

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

PEDRO PAULO DE ABREU TELES

**Distúrbios mieloproliferativos associados ao estadiamento clínico da Leishmaniose
Canina (LCan)**

Belo Horizonte

2023

Pedro Paulo de Abreu Teles

**Distúrbios mieloproliferativos associados ao estadiamento da Leishmaniose Canina
(LCan)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Geral da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Doutor em Patologia investigativa.

Orientador: Prof Wagner Luiz Tafuri.

Co-orientadora: Profa Fabiola de Oliveira Paes Leme

Belo Horizonte

2023

T269d Teles, Pedro Paulo de Abreu.
Distúrbios Mieloproliferativos associados ao estadiamento clínico da Leishmaniose Canina (LCan) [recursos eletrônicos]. / Pedro Paulo de Abreu Teles. -- Belo Horizonte: 2023.
56f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Wagner Luiz Tafuri.
Coorientador (a): Fabíola de Oliveira Paes Leme.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Defeitos do Tubo Neural. 2. Leishmania. 3. Medula Óssea. 4. Anemia. 5. Dissertação Acadêmica. I. Tafuri, Wagner Luiz. II. Leme, Fabíola de Oliveira Paes. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WL 101

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N° 461 DE PEDRO PAULO DE ABREU TELES

Realizou-se, no dia 03 de março de 2023, às 14 horas, formato remoto, Plataforma Teams, a defesa de Tese, intitulada **"DISTÚRBIOS MIELOPROLIFERATIVOS ASSOCIADOS AO ESTADIAMENTO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC)"**, apresentada por **Pedro Paulo de Abreu Teles**, número de registro **2018707889**, graduado no curso de Medicina Veterinária, e como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Márcia Dalastra Laurenti**, USP; **Prof. Vitor Marcio Ribeiro**, PUC; **Prof. Ricardo Toshio Fujiwara**, ICB/UFMG; **Prof. Ricardo Gonçalves**, ICB/UFMG; **Profa. Fabiola de Oliveira Paes Leme**, Escola Veterinária/UFMG – **COORIENTADORA**; **Prof. Wagner Luiz Tafuri**, ICB/UFMG – **ORIENTADOR**.

A Comissão considerou a Tese:

APROVADO

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 03 de março de 2023.

*** De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.**



Documento assinado eletronicamente por **Wagner Luiz Tafuri**, Professor do Magistério Superior, em 09/03/2023, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Toshio Fujiwara**, Professor do Magistério Superior, em 09/03/2023, às 17:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vitor Marcio Ribeiro**, Usuário Externo, em 09/03/2023, às 19:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Gonçalves**, Professor do Magistério Superior, em 14/03/2023, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcia Dalastra Laurenti**, Usuário Externo, em 16/03/2023, às 11:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 21/03/2023, às 13:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2112940** e o código CRC **9AC8395C**.

RESUMO

A resposta imunológica nos diversos compartimentos linfóides é uma ferramenta útil no estudo da progressão da leishmaniose canina (LCan). A medula óssea (M.O.), órgão linfóide primário é responsável pela manutenção das células das linhagens eritróides, mielóides, linfóides e plaquetárias. É um dos locais de predileção para a multiplicação de formas amastigotas de *Leishmania* spp que podem conduzir a mudanças ultraestruturais nesse órgão, de acordo com a progressão da doença. Na LCan a M.O. geralmente é avaliada somente acerca de seu parasitismo. O presente trabalho teve como objetivo associar os achados da histologia, imunohistoquímica (IHQ) de M.O. e mielograma ao estadiamento clínico da LCan proposto pelo grupo de estudo em leishmaniose animal, Brasileish. Trinta e seis cães sorologicamente positivos para LCan foram incluídos no grupo estudo retrospectivo (GR) para a avaliação histológica e de IHQ de pele de orelha e M.O. No estudo prospectivo, sessenta e quatro cães adultos com suspeita de LCan passaram por avaliação clínica e tiveram amostras biológicas coletadas para investigação de LCan *in vivo*. Foram realizadas análises sorológicas (ELISA), moleculares de M.O (PCR) e parasitológicas de M.O. (citologia) além de hemograma e bioquímica sérica. Do GR na histologia de M.O. displasias megacariocíticas e/ou emperiopolese foram observadas em 17/36 (47,2%), eritrofagocitose histiocítica em 9/36 (25%), hipoplasia medular em 3/36 (8,3%), displasia eritróide 3/36 (8,3%) e presença de células epitelióides multinucleadas 1/36 (2,8%). Na IHQ de M.O. 34/36 (97,2%) foram positivas e na IHQ de pele 12/13 (92,3%). Do estudo prospectivo foram sorologicamente positivos 59/64 (92,2%). Foram confirmados o diagnóstico molecular em 48/64 (75%) e o parasitológico em 39/64 (60,9%). A anemia estava presente em 47/64 (73,4%), leucocitose em 14/64 (21,9%), leucopenia em 3/64 (8,8%), trombocitose em 23/64 (35,9%) e trombocitopenia em 5/64 (7,8%). Enquadravam-se nos estadiamento 0 (controle negativo) 5/64 (7,8%), I 5/64 (7,8%), II 26/64 (37,5%), III 20/64 (31,3%), IV 4/64 (6,3%) e V 4/64 (6,3%). Nas condições em que este experimento foi conduzido, e na amostra selecionada, pode-se concluir que as alterações do mielograma pelo estadiamento LCan refletem na contagem periférica de hemácias e leucócitos. Aqui demonstramos pela primeira vez que o RETIC pode ser usado como um biomarcador da progressão da LCan seguindo as diretrizes BRASILEISH. A eosinopenia e a monocitopenia podem atuar como biomarcadores de LCan grave.

Palavras chave: Mielodisplasia, *Leishmania*, Estadiamento clínico.

ABSTRACT

The immune response in the various lymphoid compartments is a useful tool in the study of the progression of canine leishmaniasis (CanL). The bone marrow (B.M.), the primary lymphoid organ, is responsible for maintaining the cells of the erythroid, myeloid, lymphoid and platelet lineages. It is one of the preferred sites for the multiplication of amastigotes of *Leishmania* spp that can lead to ultrastructural changes in this organ, according to the progression of the disease. In CanL the B.M. it is generally evaluated only for its parasitism. The present study aimed to associate the findings of histology, immunohistochemistry (IHC) of B.M. and myelogram for the clinical staging of CanL proposed by the Study Group on Animal Leishmaniasis, BRASILEISH. Thirty-six dogs serologically positive for CanL were included in the retrospective study group (RG) for histological and IHC evaluation of ear skin and B.M. In the prospective study, sixty-four adult dogs with suspected CanL underwent clinical evaluation and had biological samples collected for investigation of CanL *in vivo*. Serological (ELISA), B.M. molecular (PCR) and B.M. parasitological analyzes were carried out (cytology) in addition to hemogram and serum biochemistry. From the RG in the histology of B.M. megakaryocytic dysplasias and/or emperipolesis were seen in 17/36 (47.2%), histiocytic erythrophagocytosis in 9/36 (25%), marrow hypoplasia in 3/36 (8.3%), erythroid dysplasia 3/36 (8.3%) and presence of multinucleated epithelioid cells 1/36 (2.8%). At the IHC of B.M. 34/36 (97.2%) were positive and in the skin IHC 12/13 (92.3%). From the prospective study, 59/64 (92.2%) were serologically positive. The molecular diagnosis was confirmed in 8 48/64 (75%) and the parasitological diagnosis in 39/64 (60.9%). Anemia was present in 47/64 (73.4%), leukocytosis in 14/64 (21.9%), leukopenia in 3/64 (8.8%), thrombocytosis in 23/64 (35.9%) and thrombocytopenia in 5/64 (7.8%). They were classified in stage 0 (negative control) 5/64 (7.8%), I 5/64 (7.8%), II 26/64 (37.5%), III 20/64 (31.3 %), IV 4/64 (6.3%) and V 4/64 (6.3%). Under the conditions in which this experiment was conducted, and in the selected sample, it can be concluded that changes in the myelogram by LCan staging reflect on the peripheral count of erythrocytes and leukocytes. Here we demonstrate for the first time that RETIC can be used as a biomarker of CanL progression following the BRASILEISH guidelines. Eosinopenia and monocytopenia can act as biomarkers of severe CanL.

