hemoglobina (g/dL)	10,4 (8,05-12,3) ^a	13,3 (11,4-16,9) ^b	13,4 (10,6-15,2)
Hematócrito (%)	30,9 (24,7-38,1)	42,2 (38,2-53,6) ^b	42,1 (37,1-45,1)
Reticulócitos (μL)	12,8 (4,74-72,2)	5,9 (3,7-7,0)	5,9 (3,74-7,0)
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	208 (147,3-285,8)	353 (250,5-437,5)	206 (145-387)
Fosf. alcalina (UI/L)	142,9 (52,3-182,9) ^a	76,9 (45,5-89,23) ^a	27,0 (18,5-37,6)
ALT (U/L)	36 (25,1-69,7)	30,3 (24,2-36,1)	27 (18,5-37,6)
Ureia (mg/dL)	20,6 (15,5-34,1)	24,5 (18,7-30,3)	27,5 (27,2-44)
Creatinina (mg/dL)	0,9 (0,7-0,95)	0,8 (0,7-1,0)	1,0 (0,9-1,1)
Proteína total (g/dL)	9,0 (6,32-10,8)	9,0 (8,2-9,7)	8,4 (7,3-8,6)
Albumina (g/dL)	1,4 (1,0-2,05) ^a	2,2 (1,8-2,6)	3,5 (2,5-3,8)
Globulina(g/dL)	7,6 (5,1-9,17) ^a	6,7 (6,0-7,4)	4,8 (4,6-5,3)
IgG total (O.D.)	9600 (3200-89600)	3200 (2800-17600) ^b	-
IgG1 (O.D.)	3200 (800-64000)	1200 (700-8800) ^b	-
IgG2 (O.D.)	16000 (6400-140800)	3200 (1600-28000) ^b	-

318 *Mediana (percentis 25 – 75).

319 ^aP< 0,05, teste Mann-Whitney comparando cães no D0 e cães não infectados.320 ^bP<0,05, teste de Wilcoxon comparando cães no D0 e D120.

321 -Valores não quantificados.

322 [#] Valores de referência: Hemácias = 5,5-8,5 (x10⁶/mm³); Hemoglobina= 12-18 g/dL; Hematócrito= 37-55%; Reticulócitos= ≤60000/μL; Leucócitos = 6-17 x 10³/mm³; Plaquetas = 200-500 x10³/mm³ HARVEY (2012). Fosfatase alcalina: 20-156 UI/L ALT (Alanina aminotransferase):21-73 UI/L; Ureia: 21,40-59,92 mg/dL; Creatinina: 0,50-1,50 mg/dL; Proteína Total: 5,40-7,10 g/dL; Albumina: 2,60-3,30 g/dL; Globulina: 2,70-4,40 g/dL KANEKO. ⁽³⁰⁾

323 *4.2 Alterações no mielograma de cães com LV antes e pós tratamento com Alopurinol*

324 Nos cães infectados no D0, foi observada alteração somente na série mielóide com
325 redução significativa dos precursores da série eosinofílica (mielócito, metamielócito e
326 bastonetes) e metamielócito neutrófilo em relação aos cães não infectados (Dados
327 suplementares, Tabela IV). (Tabela 3).

328 Nos 120 dias após início do tratamento, houve redução significativa dos neutrófilos
329 segmentados quando comparados no D0. Em contraste, foi observado aumento
330 significativo do número de plasmócitos (Tabela 4).

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347 Tabela 4 Avaliação da celularidade relativa e taxa de maturação celular da medula óssea de cães
 348 naturalmente infectados por *L. infantum* antes e pós tratamento com Alopurinol e animais não
 349 infectados

Parametros	Cães infectados		Cães não infectados (n=7)
	D0 (n=6)	D120 (n=6)	
Série mielóide			
Mieloblasto	0,3 (0,2-2,1)	0,5 (0,35-1,1)	1 (0,4-1,2)
Mielócito neutrófilo	3,2 (1,7-5,15)	2 (1,8-3,5)	3,4 (2-4,2)
Mielócito eosinófilo	0,5 (0,3-0,8) ^a	0,9 (0,6-2,05)	1,4 (0,8-3,2)
Metamielócito neutrófilo	7,4 (6-9,4) ^a	11 (8,6-16,4)	13,8 (10,8-15,4)
Metamielócito eosinófilo	0,1 (0-0,2) ^a	0,5 (0-1,8)	0,6 (0,2-0,8)
Bastonete neutrófilo	9,6 (8,4-19,7)	12,3 (9,9-17,5)	17,6 (12,6-18,8)
Bastonete eosinófilo	0,2 (0-0,45) ^a	0,9 (0,0-3,4)	0,4 (0,4-0,8)
Neutrófilos	27,4 (8,5-45,2)	8,1 (1,6-14,4) ^b	14,0 (12-15,8)
Eosinófilos	0,5 (0,3-1,5)	0,6 (0,0-0,8)	0,6 (0,2-1,0)
Total células mieloides jovens	0,3 (0,2-2,1)	0,5 (0,3-1,1)	1,0 (0,4-1,2)
Total células mieloides maduras	59,2 (33,3-69,2)	44,4 (29,45-49,0)	51,6 (49,6-56,8)
Mieloide Jovem:Mieloide Maduro (MJ:MM)	0,01 (0,01-0,03)	0,01 (0,01-0,02)	0,02 (0,01-0,03)
Série eritróide			
Rubriblasto	0,7 (0-1,3)	0,6 (0,0-2,1)	0,4 (0,2-0,4)
Rubricito	13,6 (5,9-31,95)	23,6 (10,7-32,6)	26,4 (22,6-31,4)
Metarrubricito	5,5 (2,2-7,0)	4,9 (2,2-6,4)	6 (3-7,6)
Total células eritroides jovens	0,7 (0,0-1,3)	0,6 (0,0-2,1)	0,4 (0,2-0,4)
Total células eritroides maduras	17,6 (11,9-37,2)	30,8 (12,1-37,4)	32,4 (28,2-36,8)
Eritroide Jovem:Eritroide Maduro (EJ:EM)	0,01 (0-0,09)	0,02 (0,0-0,08)	0,01 (0-0,02)
Outros			
Linfócitos	2,1 (1,0-4,3)	1,9 (1,6-3,0)	2,4 (1,4-2,8)
Plasmócitos	2,5 (0,7-14,95)	11,1 (2,5-23,4) ^b	4,2 (3,4-9,6)
M:E	3,2 (1,1-4,1)	1,4 (1,1-3,0)	1,6 (1,4-1,9)

350 *Mediana (percentis 25 – 75).

351 ^aP< 0,05, teste Mann-Whitney comparando cães no D0 e cães não infectados.

352 ^bP<0,05, teste de Wilcoxon comparando cães no D0 e D120.

353

354 # Valores de referência em cão adulto: mieloblasto= 0.4-1.1; mielócito neutrófilo= 3.1-6.1; mielócito eosinófilo=
 0.0-2.07; Metamielocito neutrófilo=5.3-8.8; metamielócito eosinófilo=0.0-2.81; bastonete neutrófilo=12.7-17.2;
 355 bastonete eosinófilo=0.07-2.81 neutrófilos=13.8-24,2; eosinófilos=3,6; mielóide jovem= 10,3; mielóide madura=
 39,4; rubriblasto=0.2-1.1, rubricito=15.5-25.1, metarrubricito=9.2-16.4, eritroide jovem= 4,1; eritróide maduta=
 42,3; linfócitos=1.7-4.9; plasmócito=0.6-2.4; relação M:E=0,75-2,25 (JAIN, 1993; HARVEY 2012; Mischke &
 Busse, 2002).