Keywords: Myelodysplasia, *Leishmania*, Clinical staging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vascularização da medula óssea.....	14
Figura 2: Histologia da medula óssea.....	15
Figura 3: Hematopoiese	17
Figura 4: Mielograma da LCan – Diff Quick.....	21
Figura 5: DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos.	34
Figura 6: K39-KDDR.....	35
Figura 7: Testes rápidos.	36
Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos de medula óssea (M.O.) vermelha de cães do grupo retrospectivo (GR) coradas em HE.....	40
Figura 9: Fotomicrografias de imuno-histoquímica de medula óssea (M.O.) e pele de cão do grupo retrospectivo (GR)	41
Figura 10: Fotomicrografia de citologia de medula óssea (M.O.) de cão do Estudo prospectivo corada em Panótico.....	43
Figura 11: Comparação das médias das variáveis do hemograma pelo estadiamento.....	45
Figura 12: Comparação das variáveis do mielograma para as diferentes fases.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais citocinas hematopoiéticas – CSF (TRAVLOS, 2006 traduzido e adaptado).....	16
Tabela 2: Estadiamento da LCan – (GRUPO DE ESTUDO EM LEISHMANIOSE ANIMAL 2018).....	39
Tabela 3: Achados histológicos e imuno-histoquímicos do estudo retrospectivo.....	41
Tabela 4 – Resultados positivos para <i>Leishmania infantum</i> nos testes sorológicos, parasitológicos e moleculares.....	42
Tabela 5 - Estadiamento da LCan e relação M:E.....	43
Tabela 6 – Resultados da correlação de Spearman entre as variáveis do hemograma e mielograma e os estadiamentos (em negrito as variáveis cuja correlação foi significativa).....	44
Tabela 7 - Comparação das médias das variáveis do hemograma por estadiamento	46
Tabela 8 – Medianas (mínimo – máximo) das variáveis do hemograma por Estadiamento.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%BASO	Percentual de basófilos.
%EOS	Percentual de eosinófilos.
%LYM	Percentual de linfócitos.
%MON	Percentual de monócitos.
%NEU	Percentual de neutrófilos.
%RETIC	Percentual de reticulócitos.
ALB	Albumina sérica.
ALB/GLOB	Fração albumina/globulina séricas.
ALKP	Fosfatase alcalina sérica.
ALT	Alanina transaminase sérica.
Ac	Anticorpos
BASO	Número absoluto de basófilos.
BUN	Nitrogênio ureico no sangue.
BUN/CREA	Fração uréia/creatinina sanguínea.
CN	Cães negativos.
CP	Cães positivos.
CREA	Creatinina sérica.
CFU	Unidade formadora de colônia.
CSF	Fatores estimuladores de colônia.
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético.
ELISA	Imunoabsorbância ligada a enzima.
EOS	Número absoluto de eosinófilos.
GLOB	Gobulina sérica.
GLU	Glicose sérica.
GR	Grupo retrospectivo.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio.
HE	Hematoxilina e eosina.
HGB	Hemoglobina.
HCT	Hematócrito.
ICB	Instituto de Ciências Biológicas.
LCan	Leishmaniose canina.
LIGP	Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos.
LPL	Laboratório de Patologia das Leishmanioses.
LYM	Número absoluto de linfócitos.

LV	Leishmaniose visceral
MCHC	Concentração hemoglobínica globular média.
MCV	Hemoglobina globular média.
MCV	Volume globular médio.
M:E	Relação mielóide eritróide.
M.O.	Medula óssea.
MONO	Número absoluto de monócitos.
NBF	Formalina neutra tamponada.
NEU	Número absoluto de neutrófilos.
PBS	Tampão fosfato salino 0,01M pH 7,2 à 0,01M
PCT	Plaquetócrito.
PCR	Reação em cadeia da polimerase.
PDW	Amplitude de variação do tamanho das plaquetas.
PLQ	Número total de plaquetas.
PUC	Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa.
RDW	Amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos.
RET-He	Teor de hemoglobina dos reticulócitos.
RETIC	Número total de reticulócitos.
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta.
SAHV	Santo Agostinho Hospital Veterinário.
SDMA	Dimetilarginina simétrica.
SFM	Sistema fagocítico mononuclear.
TP	Proteínas totais séricas.
UCRE	Creatinina urinária.
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais.
UPC	Fração proteína/creatinina urinária.
UPRO	Proeína urinária.
VPM	Volume plaquetário médio.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
	1.1 Leishmaniose visceral	13
	1.2 Manejo da LCan.....	13
	1.3 M.O.	14
	1.4 M.O. na LCan	19
	1.5 Biomarcadores da progressão da LCan.....	21
	1.5.1 Hematologia	22
	1.5.2 Bioquímica	22
	1.5.3 Sorologia	23
	1.5.4 Análise molecular.	23
	1.5.5 Histopatologia e imuno-histoquímica.....	23
	1.5.6 Estadiamento da LCan.....	24
2.	JUSTIFICATIVA	25
3.	OBJETIVO	26
	3.1 Objetivos específicos.....	26
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	27
	4.1 CAPÍTULO 1 – Estudo retrospectivo.....	27
	4.2 CAPÍTITULO 2 – Estudo experimental.....	29
	4.2.1 Cães.....	29
	4.2.2 Atendimento clínico.....	29
	4.2.3 Coleta de amostras biológicas.....	29
	4.2.3.1 Sangue Periférico.....	30
	4.2.3.2 M.O.....	30
	4.2.3.3 Biópsia de pele.....	30
	4.2.4 Processamento	31
	4.2.4.1 Hematologia.....	31
	4.2.4.2 Bioquímica sérica	32
	4.2.4.3 Mielograma e citologia de M.O.	33
	4.2.4.4 Biologia Molecular (PCR de M.O. e pele)	33
	4.2.4.5 Sorologia.....	33
	4.2.4.6 Diagnósticos diferenciais.....	37
	4.2.4.7 Histologia.....	37
	4.2.4.8 Imuno-histoquímica.....	38
	4.2.5 Estadiamento.....	38
	4.2.6 Análise estatística.....	38
5.	RESULTADOS	40
	5.1 CAPÍTULO 1.....	41
	5.1.1 Histologia.....	40
	5.1.2 IHQ	41
	5.2 CAPÍTULO 2.....	42
	5.2.1 Diagnóstico sorológico, parasitológico, molecular, imuno-histoquímico e estadiamento da LCan.....	42
	5.2.2 Hematologia	43
	5.2.3 Mielograma	46
	5.2.4 Bioquímica sérica.....	48
6.	DISCUSSÃO	50

7. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica e se não tratada leva o indivíduo a morte. É de caráter zoonótico sendo considerada mundialmente como uma doença negligenciada que nas Américas é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum*. Os cães atuam como hospedeiros domésticos da LV por albergarem parasitas na pele, fonte do repasto sanguíneo dos vetores flebotomíneos (DEANE 1950; . A leishmaniose visceral canina, atualmente mencionada como LCan, ocorre após a picada do inseto vetor, fêmea do gênero *Lutzomyia*, que inocula as formas promastigotas flageladas e móveis de *L. infantum* na pele desse hospederiro vertebrado durante o respato sanguíneo. Imediatamente as formas promastigotas transformam-se em formas amastigotas não flageladas altamente infectantes para as células do sistema fagocítico monocuclear (SFM). Essas formas amastigotas são as responsáveis pelo aparecimento das manifestações clínicas da doença. Dentre os órgãos mais acometidos apontam-se a pele, fígado e os órgãos linfóides tais como a medula óssea (M.O.), baço e linfonodos (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; BATES, 2007; NEUBER, 2008; LAIA SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

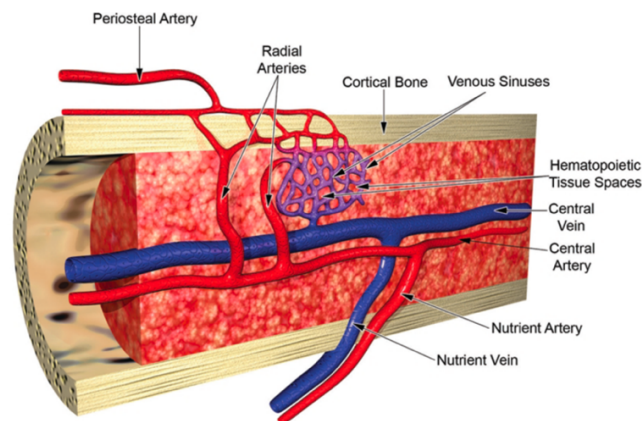
1.2 Manejo da LCan

O controle epidemiológico da LCan no Brasil baseava-se exclusivamente na eutanásia de cães sorologicamente positivos (DANTAS-TORRES et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013). A partir de 2016 deu-se início a legalização da modalidade terapêutica. Tendo em vista o aumento da expectativa de vida desses animais, novas perspectivas clínicas acerca de sua saúde estão em discussão (BRASILEISH, 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019). Os comprometimentos secundários à carga parasitária na LCan exigem protocolos terapêuticos que não sejam exclusivamente focados na redução da carga parasitária. De acordo com as diretrizes atualmente empregadas, diagnósticos secundários de nefropatias e hematopatias estão sendo comumente relacionados a LCan (MAROLI et al., 2010; LAIA SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BRASILEISH, 2018; . De fato, as alterações no sangue periférico refletem diretamente o acometimento da M.O. assim como dos linfonodos, baço e fígado. A avaliação da resposta imunológica nos diversos compartimentos linfóides é uma ferramenta útil no estudo da progressão de doenças infecciosas. Na LCan a avaliação da ultraestrutura do baço e fígado foram ricamente explorados. A M.O., órgão de onde provém todas as células que compõem o sistema imune, geralmente é avaliada somente acerca do parasitismo. Na medicina veterinária

pouco se explora a relação das mielopatias a partir do mielograma e histologia desse órgão aos achados do sangue periférico (MANZILLO et al., 2006; REIS et al., 2009; MOMO et al., 2014).

1.3 Medula óssea

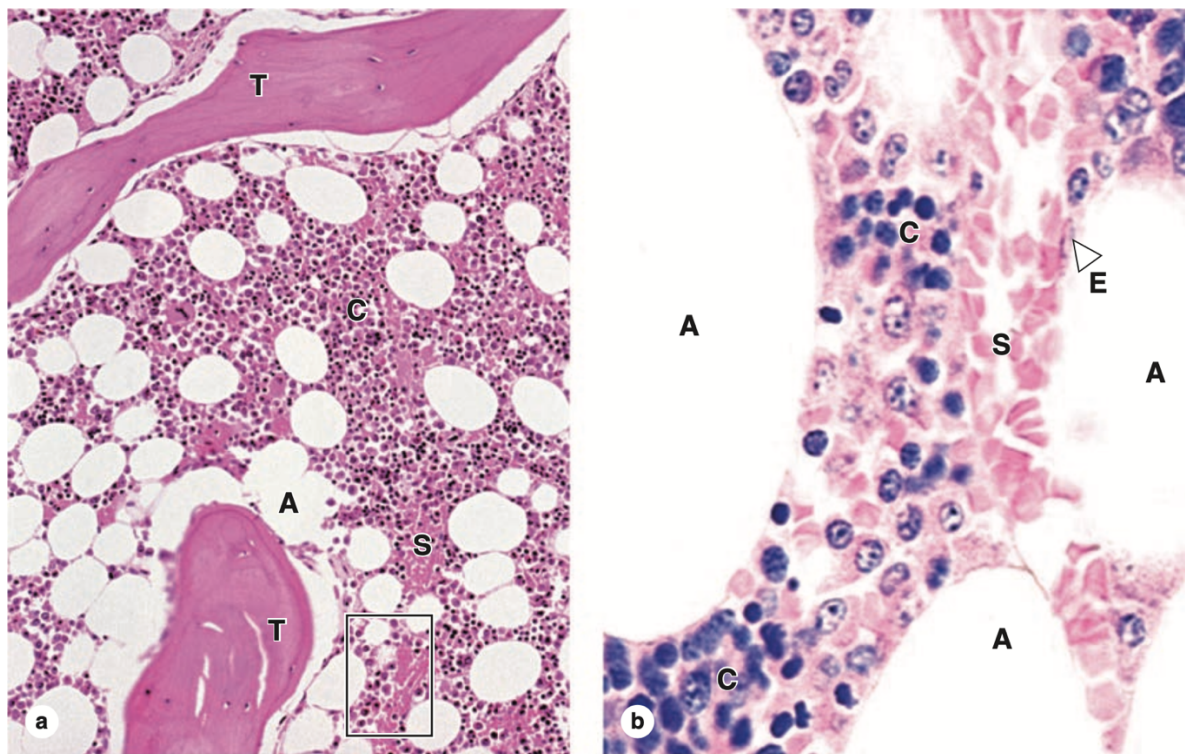
A M.O. é um órgão linfóide primário e dentre suas diversas funções realiza a manutenção das células das linhagens eritróides, mielóides, linfóides e plaquetárias do organismo. Assim como o baço é um órgão de predileção para o estabelecimento e multiplicação das formas amastigotas da *L. infantum* (MANZILLO et al., 2006; TRAVLOS, 2006; MOMO et al., 2014). Representa cerca de 2% do peso corporal dos cães e encontra-se situada na região medular de ossos longos e nas cavidades de ossos axiais, constituída por M.O. vermelha, hematogena e M.O. amarela, composta por adipócitos (TRAVLOS, 2006). O tecido medular é ricamente vascularizado, conforme demonstrado na figura 3, vasos arteriais nutrientes atravessam obliquamente a região cortical de ossos longos alcançando a região medular. Essas artérias se bifurcam em ramos ascendentes e descendentes longitudinalmente a veia central medular. Arteriolas radiais conduzem o sangue para regiões sinusóides de anastomose que por sua vez drenam o sangue para a veia central que segue rumo a veia nutriente deixando assim a região medular, passando pela cortical para a circulação sistêmica (TRAVLOS, 2006).



Fonte: TRAVLOS (2006).

Figura 1: Vascularização da medula óssea. Artérias nutrientes atravessam a região cortical de ossos longos obliquamente em direção ao canal medular. A artéria se ramifica em ramo ascendente e descendente paralelamente a veia central. Arteriolas sofrem anastomoses e o sangue é drenado em direção a veia central que deixa a M.O. pelas veias nutrientes.

A M.O. vermelha constitui-se de cordões hematopoiéticos, capilares sinusóides e estroma de tecido conectivo reticular. Os cordões hematopoiéticos contêm as células tronco sanguíneas, células reticulares, células da barreira adventícia, macrófagos e adipócitos. Essas células encontram-se sobre o tecido conectivo reticular que é a matriz extracelular de colágeno do tipo I e III, fibronectina, laminina, tenascina, trombospondina, vitronectina, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e hemonectina. Apesar do posicionamento randômico das células na M.O. existe certa afinidade de membrana a algumas moléculas como a hemonectina, além de interação célula-célula formando nichos ou microrregiões que favorecem o desenvolvimento de linhagens sanguíneas específicas (TRAVLOS, 2006; MESCHER, 2018). A organização histológica da M.O. pode ser visualizada na figura 4.



Fonte: MESCHER (2018).

Figura 2: Histologia da medula óssea - H&E. (a) Corte histológico de M.O. evidenciando a trabécula de osso esponjoso (T), adipócitos (A), sinusóides repletos de sangue (S), cordões hematopoiéticos (C). Aumento de 40x. (b) Detalhe em maior aumento da área circunstrita em (a), evidenciando o núcleo achatado de célula endotelial sinusóide (E), adipócitos (A) e cordões hematopoiéticos (C).

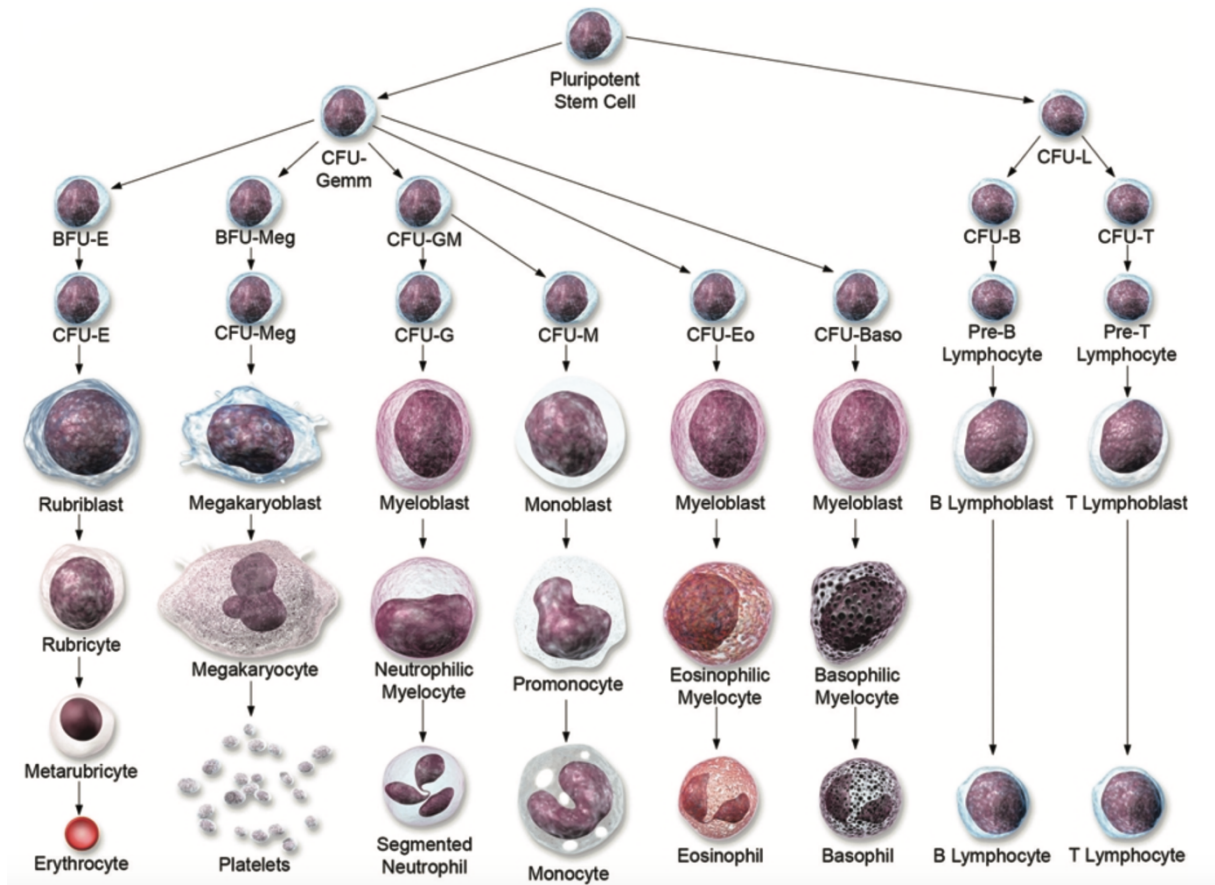
A hematopoiese se dá a partir de uma célula tronco pluripotente cujas funções são manter sua população pelo processo de auto renovação e de originar todas as linhagens das células sanguíneas. O desencadeamento da divisão e a diferenciação dessas células relacionam-

se aos fatores estimuladores de colônia (CSF), citocinas oriundas de diversas células e órgãos, conforme exibido na Tabela 1 GASPER, 2000; ABOUD; LICHTMAN, 2001; TRAVLOS, 2006).