356

357 A análise das alterações morfológicas das linhagens hematopoiética observadas
 358 durante contagem diferencial antes e pós-tratamento, revelou que 50% (3/3) dos cães
 359 antes do tratamento apresentavam alterações displásicas na série eritróide caracterizada
 360 por mitoses atípicas (despolarizadas) (Fig.1 A), assincronismo maturativo núcleo-

361 citoplasma, e precursores eritróides gigantes, 83,33% (5/6) dos cães demonstraram
362 alterações na linhagem granulocítica compatíveis com *donut cells* (célula em rosca)
363 (Fig.1 B), hipersegmentação neutrofílica (Fig.1 C), binucleação celular (Fig.1 D),
364 bastonetes gigantes e assincronia de maturação. Após o tratamento foi observado que
365 83,3% (5/6) dos animais demonstraram alterações displásicas na série eritróide
366 compatíveis com citoplasma escasso e irregular e assincronismo maturativo núcleo-
367 citoplasma, 50% (3/3) dos cães demonstraram alterações na linhagem mieloide
368 compatível com precursores gigantes, hipersegmentado e com vacuolização nuclear e em
369 16,7% (1/6) foram observados displasia megacariocítica exibindo hipolobulação do
370 núcleo e emperipolesi (Fig.1 E).

371

372 *4.3 Alterações histopatológicas em medula óssea de cães com LV antes e pós-tratamento* 373 *com Alopurinol*

374 A análise histopatológica da medula óssea não mostrou alterações significantes
375 nos animais no D0 e D120.

376 No D0, 50% (3/6), apresentaram a medula óssea hipercelular, 33,3% (2/6) dos
377 animais infectados apresentaram hiperplasia megacariocítica e 33,3% (2/6) hipoplasia
378 megacariocítica. Macrófagos ativados estavam presentes em 50% (3/6) dos animais, e em
379 50% (3/6) foram observadas áreas de necrose, em 16,7% (1/6) vacuolização
380 citoplasmática e 50% (3/6) hemorragia.

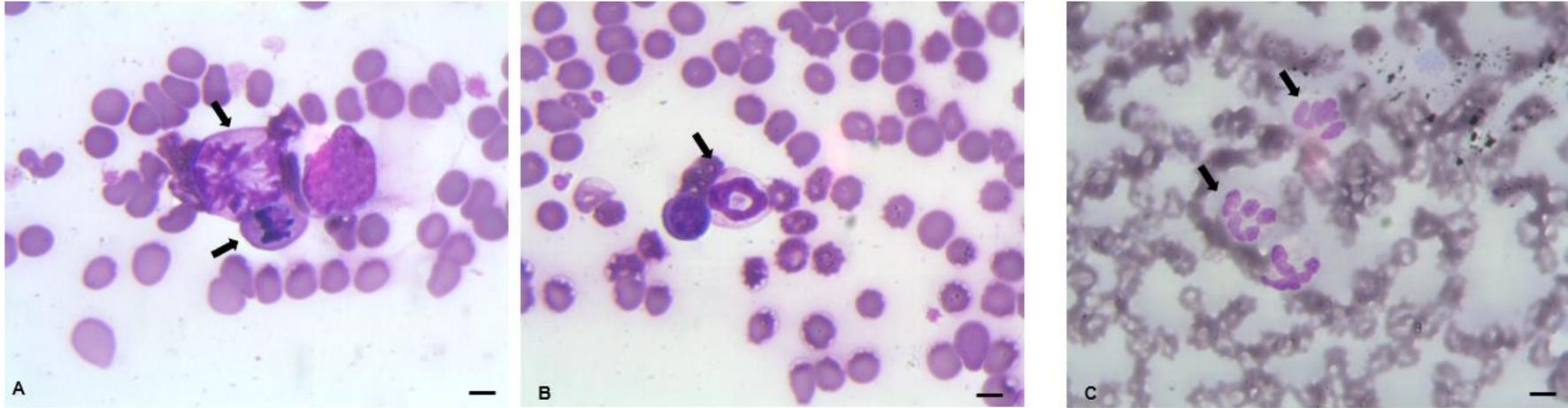
381 No D120, 33,3% (2/6) apresentaram a medula óssea hipercelular, e hipocelularida,
382 hiperplasia megacariocítica, hipoplasia megacariocítica e macrófagos foram observados
383 em 16,7% (1/6) dos animais e hemorragia estava presente em 50% (3/3).

384

385

386

387



388

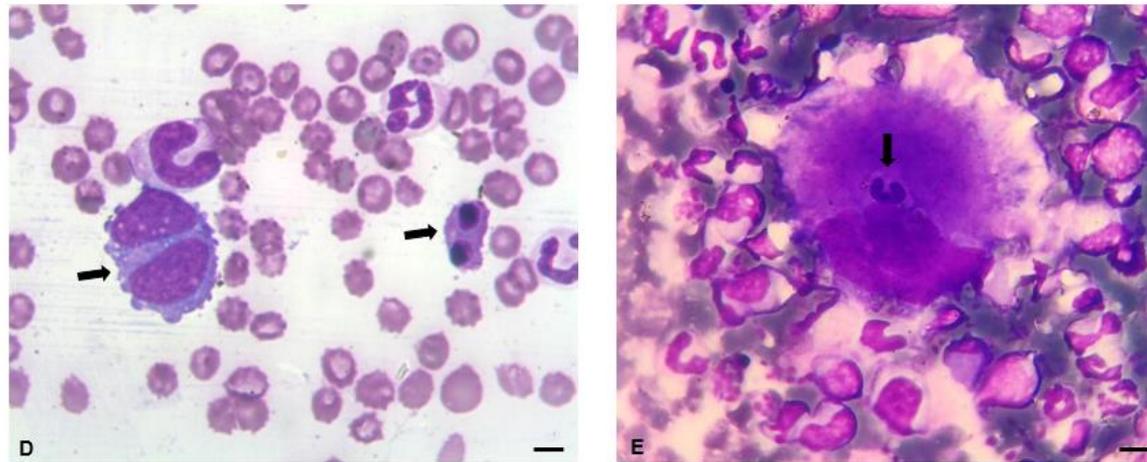


Fig. 1: Aspirado de medula óssea de cão com LV. A, mitoses atípicas (setas). B, *donut cells* (célula em rosca) (seta). C, hipersegmentação neutrofílica (setas). D. Percursos binucleados (setas). E, emperipolesis (seta). Corante Romanowsky (Barra=100 μ m).

389 5.0 Discussão

390

391 Com o intuito de contribuir na investigação do impacto do tratamento na medula óssea dos
392 animais infectados, esse estudo propôs avaliar as alterações encontradas no mielograma e
393 histopatológico antes e após o tratamento com alopurinol. Também foram avaliados os parâmetros
394 clínicos, laboratoriais e a carga parasitária dos animais.