Tabela 1: Principais citocinas hematopoiéticas - CSF (TRAVLOS, 2006 traduzido e adaptado)

Estimulação de células pluripotentes
Fator de células tronco (SCF)
Interleucina 6 (IL-6)
Eritropoiese
Eritropoietina (EPO)
Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF)
Hormônio da tireoide
Hormônio do crescimento
Testosterona
Granulopoiese
GM-CSF
Granulocitopoiética (G-CSF)
Interleucina 1 (IL-1)
Interleucina 3 (IL-3)
Interleucina 5 (IL-5)
Eosinofilopoiética
Basofilopoiética
Interferon (INF)
Fator de necrose tumoral (TNF)
Monocitopoiese
GM-CSF
Fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF)
Monocitopoiética
IL-3
Linfopoiese
Hormônio tímico
Fator mitogênico de linfócitos
Fator de crescimento de linfócitos B
Fator de diferenciação de linfócitos B
IL-1
Interleucina 2 (IL-2)
IL-3
Interleucina 4 (IL-4)
Megacariocitopoiese
M-CSF
Trombocitopoiética

Células presentes na M.O produzem CSF, como os macrófagos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e linfócitos. Sobre seu estímulo a partir da célula tronco pluripotente haverá diferenciação para as células da unidade formadora de colônia (CFU) eritrocítica, megacariocítica, granulocítica e monocítica e para as células da CFU linfóide, conforme exemplificado na figura 5 (MESCHER, 2018; TRAVLOS, 2006; WEISS & GEDULDIG, 1991).



Fonte: (TRAVLOS, 2006)

Figura 3: Hematopoiese – Diferenciação e maturação celulares. A célula tronco pluripotente sofre ação dos fatores estimuladores de colônia (CSF), dando origem as unidades formadoras de colônia granulocítica, eritrocítica, monocítica e megacariocítica (CFU-Geem) e as unidades formadoras de colônia linfóides (CFU-L).

A eritropoiese ocorre a partir da CFU eritrocítica, que por estímulos de CSF produzem células precursoras - também chamadas de células blásticas - por divisões mitóticas sendo elas o rubriblasto, pró-rubricito, rubricito e metarrubricito. A partir dessa fase as células não sofrem mais mitoses mas continuam se maturando em reticulócitos e eritrócitos (MESCHER, 2018). Esse processo leva cerca de sete dias para se completar e é interdependente dos mediadores químicos e da organização espacial dos cordões hematopoiéticos. Na M.O. a eritropoiese ocorre nas denominadas ilhas eritroblásticas constituídas de macrófagos centrais (“macrófagos nurse”) que expressam moléculas de adesão para facilitar a interação com os eritroblastos. Os macrófagos encontram-se circunscritos de cinco a trinta anéis de células eritrocitárias em diferentes estágios de maturação. Eles fornecem o microambiente ideal para maturação eritrocitária através do fornecimento de CSF, deposição de ferro a partir da ferretina e enucleação do metarrubricito para formação de reticulócitos (EGGOLD & RANKIN, 2020; MESCHER, 2018; OVCHYNNIKOVA et al., 2018). Os “macrófagos nurse”, juntamente com

os macrófagos da polpa vermelha do baço e as células de Kupffer no fígado auxiliam nos mecanismos de controle da eritropoiese e da homeostase dos níveis de ferro no organismo. Esse processo é mediado pelo hormônio hepcidina, produzido no fígado (Grotto, 2008; Sukhbaatar & Weichhart, 2018).

A migração eritrocitária dos cordões hematopoiéticos para a luz dos sinusóides medulares ocorre de forma passiva, através da pressão exercida pelas numerosas células maduras produzidas, contra o endotélio vascular (MESCHER, 2018;).

O microambiente trombopoético da M.O. é organizado a partir de nichos anatomofuncionais distintos, como o osteoblástico e o nicho vascular. A trombopoese ocorre a partir da CFU megacariocítica por ação de CSF gerando migração das células blásticas do nicho osteoblástico para o nicho vascular. Neste originam-se os megacarioblastos que posteriormente se diferenciam em megacariócitos que posicionam-se sobre o endotélio de sinusóides medulares e criam projeções adjacentes à luz vascular denominadas proplaquetas que são posteriormente fragmentadas em milhões de fragmentos lançados na microvasculatura medular as denominadas plaquetas (CALVI et al., 2003; GEDDIS, 2010; JUNT et al., 2007; KAUSHANSKY, 2015).

A leucopoiese medular pode ser dividida na granulopoiese, monocitopoiese e linfopoiese. A granulopoiese ocorre por estímulo das CSF que inicialmente diferenciam as CFU em granulocíticas, eosinofílicas e basofílicas que podem ser identificadas no microambiente da M.O. por inserções de cordões de células granulopoiéticas granulares. O próximo estágio de maturação é o mieloblasto, indistinguível dentre as três linhagens granulocíticas. As fases seguintes de maturação serão os mielócitos, fase essa já diferenciada para cada linhagem celular: mielócito basófilo, mielócito eosinófilo e mielócito neutrófilo, que após a maturação darão origem, respectivamente, aos basófilos, eosinófilos e neutrófilos, sendo estes as principais células produzidas na linhagem granulocítica e seu tempo de produção e maturação varia de 10 a 12 dias. Após maduros, os granulócitos migram de forma ativa pelo endotélio dos sinusóides medulares em direção a microvasculatura da M.O (MESCHER, 2018; TRAVLOS, 2006).

A monocitopoiese decorre a partir da CFU monocítica, sendo que morfologicamente o denominado monoblasto não se diferencia do mieloblasto, quem origina a partir da próxima fase da maturação os promonócitos que por sua vez originam monócitos após divisão mitótica (MESCHER, 2018). A linfopoiese se dá a partir da CFU linfóide que sofre ação das CSF

diferenciando as linhagens linfóides indistinguíveis morfológicamente que são identificadas por proteínas de membrana, as denominadas classe de diferenciação (*cluster differentiation - CD*). A CFU linfóide dará origem aos linfócitos CD56, também conhecidos como Natural Killer. Ainda, a CFU linfóide dará origem a pré-linfócitos B e T em seguida a linfoblastos B e T que, após a diferenciação, darão origem aos linfócitos B e linfócitos T. Nos mamíferos os linfócitos B sofrem maturação na M.O. antes de alcançarem a corrente sanguínea. Já os linfócitos T sofrerão maturação no timo, órgão linfóide primário responsável pelos processos de seleção positiva e negativa com liberação dos linfócitos T CD4 e CD8 maduros para os órgãos linfóides secundários (MESCHER, 2018).

1.3 Medula óssea. na leishmaniose visceral canina

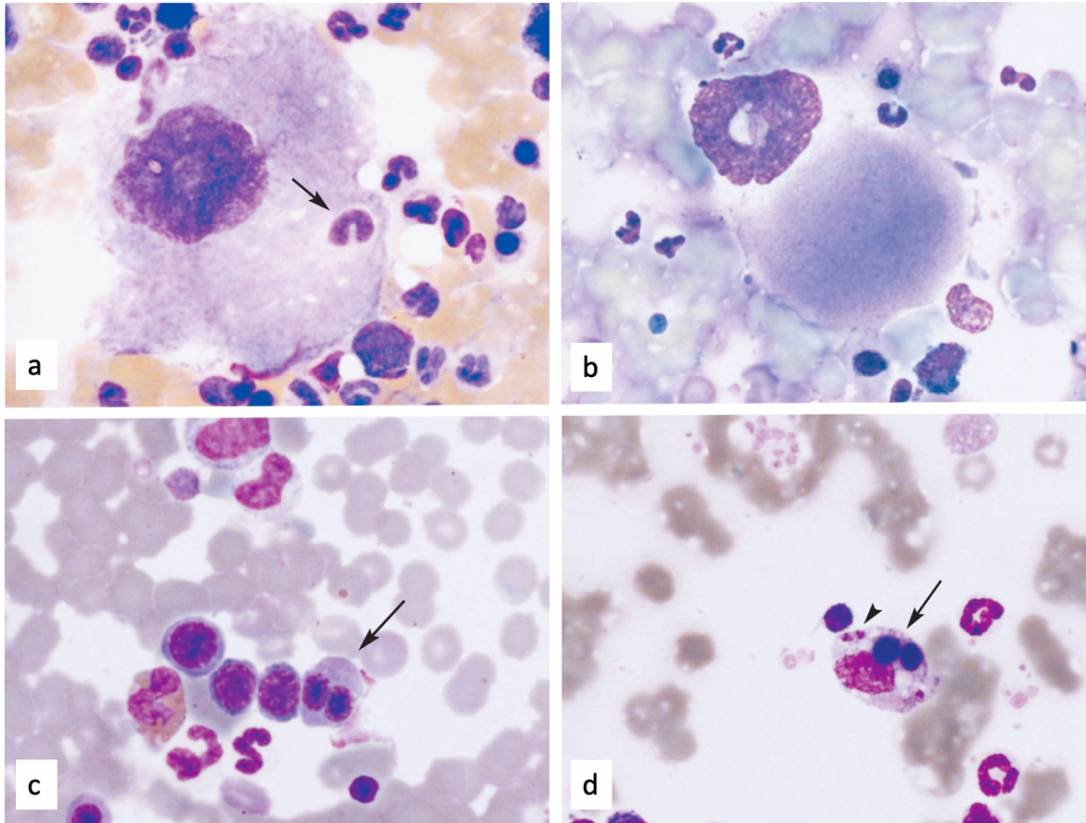
Análises histológicas de M.O. na LCan demonstram que pode ocorrer processo inflamatório crônico granulomatoso e infiltrado plasmohistiocitário. Há substituição do parênquima medular das porções de cordões hematopoiéticos por macrófagos ativados, por vezes apresentando formas amastigotas de *L. infantum* em seu citoplasma (MANZILLO et al., 2006; MOMO et al., 2014). Tais alterações resultam em hipoplasia das linhagens hematopoiéticas. Podem haver displasias eritropoiéticas (diseritropoiese), displasias megacariocíticas e eritrocitárias e emperiopolese pode ser observada no citoplasma de células gigantes, como megacariócitos. Em alguns casos essas alterações podem resultar em hipoplasia ou aplasia medulares. Como consequências observam-se quadros de hematopatias periféricas, dentre elas, anemia e trombopatias (MANZILLO et al., 2006; MOMO et al., 2014; WICKRAMASINGHE et al., 1987). A hemofagocitose é o processo de engolfamento eritrocitário por macrófagos em condições fisiológicas e que remove hemácias senescentes ou danificadas em órgãos como o baço, fígado e medula óssea. Em quadros infecciosos pode haver hiperestimulação histiocitária nesses órgãos, levando à anemia. Além dos efeitos patológicos induzidos pela hemofagocitose a coexistência de parasitos intracelulares com hemácias fagocitadas no interior de macrófagos é benéfica para a sobrevivência das formas amastigotas (MORIMOTO et al., 2016, 2019).