395 A LVC é uma doença sistêmica que pode envolver vários órgãos e tecidos e manifesta-se
396 por sinais clínicos inespecíficos. As manifestações clínicas mais comuns e encontradas nos
397 animais do nosso estudo foram linfadenomegalia generalizada, perda de peso corporal, palidez de
398 mucosas, dermatites em diversos graus e lesões oculares (Solano-Gallego et al., 2011), com a
399 instituição do alopurinol os animais do experimento demonstraram resposta clínica a terapia com
400 remissão dos sinais clínicos. Cavaliero et al. (1999) utilizando protocolo com alopurinol, observou
401 que todos os animais envolvidos no estudo apresentaram melhora clínica após o início do
402 tratamento com duração de 2 a 24 meses e não ocorreu recidiva durante o tratamento a longo prazo,
403 entretanto observou aparecimento de sinais clínicos como lesões cutâneas e linfadenomegalia após
404 interrupção da terapia. Solano-Gallego et al. (2016) também observou uma melhora clínica em
405 cães submetidos a protocolos de tratamento com associação de antimoniato de meglumina por 30
406 dias e alopurinol por 12 meses.

407 De acordo com Travi et al., (2018) os objetivos propostos pelos tratamentos são múltiplos,
408 variando desde a melhora clínica dos animais sintomáticos até a prevenção do aparecimento dos
409 sinais clínicos em cães assintomáticos, sendo que o intuito é a cura parasitológica propiciando o
410 aumento da expectativa de vida dos animais tratados.

411 Os parâmetros laboratoriais em cães com LVC são frequentemente reportados na literatura
412 e incluem anemia em graus variáveis, sendo anemia normocítica normocrômica de intensidade
413 média a moderada a mais comum. Também são relatadas leucocitose, trombocitopenia,

414 hipoalbumemia e hiperglobulinemia, no entanto, são observadas alterações laboratoriais distintas
415 com o curso da infecção (Reis et al., 2006; Ulchar et al., 2015). Anemia é considerada um
416 importante marcador clínico-patológico para acompanhamento da eficácia de tratamentos
417 antileishmania (Koutinas et al., 2001). Normalmente, o quadro de anemia é revertido durante ou
418 logo após o tratamento (Helm et al., 2013). Koutinas et al., (2001) observaram redução da
419 frequência de anemia entre os animais avaliados após tratamento com alopurinol. Dos 34 animais
420 inseridos no estudo, 67,6% apresentaram redução da porcentagem de hematócrito no pré-
421 tratamento. Logo após a terapia, a porcentagem de hematócrito reduzida foi observada em apenas
422 32,4% dos cães. Helm et al. (2013) relataram a ocorrência de alterações laboratoriais, tais como:
423 hipoalbumemia e hiperproteinemia em 32 cães com LVC originários de área endêmicas da Europa,
424 após iniciado o tratamento com alopurinol entre 1 a 5 meses, os autores observaram normalização
425 no quadro de hipoalbumemia, hiperproteinemia, anemia e leucopenia. Solano-Galego et al. (2016)
426 observou que 94% (18/37) e 65% (19/29) dos cães não apresentaram mais alterações nos
427 parâmetros laboratoriais nos dias 180 e 365 de acompanhamento respectivamente. Alguns animais
428 permaneceram apenas com proteinúria ou hiperglobulinemia leve.

429 Resposta humoral específica na LVC caracteriza-se por elevados níveis de IgG anti-
430 *Leishmania*, correlacionados à infecção e à elevada carga parasitária (Quinnell et al., 2003;
431 Laranjeira et al., 2014), bem como é um dos principais responsáveis pela patogênese da doença
432 em animais susceptíveis em decorrência do estabelecimento das reações de hipersensibilidade tipo
433 II e III em diversos tecidos (Saridomichelakis, 2009).

434 Estudos mais recentes concentram-se em relacionar as várias classes e subclasses de
435 imunoglobulina e a resposta produzida pelo hospedeiro durante o processo de infecção,
436 destacando-se a quantificação de anticorpos IgG1 e IgG2 e sua eficácia como biomarcadores para
437 avaliar o perfil de suscetibilidade e resistência à doença (Neto et al., 2010; Lima et al., 2017).
438 Diante disso, o perfil humoral é considerado um bom marcador para avaliar a eficácia do

439 tratamento e diferenciar cães responsivos ou não à terapia (Hosein et al., 2018), pois o declínio
440 dos níveis de IgG sugere a redução da carga de *Leishmania* na maioria dos cães submetidos a
441 quimioterápicos (Rodríguez et al., 2006). O monitoramento da cinética do anticorpo é também é
442 muito útil para a detecção de recidiva clínica de cães em tratamento podendo sugerir protocolo
443 inadequado ou resistência a drogas (Solano-Gallego et al., 2016).

444 Cavaliero et al.(Cavaliero et al., 1999) observaram redução dos níveis de IgG e subclasses,
445 após tratamento com alopurinol, entretanto, houve redução gradual significativa dos níveis de IgG
446 total e IgG2, enquanto que os níveis de IgG1 reduzem rapidamente em cães responsivos ao
447 tratamento. A avaliação dos níveis de anticorpos após tratamento também é reportada em
448 pacientes humanos com LV, nos quais níveis reduzidos de anticorpos das subclasses de IgG podem
449 sugerir a eficácia do protocolo terapêutico utilizado (Matta et al., 2000).

450 Manna et al. (2015) também observaram redução dos títulos das subclasses de IgG logo
451 após tratamento de longa duração com alopurinol associado a outros fármacos, no entanto, com a
452 avaliação contínua dos animais após a terapia, observou-se aumento dos níveis de IgG2 associado
453 à recidiva da doença.

454 A associação de achados na medula óssea de humanos tem sido útil para avaliar a resposta
455 ao tratamento para LV, bem como determinar o prognóstico dos pacientes. Diante disso, pacientes
456 com medula óssea hipocelular responderam bem ao tratamento com antimoniato pentavalente, já
457 pacientes com granuloma não foram responsivos à terapia com antimoniato pentavalente, mas
458 responderam à Anfotericina B, no entanto pacientes com fibrose e necrose na medula óssea foram
459 resistentes a qualquer tipo de terapia e evoluíram para o óbito (Kumar et al., 2007). É importante
460 considerar que o valor dos achados na medula óssea pode orientar qual a melhor terapia a ser
461 instituída ao paciente (Dhingra et al., 2010). Em cães, os estudos tem focado para a importância
462 da medula óssea como alvo para acompanhamento da redução da carga parasitária após tratamento
463 para LVC (Ribeiro et al., 2008; Silva et al., 2012). No entanto, assim como em humanos, os

464 achados na medula óssea podem ser utilizados para direcionar o tratamento, bem como determinar
465 o possível prognóstico dos animais infectados.

466 Em cães, redução de precursores eosinofílicos na medula óssea podem estar relacionados
467 à disfunção nesse órgão afetada pelo intenso parasitismo local (Trópia de Abreu et al., 2011) e/ou
468 a migração de eosinófilos para os tecidos atuando como leishmanicida adicional (Rodríguez e
469 Wilson, 2014). Em adição, a hipoplasia eosinofílica tem sido associada à progressão da doença em
470 que a medula óssea passa a não ser responsiva, provavelmente em decorrência dos elevados níveis
471 de citocinas inflamatórias presentes nessa fase da infecção (Nicolato et al., 2013), contribuindo,
472 dessa forma, para a redução dessas células no sangue periférico como já foi reportado eosinopenia
473 em cães e pacientes humanos com LV (Reis et al., 2006; Nicolato et al., 2013; Al-Ghazaly et al.,
474 2017). Em humanos, a observação de eosinopenia, na medula óssea, pode direcionar para a
475 suspeita de infecção por *Leishmania*, devendo-se dar importância para esse achado particularmente
476 em áreas não endêmicas para LV (Al-Ghazaly et al., 2017).

477 A diminuição de neutrófilos na medula óssea pós-tratamento sugere redução da demanda
478 dessas células em decorrência da menor carga de parasitas vista nesse órgão (Ikeda-Garcia et al.,
479 2008; Silva et al., 2012). Nossos resultados estão em conformidade com a literatura em que após
480 tratamento com antimoniato de meglumine foi observada uma redução no número de granulócitos
481 na medula óssea (Ikeda-Garcia et al., 2008; Yizengaw et al., 2016). Vale ressaltar que os
482 neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o local de infecção por *Leishmania*,
483 com o objetivo de restringir a disseminação precoce do parasita (Pereira et al., 2017), além de
484 apresentarem função na indução, manutenção e resolução da inflamação desempenhando papel
485 fundamental na patogênese da LV(Yizengaw et al., 2016).

486 Aumento da série linfóide, caracterizada por aumento de plasmócitos observada na medula
487 óssea em cães no D120 pode ser resultante de estimulação antigênica (Nicolato et al., 2013).
488 Ikeda-Garcia et al. (2008) observaram plasmocitose em dois cães durante o tratamento com

489 antimoniato de meglumine e associaram esse achado à provável produção de anticorpos
490 antileishmania por essas células. É importante enfatizar que os animais envolvidos no estudo não
491 apresentavam alterações clínico-laboratoriais graves, diante disso, acreditamos que as
492 modificações na celularidade da medula óssea pós-tratamento seriam mais evidentes em animais
493 com o status clínico mais grave.

494 Nesse contexto, vale ressaltar que o sistema imune do hospedeiro apresenta papel decisivo
495 no estabelecimento da infecção e na avaliação do êxito de um protocolo terapêutico (Pinelli et al.,
496 1994; Moreno et al., 1999).

497 6.0 Conclusão

498 O tratamento envolvendo o alopurinol promoveu melhora clínica e no perfil laboratorial
499 com redução da anemia entre os animais, além de causar alterações citológicas na medula óssea
500 caracterizadas, principalmente, pela redução de neutrófilos e aumento de plasmócitos. No entanto,
501 sugerimos um estudo detalhado e a longo prazo em busca de compreender possíveis mecanismos
502 adicionais envolvidos nas modificações da medula óssea gerados pelo uso do alopurinol para o
503 tratamento da leishmaniose visceral canina.

504

505 Conflito de interesse

506 Em nenhum dos autores há qualquer conflito de interesse financeiro relacionado a este manuscrito.
507 A utilização dos animais envolvidos no estudo obedeceu às diretrizes nacionais de bem-estar
508 animal.

509

510 Agradecimentos

511 À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), pela concessão da
512 bolsa. Ao GEZOON, pela doação dos animais usados na pesquisa. Ao setor de Patologia Animal
513 da Universidade Federal do Piauí, pela colaboração no processamento e suporte para a análise dos
514 dados.

515 Financiamento

516 Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
517 (CNPq) (Processo nº 467389/2014-4) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí
518 (FAPEPI) (Processo nº 301274/2015-0).

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540 Referências

- 541 Al-Ghazaly, J., Al-Dubai, W., Abdullah, M., Al-Gharasi, L., 2017. Hematological
542 Characteristics of Yemeni Adults and Children with Visceral Leishmaniasis. Could
543 Eosinopenia be a Suspicion Index? *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 9, e2017056.
- 544 Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M. den,
545 Team, the W.L.C., 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence.
546 *PLoS One* 7, e35671.
- 547 Balaña-Fouce, R., Reguera, R., Cubría, J., Ordóñez, D., 1998. The Pharmacology of
548 Leishmaniasis. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 30, 435–443.
- 549 Brazil, 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde.
- 550 Cavaliero, T., Arnold, P., Mathis, A., Glaus, T., Hofmann-Lehmann, R., Deplazes, P., 1999.
551 Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs
552 naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.* 13, 330–4.
- 553 Costa, F.A.L., Goto, H., Saldanha, L.C.B., Silva, S.M.M.S., Sinhorini, I.L., Silva, T.C., Guerra,
554 J.L., 2003. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral
555 Leishmaniasis. *Vet. Pathol.* 40, 677–684.
- 556 Cowell, R.L., Valenciano, A.C., 2013. Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology
557 of the dog and cat, 4th ed. Mosby.
- 558 da Matta, V.L., Hoshino-Shimizu, S., Dietze, R., Corbett, C.E., 2000. Detection of specific
559 antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral
560 leishmaniasis. *J. Clin. Lab. Anal.* 14, 5–12.
- 561 Silva, S.M., Amorim, I.F.G., Ribeiro, R.R., Azevedo, E.G., Demicheli, C., Melo, M.N., Tafuri,
562 W.L., Gontijo, N.F., Michalick, M.S.M., Frézard, F., 2012. Efficacy of Combined Therapy
563 with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of
564 Canine Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2858–2867.

- 565 Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., de Paiva-Cavalcanti, M.,
566 Otranto, D., 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities
567 and differences. *Trends Parasitol.* 28, 531–8.
- 568 Dhingra, K.K., Gupta, P., Saroha, V., Setia, N., Khurana, N., Singh, T., 2010. Morphological
569 findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral Kala Azar: a review. *Indian*
570 *J. Pathol. Microbiol.* 53, 96–100.
- 571 E. Basiri, S. Ardehali, E. Kamali, M. Habibagahi, I. Sharifi, A.G., 2015. Production and Partial
572 Characterization of Monoclonal Antibodies to *Leishmania*. *Iran. J. Med. Sci.* 27, 75–79.
- 573 Elmore, S.A., 2006. Enhanced Histopathology of the Bone Marrow. *Toxicol. Pathol.* 34, 666–
574 686.
- 575 Freitas, J.C.C. de, Nunes-Pinheiro, D.C.S., Lopes Neto, B.E., Santos, G.J.L., Abreu, C.R.A. de,
576 Braga, R.R., Campos, R. de M., Oliveira, L.F. de, 2012. Clinical and laboratory alterations
577 in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 24–29.
- 578 Harvey, J.W., 2012. *Veterinary hematology : a diagnostic guide and color atlas.* 1th ed
579 Elsevier/Saunders.
- 580 Helm, M., Müller, W., Schaarschmidt, D., Grimm, F., Deplazes, P., 2013. Allopurinol-Therapie
581 bei importierten Hunden mit Leishmaniose ausserhalb des Endemiegebietes. *Schweiz.*
582 *Arch. Tierheilkd.* 155, 559–567.
- 583 Hosein, S., Blake, D.P., Solano-Gallego, L., 2018. Insights on adaptive and innate immunity in
584 canine leishmaniosis.
- 585 Igor Ulchar, Irena Celeska, J., Stefanovska, A.J., 2015. Hematological and Biochemical
586 parameters in symptomatic and asymptomatic leishmania-seropositive dogs. *Orig. Sci. c*
587 *Artic. Mac Vet Rev* 38, 175–182.
- 588 Ikedagarcia, F.A., Ciarlini, P.C., Lopes, R.S., Marques, F.J., Bomfim, S.R.M., Lima, V.M.F. de,
589 Perri, S.H.V., Marcondes, M., Marcondes, M., 2008. Avaliação hematológica de cães