A etiopatogênese da anemia da LCan é multifatorial. Os processos inflamatórios com ativação de macrófagos e consequente alteração no parênquima hepático e esplênico com hepato e esplenomegalia, somados aos fatores relacionados ao acometimento da M.O. contribuem com o quadro a partir da diseritropoiese associada a eritropoiese ineficaz e a hemofagocitose. A histiocitose com a formação de granulomas influencia negativamente na

modulação eritropoiética. O aumento da liberação de CSF pelos macrófagos do tipo TNF- α e INF- γ relacionam-se as displasias eritróides assim como as megacariocíticas (MANZILLO et al., 2006; MOMO et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

A hepcidina está particularmente associada à fisiopatogênese da anemia de doença crônica, definida como uma anemia hipoproliferativa, associada a condições infecciosas/inflamatórias como a LCan e caracterizada, laboratorialmente, por hipoferremia na presença de estoques adequados de ferro. Na LCan a ativação dos sistemas imune e inflamatório, ativa a liberação de citocinas e proteínas de fase-aguda. Isso conduz a anormalidades no metabolismo e utilização prejudicada do ferro, produção inadequada e bloqueio da resposta dos progenitores eritróides à eritropoetina, redução da sobrevivência das hemácias e proliferação e diferenciação alteradas dos progenitores eritróides. As principais citocinas envolvidas nesse processo são o INF- γ , TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10. Entre elas, a IL-6 que estimula a produção de hepcidina pelos hepatócitos. A inibição da absorção do ferro nos enterócitos e o bloqueio de liberação pelos macrófagos levam à hipoferremia que limitará a disponibilidade de ferro para a eritropoiese causando a anemia (GROTTO, 2008).

A abordagem histopatológica da M.O. *in vivo* na LCan por meio de biópsia não é bem elucidada no meio científico e nem rotineira na prática médica veterinária. A análise desse órgão ocorre a partir citologia obtida por punção aspirativa corada por panótico para realização do mielograma. Achados citológicos de M.O. na LCan relacionam-se à presença de formas amastigotas de *L. infantum* no citoplasma de macrófagos ativados, além de fornecer a relação mielóide eritróide (M:E). A elevação na relação M:E ocorre devido à hipoplasia eritróide com hiperplasia mielóide associada à hiperplasia neutrofílica. Ainda, é possível observar displasias megacariocíticas com emperipoese, displasias eritropoiéticas e eritrofagocitose em macrófagos, conforme visualizado na figura 6 (de ABREU et al., 2011; MANZILLO et al., 2006; NICOLATO et al., 2013).



Fonte: (MANZILLO et al., 2006 – traduzido e adaptado)

Figura 4: Mielograma na LCan - Diff Quick. (a) Emperipoese megacariocítica de neutrófilo bastonete (seta). Aumento de 1000x. (b) Displasia megacariocítica com deslocamento extracelular do núcleo. Aumento de 1000x. (c) Displasia eritróide com mitose atípica eritroblástica (seta). Aumento de 1000x. (d) Eritrofagocitose histocítica em macrófago (seta) contendo formas amastigotas de *Leishmania spp.* no citoplasma (cabeça de seta).

1.4 Biomarcadores da progressão da LCan

Os sinais clínicos na LCan não necessariamente correlacionam-se com a carga parasitária nos tecidos ou órgãos. Não existe nenhum teste com 100% de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da LCan, sendo, portanto, necessário a associação da avaliação clínica aos métodos sorológicos, moleculares e parasitológicos. Uma vez diagnosticado o cão, deve-se realizar o tratamento objetivando-se a melhora clínica e sua retirada do ciclo epidemiológico pela consequente diminuição da carga parasitária cutânea (DANTAS-TORRES et al., 2019; BRASILEISH, 2018; RIBEIRO et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Diversos comprometimentos secundários a progressão da LCan no organismo devem ser monitorados pelos clínicos. Dentre as principais organopatias associadas a LCan encontram-se a insuficiência renal aguda e a insuficiência renal crônica (RIBEIRO et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Todavia, biomarcadores laboratoriais auxiliam na condução médica na LCan a partir de achados diretos e indiretos que se relacionam ao estado clínico do animal. Diante da dificuldade da padronização da clínica do paciente associada aos biomarcadores, diversos grupos de pesquisa propuseram o estadiamento da LCan. A associação de exames hematológicos, bioquímicos, sorológicos, moleculares e parasitológicos e o estado do cão como não infectado e sadio, exposto, infectado sadio e infectado doente permitem o estadiamento da LCan (RIBEIRO et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

Nesse trabalho serão apresentadas avaliações do estadiamento clínico da LCan e da análise sistemática da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Para tal, avaliaram-se os seguintes exames: hemograma, bioquímica sérica, sorologia, análise molecular de M.O., histologia de pele e de M.O., imuno-histoquímica de pele e M.O. e mielograma.

1.4.1 Hematologia

O hemograma é o exame laboratorial de escolha para se avaliar as células sanguíneas a partir de amostras de sangue total (CELKAN, 2020). A alteração no eritrograma predominante da LCan é a anemia normocítica normocrômica, do tipo não regenerativa (LAIA SOLANO-GALLEGO et al., 2011). A anemia na LCan é multifatorial, decorrendo da doença inflamatória crônica, hemorragia, hemólise, doença renal crônica, hipoplasia e aplasia da M.O. e redução da fluidez lipídica da membrana eritrocitária. No leucograma ocorre leucocitose ou leucopenia. O plaquetograma pode evidenciar trombopatias, relacionadas à trombocitopenia ou à trombocitose (AMUSATEGUI et al., 2003; DE ABREU et al., 2011; DE LUNA et al., 2000; REIS, A. B. et al., 2006; RIBEIRO et al., 2013; LAIA SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

1.4.2 Bioquímica sérica e urinária

A análise bioquímica é utilizada na mensuração de biomarcadores, tendo como exemplo, os de função renal, hepática e das proteínas a partir de amostras de soro ou plasma. Na LCan podem ser observadas hiperproteinemias associadas à hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia com redução da razão albumina/globulina. A azotemia, elevação dos níveis de ureia e creatinina, pode estar presente como também a elevação das enzimas hepáticas acima dos intervalos de referência. A partir de amostras de urina, análises bioquímicas são capazes de aferir a fração das proteínas urinárias que podem encontrar-se elevadas, sugerindo dano renal precoce (proteína/creatinina urinária) quando não associado à doença do trato urinário inferior. Essa verificação se dá a partir da urinálise (CIARAMELLA et al., 1997; da

COSTA-VAL et al., 2007; de FREITAS et al., 2012; MAROLI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2013).

1.4.3 Sorologia para o diagnóstico de LCan

A pesquisa de anticorpos (Ac) IgG anti- *Leishmania spp* através das técnicas sorológicas são essenciais na tentativa diagnóstica e auxiliam no estabelecimento do prognóstico do paciente. Essas análises podem ser qualitativas, com o uso de testes rápidos no consultório como os imunocromatográficos ou tipo ELISA, usados como triagem investigativa. A performance desses testes (sensibilidade/especificidade) são variáveis existindo o risco de falso negativo nos animais com baixa titulação. Quando positivos, os testes requerem complementação de sorologia quantitativa pois pode haver positividade em animais expostos mas não doentes, cabendo a interpretação do clínico. Testes sorológicos quantitativos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) acima de 1:160 em consonância com a imunoadsorção ligada a enzima (ELISA), quando pelo menos duas vezes superior ao valor de *cut-off*, podem auxiliar no diagnóstico da LCan. No RIFI e ELISA, amostras de soro com baixa titulação de anticorpos necessitam complementação com outros exames como os parasitológicos e moleculares. Ainda, a possibilidade de reações cruzadas com hemoparasitoses, como por exemplo a erliquiose, nos testes sorológicos podem trazer dificuldade diagnóstica (RIBEIRO et al., 2013, 2019; LAIA SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

1.4.4 Análise molecular para o diagnóstico de LCan

O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) convencional ou em tempo real quantitativa (qPCR) eleva a sensibilidade e especificidade do diagnóstico da LCan por permitir a detecção do DNA da *Leishmania spp* e geralmente é utilizada em amostras de tecidos linfóides (M.O., linfonodos e baço), além da pele. Os resultados moleculares não revelam o estado imunológico dos pacientes. Assim não recomenda-se o uso isolado da PCR para o diagnóstico pois não seria possível diferenciar a infecção da doença. Raramente, resultados falso positivos decorrem de contaminação de DNA amostral. (RIBEIRO et al., 2013; LAIA SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

1.4.5 Histopatologia e imuno-histoquímica para o diagnóstico de LCan

A histologia de fragmentos coletados por biópsia de pele de orelha, corados por hematoxilina e eosina (HE) pode fornecer o diagnóstico parasitológico a partir da visualização

de formas amastigotas de *L. infantum*, além de achados clássicos na derme como infiltrados inflamatórios do tipo plasmohistiocitário. A histologia de M.O. corada por HE, assim como a pele, pode conduzir ao diagnóstico parasitológico e achados da arquitetura desse órgão podem auxiliar na compreensão das consequências da LCan. O uso da imuno-histoquímica (IHQ) aumenta a sensibilidade da detecção do agente a partir da imunomarcação das formas amastigotas de *L. infantum* (MOMO et al., 2014; LAIA SOLANO-GALLEGO et al., 2011).