- 590 naturalmente infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* submetidos a tratamento com
591 antimoniato de meglumina. *Brazilian J. Vet. Res. Anim. Sci.* 45, 68.
- 592 Jubb KVF, Kennedy PC, P.N., 2007. Hematopoietic system, in: Jubb, Kennedy & Palmer's
593 Pathology of Domestic Animals. Elsevier, pp. 107–109.
- 594 Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M., 2008. Clinical biochemistry of domestic animals.
595 Elsevier/Academic Press.
- 596 Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L., Polizopoulou, Z.,
597 Billinis, C., Argyriadis, D., Diakou, N., Papadopoulos, O., 2001. A randomised, blinded,
598 placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 98,
599 247–61.
- 600 Kumar, P.V., Vasei, M., Sadeghipour, A., Sadeghi, E., Soleimanpour, H., Mousavi, A.,
601 Tabatabaei, A.H., Rizvi, M.M., 2007. Visceral Leishmaniasis: Bone Marrow Biopsy
602 Findings. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 29, 77–80.
603 <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e31803076a8>
- 604 Laranjeira, D.F., Matta, V.L.R. da, Tomokane, T.Y., Marcondes, M., Corbet, C.E.P., Laurenti,
605 M.D., 2014. Serological and infection statuses of dogs from a visceral leishmaniasis-
606 endemic area. *Rev. Saude Publica* 48, 563–71.
- 607 Lima, L.V. do R., Carneiro, L.A., Campos, M.B., Vasconcelos dos Santos, T., Ramos, P.K.,
608 Laurenti, M.D., Teixeira, C.E.C., Silveira, F.T., 2017. Further evidence associating IgG1,
609 but not IgG2, with susceptibility to canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania* (*L.*)
610 *infantum chagasi* -infection. *Parasite* 24, 37.
- 611 Manna, L., Corso, R., Galiero, G., Cerrone, A., Muzj, P., Gravino, A.E., 2015. Long-term
612 follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol
613 versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit. Vectors* 8, 289.
- 614 MAPA Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2016. Nota Técnica conjunta, nº

- 615 001/2016.
- 616 Maurício, I.L., Stothard, J.R., Miles, M.A., 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*.
617 *Parasitol. Today* 16, 188–9.
- 618 Momo, C., Jacintho, A.P.P., Moreira, P.R.R., Munari, D.P., Machado, G.F., Vasconcelos,
619 R.D.O., 2014. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral
620 leishmaniasis. *Vet. Med. Int.* 2014.
- 621 Moreno, J., Nieto, J., Chamizo, C., González, F., Blanco, F., Barker, D.C., Alvar, J., 1999. The
622 immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after,
623 chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 71, 181–195.
- 624 Neto, R.G.T., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Vitor, R.W. de A., Coura-Vital, W., Quaresma,
625 P.F., Ker, H.G., Melo, L.A. de, Gontijo, C.M.F., Reis, A.B., 2010. Relationship of
626 *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in
627 canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 169, 248–257.
- 628 Nicolato, R. de C., Abreu, R.T. de, Roatt, B.M., Aguiar-Soares, R.D. de O., Reis, L.E.S.,
629 Carvalho, M. das G., Carneiro, C.M., Giunchetti, R.C., Bouillet, L.E.M., Lemos, D.S.,
630 Coura-Vital, W., Reis, A.B., 2013. Clinical Forms of Canine Visceral Leishmaniasis in
631 Naturally *Leishmania infantum*-Infected Dogs and Related Myelogram and Hemogram
632 Changes. *PLoS One* 8, e82947.
- 633 Noli, C., Auxilia, S.T., 2005. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic
634 review. *Vet. Dermatol.* 16, 213–232.
- 635 Noli, C., Saridomichelakis, M.N., 2014. An update on the diagnosis and treatment of canine
636 leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet. J.* 202, 425–435.
- 637 Pereira, M., Valério-Bolas, A., Santos-Mateus, D., Alexandre-Pires, G., Santos, M., Rodrigues,
638 A., Rocha, H., Santos, A., Martins, C., Tomas, A., Passero, F., da Fonseca, I.P., Santos-
639 Gomes, G., 2017. Canine neutrophils activate effector mechanisms in response to

- 640 *Leishmania infantum*. *Vet. Parasitol.* 248, 10–20.
- 641 Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., Real, G. Del, Ruitenber, J.,
642 1994. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally
643 Infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 229–235.
- 644 Quinnell, R.J., Courtenay, O., Garcez, L.M., Kaye, P.M., Shaw, M.A., Dye, C., Day, M.J., 2003.
645 IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. *Vet.*
646 *Immunol. Immunopathol.* 91, 161–168.
- 647 Raskin, R.E., Messick, J.B., 2012. Bone Marrow Cytologic and Histologic Biopsies: Indications,
648 Technique, and Evaluation. *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 42, 23–42.
- 649 Reguera, R.M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C., Balaña-Fouce, R., 2016.
650 Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 227, 98–
651 114.
- 652 Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Carvalho, M.G., Mayrink, W., França-
653 Silva, J.C., Giunchetti, R.C., Genaro, O., Corrêa-Oliveira, R., 2006. Parasite density and
654 impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of
655 canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.* 81, 68–75.
- 656 Ribeiro, R.R., Moura, E.P., Pimentel, V.M., Sampaio, W.M., Silva, S.M., Schettini, D.A., Alves,
657 C.F., Melo, F.A., Tafuri, W.L., Demicheli, C., Melo, M.N., Frezard, F., Michalick, M.S.M.,
658 2008. Reduced Tissue Parasitic Load and Infectivity to Sand Flies in Dogs Naturally
659 Infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following Treatment with a Liposome
660 Formulation of Meglumine Antimoniate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2564–2572.
- 661 Rodríguez, A., Solano-Gallego, L., Ojeda, A., Quintana, J., Riera, C., Gállego, M., Portús, M.,
662 Alberola, J., 2006. Dynamics of *Leishmania* -Specific Immunoglobulin Isotypes in Dogs
663 with Clinical Leishmaniasis before and after Treatment. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 495–498.
- 664 Rodríguez, N.E., Wilson, M.E., 2014. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol.*

- 665 Res. 59, 129–41.
- 666 Rolão, N., Cortes, S., Rodrigues, O.R., Campino, L., 2004. Quantification of leishmania
667 infantum parasites in tissue biopsies by real-time polymerase chain reaction and polymerase
668 chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Parasitol.* 90, 1150–1154.
- 669 Saridomichelakis, M.N., 2009. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis:
670 epidemiologic and diagnostic implications. *Vet. Dermatol.* 20, 471–489.
- 671 Silva, J.P. da, Werneck, G.L., Macedo, E.C., Carvalho, H. de, Cruz, M. do S.P. e, 2012. Factors
672 associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of
673 Piauí, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45, 480–484.
- 674 Silva, K.R. da, Mendonça, V.R.R. de, Silva, K.M., Nascimento, L.F.M. do, Mendes-Sousa, A.F.,
675 Pinho, F.A. de, Barral-Netto, M., Barral, A.M.P., Cruz, M. do S.P. e, Silva, K.R. da,
676 Mendonça, V.R.R. de, Silva, K.M., Nascimento, L.F.M. do, Mendes-Sousa, A.F., Pinho,
677 F.A. de, Barral-Netto, M., Barral, A.M.P., Cruz, M. do S.P. e, 2017. Scoring clinical signs
678 can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. *Mem.*
679 *Inst. Oswaldo Cruz* 112, 53–63.
- 680 Solano-Gallego, L., Di Filippo, L., Ordeix, L., Planellas, M., Roura, X., Altet, L., Martínez-
681 Orellana, P., Montserrat, S., 2016. Early reduction of *Leishmania infantum*-specific
682 antibodies and blood parasitemia during treatment in dogs with moderate or severe disease.
683 *Parasit. Vectors* 9, 235.
- 684 Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M., Ferrer, L., Bourdeau, P.,
685 Oliva, G., Baneth, G., 2011. LeishVet guidelines for the practical management of canine
686 leishmaniosis. *Parasit. Vectors* 4, 86.
- 687 Torres, M., Bardagí, M., Roura, X., Zanna, G., Ravera, I., Ferrer, L., 2011. Long term follow-up
688 of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine
689 antimoniate and allopurinol. *Vet. J.* 188, 346–351.