1.4.6 Estadiamento da LCan

O estadiamento clínico para a LCan foi proposto por diversos grupos de estudo. Até o momento existem sete propostas com variações no que diz respeito às legislações vigentes para cada país, relacionadas aos protocolos terapêuticos de possível emprego das mesmas (AMUSATEGUI et al., 2003; BRASILEISH, 2018; CIARAMELLA et al., 1997; FOGLIA MANZILLO et al., 2013; MANCIANTI et al., 1988; MAROLI et al., 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2009).

Diante dessa realidade, o presente trabalho baseará o estadiamento de acordo com as diretrizes do Brasileish (BRASILEISH, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Considerado um órgão ricamente habitado por células do SFM, a M.O. nos casos de LCan pode apresentar-se altamente parasitada. Investigações de formas amastigotas são rotineiramente realizadas a partir de esfregaços de aspirados desse órgão. Entretanto, poucos estudos realizam sua análise a partir do mielograma e histologia (NICOLATO et al., 2013). A LCan é uma doença inflamatória crônica com potencial fibrosante nos tecidos linfóides. Na M.O. a histiocitose, formação de granulomas, inflamação plasmohistiocitária e eritrofagocitose relacionam-se às mielodisplasias que refletem em anemia do tipo não regenerativa e trombopatias (MOMO et al., 2014). Na medicina, achados de mielodisplasia nos pacientes com leishmaniose visceral corroboram com pior prognóstico da doença e dificuldade de resposta aos protocolos terapêuticos adotados (KUMAR et al., 2007).

Nossa hipótese é que os achados histológicos e citológicos da M.O. em cães naturalmente infectados com *L. infantum* possam ser associados ao estadiamento da LCan como fator preditor da gravidade da doença e da definição do prognóstico do paciente a partir dos achados associados. Para tal essa pesquisa abordou dois estudos, um retrospectivo (acervo) e outro prospectivo.

3. OBJETIVO

Verificar a presença de displasias medulares de cães naturalmente infectados com *L. infantum*, abordando a histologia e a citologia da M.O. costal visando sua correlação com o estadiamento da LCan.

3.1 Objetivos específicos

- Amostras teciduais de M.O. costal emblocadas em parafina do acervo do Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL) para realização de estudo retrospectivo referente à histologia, imuno-histoquímica e biologia molecular;
- Dados clínicos (anamnese) de cães suspeitos de LCan para estudo prospectivo;
- Amostras de sangue (sorologia, hematologia, bioquímica sérica), aspirado e biópsia de M.O. (mielograma) e biópsia de pele (biologia molecular).
- Realizar estadiamento clínico dos animais confirmados com LCan a partir dos resultados obtidos;
- Realizar análise citológica da M.O. considerando a relação M:E e o estadiamento da LCan e presença de mielopatias que possam refletir ou não nas alterações eritrocitárias, leucocitárias e trombocíticas no sangue periférico;
- Avaliar a influência de comorbidades aos distúrbios mielodisplásicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O LPL – localizado no Departamento de Patologia Geral/UFMG tem como principal linha de pesquisa os aspectos clínicos, anátomo-patológicos, parasitológicos e imunológicos da LCan e, historicamente a obtenção de material biológico para experimentação animal decorre em estrita observância aos princípios adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG). De acordo com o § 4º, art. 5º da Lei 21.970, de 15 de janeiro de 2016, que proíbe a entrega de cães e gatos recolhidos por órgãos públicos para instituições federais e estaduais de pesquisa ou apresentação em evento de entretenimento, o LPL adequou-se à modalidade de pesquisa com a valorização de seu acervo pra estudos retrospectivos e para os prospectivos, com o uso de amostras colhidas *in vivo* diante da autorização do tutor responsável pelo animal – termo de anuência.

A obtenção de amostras de M.O. costal para a realização da histologia e imuno-histoquímica de M.O. não é rotina *in vivo* em animais com LCan. No LPL esse material era obtido a partir das necrópsias. Assim, a abordagem sistemática da M.O. será realizada em dois capítulos. O primeiro capítulo consiste na análise histológica e imuno-histoquímica da M.O. de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. No segundo capítulo é feita investigação *in vivo*, da citologia de M.O. de acordo com o estadiamento da LCan.

4.1 CAPÍTULO 1 – Estudo retrospectivo

O material do estudo retrospectivo originou-se do acervo do LPL. Foram incluídos quarenta e seis cães em um único grupo identificado como estudo retrospectivo (ER). Todos os cães do ER eram sorologicamente positivos nos testes DPP® e ELISA.

As amostras de fragmento de costela e de pina de orelha coletadas à necropsia ficaram imergidas em formol 10% por pelo menos 48 horas para fixação do tecido. Após esse período seguiu-se a descalcificação dos fragmentos de osso costal por imersão em ácido nítrico à 1% durante 48 horas que, em sequência, foram lavados em água corrente. Os fragmentos de pele e a M.O. foram processados e incluídos em parafina. Quarenta e seis blocos de parafina foram confeccionados contendo fragmento de medula óssea costal e outros treze contendo fragmento de pele de cães naturalmente infectados por *L. infantum*. Assim, cortes de 4µm dessas M.O. e pele foram realizados com o auxílio de micrótomo (RM2255 Rotary Microtome Leica®) e

corados pelas técnicas rotineiras de histologia, com Hematoxilina-Eosina (HE) e montados em lâminas gelatinizadas para imuno-histoquímica.

Para a realização da imuno-histoquímica os cortes histológicos foram desparafinados em xilol e hidratados em soluções decrescentes de álcool durante três minutos em cada (dois banhos em álcool absoluto, álcool 90%, 80% , 70%) seguido de três minutos de hidratação em água destilada. Após dois banhos de cinco minutos em tampão fosfato salino 0,01M pH 7,2 à 0,01M (PBS) foram incubados em solução para bloqueio da peroxidase com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 vv à 4% em de PBS durante 30 minutos, seguido de dois banhos em PBS. Posteriormente inubou-se por 30 minutos em banho de leite (12 gramas de leite em pó diluído em 200ml de PBS) para bloqueio de sítios inespecíficos seguidos de dois banhos de PBS. A solução do anticorpo primário consistiu na associação de PBS e soro fetal bovino à 0,1% a qual o soro hiperimune de cão naturalmente infectado por *Leishmania* fica diluído na concentração de 1:50. Com o auxílio de micropipeta monocanal volume fixo 20 µl (Peguet®) depositaram-se 20µl do anticorpo primário sobre cada corte histológico. Em seguida houve incubação das lâminas em câmara úmida a 4°C durante 16 a 18 horas. Após a incubação, as lâminas passaram por dois banhos de 5 minutos em PBS, seguida da adição do anticorpo secundário (Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP®) sobre os cortes histológicos e incubação durante 60 minutos. Depois, foram lavadas em dois banhos de 5 minutos em PBS e, em sequência, realizada a revelação da reação por imersão, durante 5 minutos, em solução filtrada de 0,05 gramas de diaminobenzidina em 200ml de PBS somada a H₂O₂ 30 vv a 0,16%. Posteriormente as lâminas ficaram imergidas em água corrente durante 5 minutos seguidos de dois banhos de 5 minutos em PBS. Os cortes histológicos foram então contracorados com Hematoxilina de Harris durante 10 segundos e imediatamente depositados em água corrente durante 5 minutos. Desidrataram-se os cortes histológicos em soluções crescentes de álcool durante três minutos em cada (álcool 70%, 80%, 90% e dois banhos em álcool absoluto) com diafanização em xilol e montagem das lâminas com lamínula de vidro (Invicta®, Brasil), previamente limpa e desengordurada.

4.2 CAPÍTULO 2 – Estudo prospectivo

4.2.1 Cães

Para a obtenção das amostras biológicas foi realizada parceria entre o LPL e os programas de extensão Chicão e LabNewton– Projetos extensionistas, voluntários, realizados por acadêmicos do curso de Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica (PUC) de Minas Gerais e Newton Paiva, respectivamente. Os Programas atuam mensalmente no atendimento de cães da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais.