- 690 Travi, B.L., Cordeiro-da-Silva, A., Dantas-Torres, F., Miró, G., 2018. Canine visceral
691 leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. *PLoS Negl.*
692 *Trop. Dis.* 12, e0006082.
- 693 Trópia de Abreu, R., Carvalho, M. das G., Carneiro, C.M., Giunchetti, R.C., Teixeira-Carvalho,
694 A., Martins-Filho, O.A., Coura-Vital, W., Corrêa-Oliveira, R., Reis, A.B., 2011. Influence
695 of Clinical Status and Parasite Load on Erythropoiesis and Leucopoiesis in Dogs Naturally
696 Infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *PLoS One* 6, e18873.
- 697 Weiss, D.J., 1986. Histopathology of Canine Nonneoplastic Bone Marrow. *Vet. Clin. Pathol.* 15,
698 7–11.
- 699 Yizengaw, E., Getahun, M., Tajebe, F., Cruz Cervera, E., Adem, E., Mesfin, G., Hailu, A., Van
700 der Auwera, G., Yardley, V., Lemma, M., Skhedy, Z., Diro, E., Yeshanew, A., Melkamu,
701 R., Mengesha, B., Modolell, M., Munder, M., Müller, I., Takele, Y., Kropf, P., 2016.
702 Visceral Leishmaniasis Patients Display Altered Composition and Maturity of Neutrophils
703 as well as Impaired Neutrophil Effector Functions. *Front. Immunol.* 7, 517.
704
705
706
707

CONCLUSÕES GERAIS

Os dados aqui apresentados demonstram que a medula óssea revelou estar comprometida em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*.

Cães sintomáticos naturalmente infectados por *L. infantum* apresentaram alterações mais evidentes na medula óssea quando comparado a animais assintomáticos, as alterações foram observadas nos parâmetros hematológicos com presença de anemia de diferentes tipos e graus, na avaliação histopatológica foi observada hiperplasia mieloide e conseqüentemente aumento da relação M:E e fibrose, na contagem morfométrica observou-se correlação positiva entre o número de macrófagos e a carga parasitária e na citometria de fluxo houve redução da expressão de MHCII em células CD14⁺ na medula óssea. Tais achados sugerem que as alterações se acentuam com o curso da infecção.

Na avaliação de cães naturalmente infectados com *L. infantum* e tratados com alopurinol, a terapia promoveu alterações no parâmetro hematológico com recuperação da anemia em quase totalidade dos animais avaliados. O tratamento com o alopurinol promoveu redução dos níveis séricos de imunoglobulinas da subclasse IgG sugerindo possivelmente a eficácia do protocolo terapêutico utilizado. Na análise do mielograma observou-se redução precusores mielóide com diminuição de neutrófilos enquanto que na linhagem linfocítica houve aumento de plasmócitos.

Futuros estudos devem ser conduzidos na tentativa de descobrir mecanismos adicionais que induzem as injúrias na medula óssea pela presença da *L. infantum*, na perspectiva de desenvolvimento de fármacos direcionados a reversão das alterações provocadas nesse órgão. É necessário também, um estudo a longo prazo com o alopurinol para o tratamento da leishmaniose visceral canina em populações com diferentes intensidades de manifestação da doença e a avaliação da sua ação voltada para as modificações ocorridas na medula óssea em decorrência da terapia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

ALCOLEA, P. J. et al. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1497–1516, 2010.

ALVAR, J. et al. Canine Leishmaniasis. In: **Advances in parasitology**. v. 57, p. 1–88, 2004.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. e35671.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, 2006.

AMORIM, I. F. G. et al. Toll Receptors Type-2 and CR3 Expression of Canine Monocytes and Its Correlation with Immunohistochemistry and Xenodiagnosis in Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27679, 2011.

ANDRADE, H. M. et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2–4, p. 83–90, 2011.

ANOSA, V. O.; IDOWU, A. L. The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B**, v. 30, n. 8, p. 600–608, 1983.

BANETH, G.; SHAW, S. E. Chemotherapy of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 106, n. 4, p. 315–324, 2002.

BARBIERI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329–337, 2006.

BELO, V. S. et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1–2, p. 1–13, 2013.

BERRAHAL, F. et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 55, n. 3, p. 273–277, 1996.

BOGLIOLO, L. Nova contribuição ao conhecimento da anatomia patológica da leishmaniose visceral. A propósito de um caso brasileiro e com especial referência a fibrose hepática leishmaniótica. **O Hospital** 3, v. 3, p. 101–164, 1956.

BOTELHO, A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 5, p. 503–508, 2009.

BRAZIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Ministério da Saúde**. 2006. 120p

BUSCH, K. et al. Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells in vivo. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 542–6, 2015.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 67–70, 2009.

CAVALIERO, T. et al. Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 13, n. 4, p. 330–334, 1999.

CORRÊA, A. P. F. L. et al. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3–4, p. 267–274, 2007.

CORRECTOR, A. et al. *Didelphis marsupialis*, an apparent wild reservoir of *Leishmania donovani* chagasi in Colombia, South America. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 2, p. 195, 1989.

CORTESE, L. et al. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary record**, v. 164, n. 25, p. 778–782, 2009.

COSTA-VAL, A. P. et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary journal, London**, v. 174, n. 3, p. 636–43, 2007.

COSTA, C. H. N.; PEREIRA, H. F.; ARAÚJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. **Revista de Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 361–372, 1990.

COSTA, F. A. L. The Dog as a Risk Factor in Transmission of Visceral Leishmaniasis: A Review. **Advances in Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 37–47, 2012.

COTELINGAM, J. D. Bone marrow biopsy: interpretive guidelines for the surgical pathologist. **Advances in anatomic pathology**, v. 10, n. 1, p. 8–26, 2003.

DA SILVA, S. M. et al. Efficacy of Combined Therapy with Liposome-Encapsulated Meglumine Antimoniate and Allopurinol in Treatment of Canine Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 2858–2867, 2012.

DE LUNA, R. et al. Decreased Lipid Fluidity of the Erythrocyte Membrane in Dogs with Leishmaniasis-associated Anaemia. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, n. 2–3, p. 213–216, 2000.

DEANE, L. . Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre os reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. **Rio de Janeiro: Serviço Nacional de**

Educação Sanitária, 1956.

DE OLIVEIRA, E. F. et al. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* Naturally Demonstrated for *Leishmania infantum* and Suspected for *Leishmania amazonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 1, p. 178–181, 2017.

DE TOMMASI, A. S. et al. Evaluation of blood and bone marrow in selected canine vector-borne diseases. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 534-544, 2014.

DENEROLLE, P.; BOURDOISEAU, G. Combination Allopurinol and Antimony Treatment versus Antimony Alone and Allopurinol Alone in the Treatment of Canine Leishmaniasis (96 Cases). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 5, p. 413–415, 1999.

DHINGRA, K. K. et al. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral Kala Azar: a review. **Indian journal of pathology & microbiology**, v. 53, n. 1, p. 96–100, 2010.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. L. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 1, p. 3–11, 2011.

DRUZIAN, A. F. et al. Risk Factors for Death from Visceral Leishmaniasis in an Urban Area of Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. e0003982, 2015.

FIGUEIREDO, F. B. et al. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 2, p. 200–201, 2008.

FIGUEIREDO, M. M. et al. Expression of Toll-like receptors 2 and 9 in cells of dog jejunum and colon naturally infected with *Leishmania infantum*. **BMC Immunology**, v.

14, n. 1, p. 22-34, 2013.

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

FREITAS, J. C. C. DE et al. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24–29, 2012.

FREZOULIS, P. S. et al. Canine pancytopenia in a Mediterranean region: a retrospective study of 119 cases (2005 to 2013). **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 7, p. 395–402, 2017.

GUREVITCH, O.; SLAVIN, S.; FELDMAN, A. G. Conversion of red bone marrow into yellow - Cause and mechanisms. **Medical hypotheses**, v. 69, n. 3, p. 531–6, 2007.

GANDAPUR, A. S. K. et al. DIAGNOSTIC IMPORTANCE OF BONE MARROW EXAMINATION IN HAEMATOLOGICAL MALIGNANT AND NON-MALIGNANT DISORDERS. **Journal of Ayub Medical College, Abbottabad : JAMC**, v. 27, n. 3, p. 692–694, 2015.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 23–30, 2011.

GUERRA, J. A. O. et al. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil: aspectos clínicoepidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 4, p. 305–311,

2004.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of Leishmania with the host macrophage. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332–334, 2002.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.

HAZNEDAROGLU, I. C. et al. Thrombopoietin as a Drug: Biologic Expectations, Clinical Realities, and Future Directions. **Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis**, v. 8, n. 3, p. 193–212, 2002.

HUMBERG, R. M. P. et al. Leishmania chagasi in opossums (Didelphis albiventris) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 87, n. 3, p. 470–472, 2012.

IKEDA-GARCIA, F. A. et al. Avaliação hematológica de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi submetidos a tratamento com antimoniato de meglumina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. supl., p. 68-74, 2008.

JERONIMO, S. M. et al. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 4, p. 386–8, 1994.

KEENAN, C. M. et al. Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. II. Pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 80–86, 1984.

KING, K. Y.; GOODELL, M. A. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 10, p. 685–692, 2011.

KONDO, M. et al. BIOLOGY OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS AND PROGENITORS : Implications for Clinical Application. **Annual Review of Immunology**, v. 21, n. 1, p. 759–806, 2003.

KOUTINAS, A. F. et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary parasitology**, v. 98, n. 4, p. 247–261, 2001.

KUMAR, P. V. et al. Visceral Leishmaniasis: Bone Marrow Biopsy Findings. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 29, n. 2, p. 77–80, 2007.

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

LAURENTI, M. D. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.

LEAL, G. DE A. G. et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 472–482, 2014.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n.83, 2012.

MACHADO-COELHO, G. L. et al. American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. **International journal of epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 982–989, 1999.

MAIA, C. et al. Experimental canine leishmaniasis: Clinical, parasitological and

serological follow-up. **Acta Tropica**, v. 116, n. 3, p. 193–199, 2010.

MANCIANTI, F. et al. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 566–567, 1988.

MAPA MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota Técnica conjunta, nº 001/2016**, 2016.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, 2013.

MAUËL, J. Macrophage-parasite interactions in Leishmania infections. **Journal of leukocyte biology**, v. 47, n. 2, p. 187–93, 1990.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of Leishmania chagasi. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 16, n. 5, p. 188–189, 2000.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MENEZES-SOUZA, D. et al. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 39–49, 2011.

MESTRE, G. L. DA C. et al. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 228–234, 2011.

MIRÓ, G. et al. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniasis. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 397–404, 2009.

MIRÓ, G. et al. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 52-59, 2011.

MOMO, C. et al. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Medicine International**, v. 2014, 150582, 2014.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.

NICOLATO, R. DE C. et al. Clinical Forms of Canine Visceral Leishmaniasis in Naturally *Leishmania infantum*-Infected Dogs and Related Myelogram and Hemogram Changes. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82947, 2013.

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 213–232, 2005.

OLIVEIRA, E. F. DE et al. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005401, 2017.

ORKIN, S. H.; ZON, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 631–644, 2008.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510–517, 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; DAY, M. J. One Health: the global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 197, 2011.

PAOLA, S. et al. CORRELATION OF THE MORPHOMETRIC CHANGES IN KIDNEY AND BONE MARROW IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH *Leishmania* sp. **Compendio de Ciencias Veterinarias**, v. 6, n. 1, p. 11–16, 2016.

PAPARCONI, R. et al. Sternal Aspiration of Bone Marrow in Dogs: A Practical Approach for Canine Leishmaniasis Diagnosis and Monitoring. **Journal of veterinary medicine**, v. 2013, p. 217314, 2013.

PETANIDES, T. A. et al. Factors Associated with the Occurrence of Epistaxis in Natural Canine Leishmaniasis (*Leishmania infantum*). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 866–872, 2008.

PINELLI, E. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PINELLI, E. et al. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 6, p. 1594–1600, 1995.

PINELLI, E. et al. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. **Immunogenetics**, v. 49, p. 696–699, 1999.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013.

REAGAN, W. J. et al. Best Practices for Evaluation of Bone Marrow in Nonclinical Toxicity Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 39, n. 2, p. 435–448, 2011.

REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p. 98–114, 2016.

REIS, A. B. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RIBEIRO, R. R. et al. Reduced Tissue Parasitic Load and Infectivity to Sand Flies in Dogs Naturally Infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following Treatment with a Liposome Formulation of Meglumine Antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 7, p. 2564–2572, 2008.

ROATT, B. M. et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 272, 2014.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary dermatology**, v. 25, n. 2, p. 61–71, 2014.

SEVÁ, A. P. et al. Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PloS one**, v. 11, n. 7, p. e0160058, 2016.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 671–683, 1996.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285–291, 2001.

SILVA, A. R. DA et al. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina**

Tropical, v. 41, n. 4, p. 358–364, 2008.

SILVA, J. P. DA et al. Factors associated with *Leishmania chagasi* infection in domestic dogs from Teresina, State of Piauí, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 480–484, 2012.

SILVA, K. R. DA et al. Scoring clinical signs can help diagnose canine visceral leishmaniasis in a highly endemic area in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 1, p. 53–63, 2017.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* Infection in Dogs Living in an Area of Canine Leishmaniasis Endemicity Using PCR on Several Tissues and Serology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 560–563, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86-102, 2011.

SOUZA, N. P. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 333–335, 2010.

STACY, N. I.; HARVEY, J. W. Bone Marrow Aspirate Evaluation. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 47, n. 1, p. 31–52, 2017.