O critério de inclusão adotado foi a idade entre um e dez anos devido ao fato de que em animais adultos, em ossos longos e chatos a M.O. vermelha está em franca atividade. Não houve predileção racial ou de sexo como critério de inclusão. Adotou-se como critério de exclusão cães jovens (filhotes com menos de um ano) ou senis (com mais de 10 anos), cães sorologicamente positivos para *L. infantum* sob protocolo terapêutico e cadelas gestantes.

Os cães incluídos no estudo foram separados em dois grupos, de acordo com a triagem sorológica, sendo eles: cães negativos (CN) e cães positivos (CP). Os animais do grupo CP foram ainda estadiados de I a V de acordo com as diretrizes propostas pelo Brasileish (2018).

Esse trabalho foi aprovado pela Comitê de ética em uso de animal na experimentação-UFGM, com número de protocolo: 204/2018.

4.2.2 Atendimento clínico

Após o tutor assinar o TCLE os animais foram encaminhados para consulta médica na qual foram coletados dados clínicos dos pacientes, conforme a ficha de atendimento, seguida da coleta de amostras biológicas.

4.2.3 Coleta de amostras biológicas

Para garantir a imobilidade, os cães foram previamente anestesiados com associação de 1,0mg/Kg de Cloridrato de Xilazina (2%) (Anesedan®, Vetbrands, Brasil) e 10mg/Kg de Cloridrato de Cetamina (10%) (Ketamina Agener®, Agener União, Brasil) por via intramuscular, de acordo com Castro et al., (2018). De cada cão foram obtidas amostras de sangue periférico, M.O. e biópsia de pele de pina de orelha esquerda. As amostras colhidas a campo foram devidamente identificadas e armazenadas imediatamente após a coleta (sangue, MO, biópsia de pele e urina em caixa de isopor contendo placas de gelo reutilizáveis e amostras

citológicas em porta lâminas) e posteriormente encaminhadas para o laboratório de patologia clínica do Santo Agostinho Hospital Veterinário (SAHV).

4.2.3.1 Sangue Periférico

Dez mililitros de amostra de sangue periférico foram coletados de cada cão, através de venopunção jugular após tricotomia e antissepsia local, com o auxílio de uma seringa descartável estéril de 10ml BD® com agulha descartável estéril de calibre 22G (0.70 mm x 30 mm- BD®). Após a coleta, 2ml do sangue foram transferidos para um tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA- 10%), o qual foi imediatamente homogeneizado por meio de movimento de inversão do frasco 10 vezes conforme indicação do fabricante do aparelho processador. Outros 8 ml de sangue, sem presença de anticoagulante, foram armazenados em tubo contendo separador de soro com ativador de coágulo (sílica).

4.2.3.2 Medula óssea

O aspirado de M.O. foi obtido conforme Defarges et al., (2013). Para esse procedimento foi realizada tricotomia e antissepsia (Polivinil Pirrolidona Iodo 10%) da região alvo. O conteúdo medular foi aspirado com agulha descartável estéril de calibre 18G (1,20 mm x 40 mm-BD®), acoplada à seringa de 10ml (BD®). *Squashes* da M.O foram realizados imediatamente à coleta do aspirado sobre lamina histológica. Posteriormente, a lâmina foi então corada pela técnica de Giemsa (DA COSTA-VAL et al., 2007). O conteúdo restante do aspirado foi armazenado em tubo estéril contendo EDTA e imediatamente refrigerado em caixa térmica com gelo para posterior congelamento à -80°C.

4.2.3.3 Biópsia de pele

Biópsias de pele no ápice da face interna da orelha esquerda de cada animal foram realizadas em 13 cães, de acordo com PERLATTO et al. (2014), pois esses autores evidenciaram maior parasitismo no terço superior da orelha. Para esse procedimento houve tricotomia e antissepsia (Polivinil Pirrolidona Iodo 10%) da região alvo. Foi aplicado anestésico local (cloridrato de lidocaína 10mg/ml-1%, sem vasoconstritor-Xylestesin®, Cristália) por via subcutânea, com o auxílio de agulha descartável estéril de calibre 27G (0,38 mm x 13 mm) BD®, para formação de um “botão anestésico”. A amostra de pele foi obtida utilizando um *punch* dermatológico estéril de 5mm de diâmetro (Kolplast®) e seccionada em duas metades com o auxílio de lâmina de bisturi estéril de aço carbonon°24 (Solidor®) . Uma das amostras foi imediatamente fixada em formalina neutra tamponada (NBF) na concentração de 10% em

microtubo de 2,0 ml transparente (Eppendorf®) para análise histológica e imuno-histoquímica enquanto a outra foi armazenada em outro microtubo de 2,0 ml transparente (Eppendorf®) em caixa de isopor com gelo para posterior congelamento a -80°C para análise molecular para detecção de DNA de *Leishmania* spp.

4.2.4 Processamento

Para o processamento das amostras foi firmada parceria entre o Laboratório de Patologia Clínica do SAHV, o LPL e o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) – Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG. Na mesma data das coletas a campo, as amostras biológicas foram encaminhadas para o laboratório de patologia clínica do SAHV, para realização da hematologia, bioquímica sérica e urinária, urinálise e separação do soro. Centrifugaram-se as amostras de sangue em tubo com ativador de coágulo a 3.000 rotações por minuto durante 10 minutos, conforme procedimento operacional padrão do laboratório, em macro centrífuga (Coleman®), para separação dos componentes celulares e obtenção do soro. De cada amostra foram pipetados 4ml de soro, com o auxílio de micropipeta monocanal volume fixo 1000µl (Peguepet®) e ponteiros universais de polipropileno (Corning®), posteriormente aliqüotados em dois microtubos de centrifugação de 2,0 ml transparente (Eppendorf®), identificados com o nome do animal, tutor, data de coleta e armazenados em duas caixas organizadoras para microtubos (Kasvi®). Uma delas foi separada para as análises bioquímicas séricas no SAHV e a outra congelada juntamente com as amostras de M.O. em EDTA e pele a -20°C que foram no dia seguinte encaminhadas ao LIGP. As amostras de biópsia de pele em NBF e a M.O. para o mielograma foram separadas e enviadas no dia seguinte para o LPL.

4.2.4.1 Hematologia

O Laboratório de Patologia Clínica do SAHV realiza o hemograma com o auxílio do analisador hematológico ProcyteDx (IdeXX®) por meio das tecnologias de impedância, citometria de fluxo a laser e fluorescência óptica (IDEXX Laboratories, 2016). As amostras de sangue em tubo com EDTA foram retiradas da refrigeração em caixa de isopor e depositadas na bancada do laboratório para atingirem a temperatura ambiente, uma vez que o processamento hematológico de amostras refrigeradas pode conduzir a erros pré-analíticos, como hemólise ou agregação plaquetária. Após atingirem a temperatura ambiente do laboratório (condicionado a 21°C), foram depositadas em homogeneizador automático (IdeXX®) durante um minuto, para reconstituição dos componentes sanguíneos. Os tubos em EDTA com as amostras foram individualmente retirados do homogeneizador automático, homogeneizados manualmente por

versão total do tubo dez vezes, conforme a indicação do fabricante do ProcyteDx e, posteriormente adicionados ao analisador hematológico. No eritrograma se avaliou o número total de hemácias, hematócrito (HCT), hemoglobina (HGB), índices hematimétricos - como o volume globular médio (MCV), hemoglobina globular média (MCH) e concentração hemoglobínica globular média (MCHC) - amplitude de distribuição dos glóbulos vermelhos (RDW), percentual de reticulócitos (%RETIC) e número total de reticulócitos (RETIC) e teor de hemoglobina dos reticulócitos (RET-He). No leucograma se avaliou o número total de leucócitos com o diferencial leucocitário do percentual de neutrófilos (%NEU), linfócitos (%LYM), monócitos (%MON), eosinófilos (%EOS), basófilos (%BASO) e o número absoluto de neutrófilos (NEU), linfócitos (LYM), monócitos (MONO), eosinófilos (EOS) e basófilos (BASO). No plaquetograma avaliou-se o número total de plaquetas (PLQ), o volume plaquetário médio (VPM), amplitude de variação do tamanho das plaquetas (PDW) e plaquetócrito (PCT). Ainda, de cada amostra, obteve-se 5µl com o auxílio de micropipeta monocanal volume fixo 5µl (Peguepet®) que foi depositada em uma extremidade da lâmina de vidro (Invicta®, Brasil), previamente limpa e desengordurada e com aposição em 45 graus de outra lâmina de vidro, para a confecção de esfregaço sanguíneo por meio da distensão de todo o material até a outra extremidade da lâmina. As lâminas com os esfregaços foram identificadas e secaram à temperatura ambiente. Posteriormente foram coradas através da técnica de coloração de Romanowsky (Marshall, 1978). Os esfregaços foram utilizados para realização de hematoscopia complementar às análises realizadas pelo ProcyteDx (IdeXX®).

4.2.4.2 Bioquímica sérica

O Laboratório de Patologia Clínica do SAHV realiza a bioquímica sérica e urinária com o auxílio do analisador bioquímico Catalyst One (IdeXX®) por meio da tecnologia de bioquímica seca (IDEXX Laboratories, 2016). Nesse analisador, a análise bioquímica de cada amostra de soro é feita individualmente e pode-se realizar a leitura de cada parâmetro bioquímico de forma individual ou em pacotes pré formados pela fabricante.