TEMIZ, F. et al. An association of leishmaniasis and dyserythropoiesis in children. **Indian journal of hematology & blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion**, v. 30, n. 1, p. 19–21, 2014.

Theil, K. S. Bone Marrow Processing and Normal Morphology, in **Laboratory Hematology Practice** (eds K. Kottke-Marchant and B. H. Davis), Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2012.

TOOGEH, G. et al. Visceral Leishmaniasis Presented as Myelofibrosis and Low grade lymphoma in a Sporadic Region of Iran, Report a Rare Case. **International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research**, v. 4, n. 3, p. 36–39, 2010.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. **Parasitology Research**, v. 109, n. 4, p. 1051–1057, 2011.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

TORRES, M. et al. Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. **The Veterinary Journal**, v. 188, n. 3, p. 346–351, 2011.

TRAVI, B. L. et al. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 2018.

TRAVLOS, G. S. Histopathology of Bone Marrow. **Society of Toxicologic Pathology**, v. 34, n.5, p.566-98, 2006a.

TRAVLOS, G. S. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 548–565, 2006b.

TRÓPIA DE ABREU, R. et al. Influence of Clinical Status and Parasite Load on Erythropoiesis and Leucopoiesis in Dogs Naturally Infected with Leishmania (Leishmania) chagasi. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e18873, 2011.

ULCHAR, I.; CELESKA, I.J.; STEFANOVSKA, A. J. Hematological and Biochemical parameters in symptomatic and asymptomatic leishmania-seropositive dogs. **Original Scientific Article Mac Vet Rev**, v. 38, n. 2, p. 175–182, 2015.

VIADANNA, P. H. O. et al. Relationship Between Blood-borne Parameters and Gross Lesions in *Leishmania chagasi* Seroreagents Dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 3, p. 207–213, 2017.

VIANNA, G. Comunicação à Sociedade Brasileira de Dermatologia. **Arq. Bras. Med.**, v. 2, p. 426, 1912.

VINCENT, I. M. et al. Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 2, p. 20–27, 2014.

VOULDOUKIS, I. et al. Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 137–146, 2006.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de saude publica**, v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. v. 92, n. 92, p. 557–572, 2017.

WILKINS, B. S. Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology. I. **Journal of clinical pathology**, v. 45, n. 8, p. 645–9, 1992.

XAVIER, S. C. et al. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 944–1000, 2006.

YAMAGUCHI, T. et al. Properties of the strongly immobilized signal observed in spin-labeled erythrocytes. **Biochimica et biophysica acta**, v. 736, n. 2, p. 150–156, 1983.

YASUR-LANDAU, D. et al. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004341,

2016.

ZARETSKY, A. G.; ENGILES, J. B.; HUNTER, C. A. Infection-Induced Changes in Hematopoiesis. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 1, p. 27–33, 2014.

ZULUETA, A. M. et al. Epidemiologic aspects of American visceral leishmaniasis in an endemic focus in Eastern Venezuela. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 6, p. 945–950, 1999.

APÊNDICE

Termo de Doação de Animal para Pesquisa

Eu, _____ nacionalidade _____
_____, natural de _____, estado civil _____, profissão
_____, residente e domiciliado à
_____ nº _____,
Bairro _____, CEP _____, portador da cédula de identidade nº
_____, CPF nº _____, declaro que concordo com a
doação do animal identificado abaixo, com diagnóstico sorológico/parasitológico positivo para
leishmaniose visceral, para a Universidade Federal do Piauí, para que o mesmo seja utilizado no
projeto de pesquisa "**Alterações na medula óssea de cães com leishmaniose visceral:
um estudo clínico-patológico**" que tem como objetivo caracterizar as alterações
histopatológicas da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum* em
diferentes estágios clínico da doença, sob responsabilidade da médica veterinária/doutoranda
Dayane Francisca Higino Miranda.

Dados de Identificação do Animal:

Nome do Animal e/ou Número de Registro (tatuagem, microchip, brinco).....

Espécie:..... Raça:.....

Pelagem:.....Sexo:.....

Data de Nascimento:

_____, ____ de _____ de 20__

Assinatura do responsável pela doação

Testemunhas:

Nome / CPF

Nome / CPF

FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA (LVC)

DATA: _____ NOME DO ANIMAL/Nº _____

CARACTERÍSTICAS DO ANIMAL _____ -

SEXO: _____ RAÇA _____ IDADE: _____ PESO: _____

ESTADO GERAL: ATIVO () APÁTICO () **ECTOPARASITAS:** PULGAS () ; CARRAPATOS () ; OUTROS ()

ESTADO NUTRICIONAL	CLASSIFICAÇÃO			OBSERVAÇÕES
	NORMAL (0)	MAGRO (1)	CAQUETICO (2)	
PELAGEM	BOM-ÓTIMO (0)	REGULAR (1)	RUIM (2)	
UNHAS	NORMAIS (0)		AUMENTADAS (1)	
LINFONODOS	NORMAIS (0)	APENAS 1 PAR (1)	MAIS DE 1 PAR (2)	SUB MANDIBULARES () PRE ESCAPULARES () POPLÍTEOS ()
COLORAÇÃO DAS MUCOSAS	NORMAIS (0)	PÁLIDAS (1)	CONGESTAS (2)	
LESÃO DE FOCINHO	AUSENTE (0)	PRESENTE (1)	ÚLCERAS (2)	
DESPIGMENTAÇÃO DO FOCINHO	AUSENTE (0)		PRESENTE (1)	
LESÃO NO LÁBIO	AUSENTE (0)	PRESENTE (1)	ULCERAS (2)	
DESPIGMENTAÇÃO DO LÁBIO	AUSENTE (0)		PRESENTE (1)	
LESÃO PONTA DE ORELHA	AUSENTE (0)	PRESENTE (1)	ULCERAS (2)	
DERMATITE ESFOLIATIVA	AUSENTE (0)	LOCALIZADA (1)	GENERELIZADA (2)	
SECREÇÃO OCULAR	AUSENTE (0)	SEROSA-MUCOSA (1)	MUCO PURULENTO (2)	
AREAS DE ALOPECIA	AUSENTE (0)	1 AREA (1)	MAIS DE 1 AREAS (2)	
BLEFARITE	AUSENTE (0)		PRESENTE (1)	
SANGRAMENTO	AUSENTE (0)		PRESENTE (1)	
TOTAL DE PONTOS				

DPP:

Parasitológico:

Cinomose:

Erliquiose:

ANEXO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

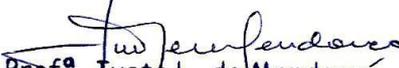


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "**Caracterização dos macrófagos estromais e sua participação nas alterações patológicas na medula óssea de cães infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum***", protocolo nº 101/15, sob a responsabilidade de **MARIA DO SOCORRO PIRES E CRUZ**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 27/11//2015.

Vigência do Projeto	Dezembro/ 2015 à Fevereiro/ 2018
Espécie/Linhagem	Canino/ Raça
Nº de Animais	15
Peso/ Idade	7-30 Kg/ 3-6 anos
Sexo	Macho ou fêmea
Origem	Gerência de Zoonoses de Teresina-GEZON; Hospital Veterinário Universitário- HVU (UFPI).

Teresina, 27 de Novembro de 2015.


Prof^a. Ivete L. de Mendonça
Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
Coordenadora