No presente estudo optou-se por utilizar o pacote pré formado de análise bioquímica seca Chem 10 CLIP que contempla oito *slides* para os parâmetros bioquímicos e suas frações, sendo eles: glicose sérica (GLU), creatinina sérica (CREA), nitrogênio ureico no sangue (BUN), fração ureia/creatinina sanguínea (BUN/CREA), proteínas totais séricas (TP), albumina sérica (ALB), globulina sérica (GLOB), razão albumina/globulina séricas (ALB/GLOB),

alanina aminotransaminase sérica (ALT) e fosfatase alcalina sérica (ALKP). Além do Chem 10 CLIP, adicionou-se o slide para o parâmetro bioquímico de dimetilarginina sérica (SDMA).

4.2.4.3 Mielograma e citologia de M.O.

Para a realização do mielograma as lâminas previamente preparadas e coradas foram analisadas sob microscopia óptica. Em menor aumento, nas objetivas de 4 e 10 vezes, procurou-se observar a adequacidade da amostra: detecção da presença de espículas, sua propoção constituída por gordura, e a presença, distribuição e qualidade dos megacariócitos. No aumento de 100 vezes, com o auxílio de óleo de imersão para lâminas de microscópio (Laborclin®), realizou-se a contagem diferencial de 1000 células a partir das espículas, relacionadas às séries eritróide (rubriblastos, pró-rubricitos, rubricitos e metarrubricitos) e mielóide (mieloblastos, promielócitos, mielócitos, metamielócitos, neutrófilos bastonetes e neutrófilos segmentados). Com essa contagem foi possível obter a razão das células mielóides sobre as células eritróides (relação M:E). Houve ainda a investigação de outros tipos celulares como macrófagos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos e mastócitos.

Na avaliação citológica da M.O., formas amastigotas de *Leishmania spp* foram investigadas utilizando-se o mesmo material do mielograma onde foi realizada inspeção de todos os campos da lâmina no aumento de 100 vezes, com o auxílio de óleo de imersão (Laborclin®).

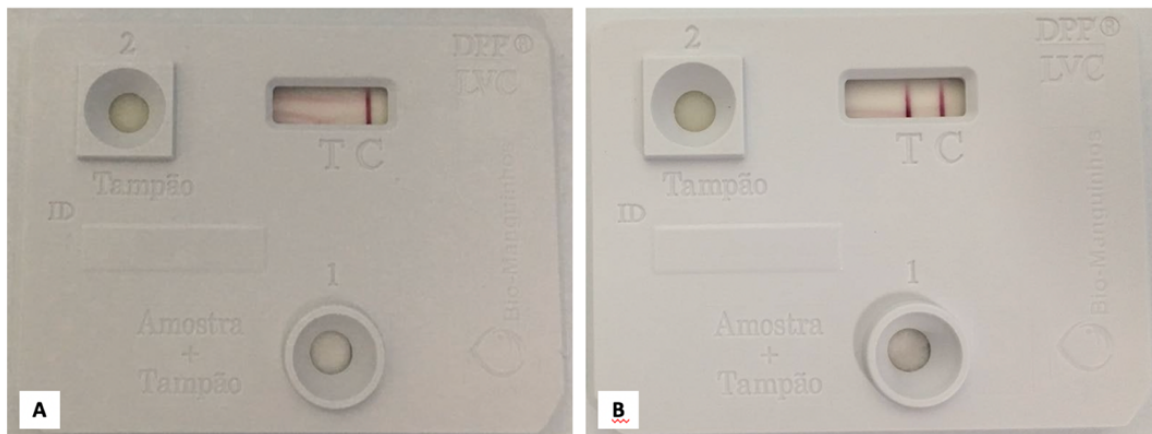
4.2.4.4 Biologia Molecular (PCR de M.O. e pele)

Inicialmente as amostras de pele e de M.O. foram retiradas do congelamento até chegarem à temperatura ambiente. Foi utilizado para extração o Kit Macherey – Nagel: Genomic DNA from tissue (Promega®) e seguido o manual do fabricante. Utilizou-se 200µl de M.O. e a amostra de pele foi previamente macerada com o auxílio de bisturi estéril de aço carbono n°24 (Solidor®) e placa de petri de vidro estéril 100x20mm (UNIGLAS®). Para a realização da PCR, seguiu-se o protocolo pré estabelecido pelo LIGP.

4.2.4.6 Sorologia

Em parceria com o LIGP e o SAHV foram obtidos três tipos de testes rápidos, sendo o DPP®, K39-KDDR e SNAP Leishmania®, para a detecção de Ac de *L. infantum* além da técnica de ELISA realizada de acordo protocolo pré estabelecido pelo LIGP.

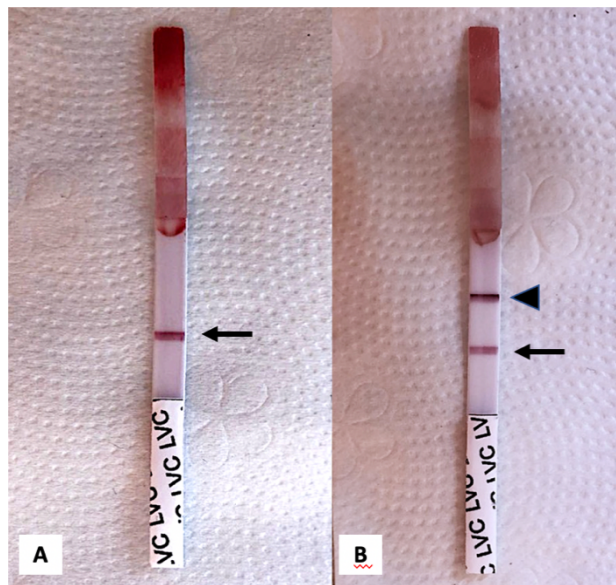
O DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos é um teste imunocromatográfico utilizado nas triagens dos serviços municipais da Secretaria de Vigilância em Saúde. Após a retirada da plataforma de teste da embalagem, utilizou-se a alça coletora para a adição de 10µl de soro na região identificada com o número 1 seguida da adição de duas gotas do tampão fornecido no teste (Figura 7). Após cinco minutos foram adicionadas quatro gotas de tampão na região identificada com o número 2. Após dez minutos realizou-se a leitura visual da plataforma. Na região indicada com a letra “C” de controle, verificou-se a formação de linha vermelha. Nas plataformas em que foram observadas marcação de linha vermelha no local indicado como “T” de teste, verificou-se positividade do animal para a presença de anticorpo para *Leishmania*.



Fonte: (Acervo pessoal)

Figura 5: DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos. A: A letra “C” aponta o controle positivo marcado na porção superior direita da plataforma. B: A letra “C” aponta o controle positivo marcado na porção superior direita da plataforma. A letra “T” a esquerda aponta o resultado do teste positivo.

O K39-KDDR é um teste em fita imunocromatográfico que utiliza o antígeno proteico recombinante K39 de *L. infantum* associado a um motivo de repetição derivada degenerada de cinesina (KDDR). Após a adição de 20µl na extremidade indicada do teste foi adicionado 20µl de tampão na mesma extremidade e aguardaram-se 20 minutos para sua leitura visual. A marcação em linha vermelha na porção proximal indica o controle positivo enquanto a marcação de linha vermelha em porção distal da fita indica resultado positivo para a presença de Ac de *Leishmania* (Figura 8).



Fonte: (Acervo pessoal)

Figura 6: K39-KDDR. A: Seta aponta o controle positivo marcado na região proximal da fita. B: Seta aponta o controle positivo marcado na região proximal da fita e cabeça de seta aponta teste marcado na região distal da fita.

O SNAP Leishmania (Idexx®) é um teste sorológico em placa do tipo ELISA rápido. Após a abertura da embalagem, utilizou-se a pipeta do tipo *Pasteur*, que vem junto ao kit, para pipetar duas gotas de soro em um *ependorf*. Seis gotas de conjugado foram adicionadas, com posterior homogeneização. Toda a solução foi adicionada no orifício receptor da amostra e percorreu a janela de resultado ao cançando o círculo de ativação. Nesse momento o ativador foi pressionado para adicionar o fluxo de lavagem bidirecional. Após oito minutos foi realizada a leitura visual na janela de resultado, sendo que na região central a marcação circular de coloração azul indicou o controle positivo. As amostras em que além do controle positivo, houve marcação circular azul à direita do controle positivo foram consideradas positivas para a detecção de Ac de *Leishmania* (Figura 9).



Fonte: (Idexx Laboratories)

Figura 7: Testes rápidos. Do lado esquerdo da figura é indicado um SNAP Leishmania®. A marcação central em azul indica o controle positivo já a marcação azul a direita, resultado positivo e a não marcação a esquerda refere-se ao controle negativo. Do lado direito da figura é indicado um Snap4Dx Plus®. A marcação no canto superior esquerdo indica o controle positivo. No canto superior direito o controle negativo. As outras marcações referem-se, no centro do teste a *Anaplasma ssp*, no canto inferior esquerdo *Ehrlichia ssp*, no canto inferior direito *Dirofilaria ssp* e na parte central inferior *Borrelia ssp*.

Na técnica de ELISA, no primeiro dia foi realizada a diluição dos soros e a sensibilização das placas. Inicialmente foi montado o mapa de trabalho e, em sequência, a diluição de 100ng do antígeno em 100µl do tampão carbonato de acordo com sua concentração. Em cada poço adicionou-se 100µl do antígeno diluído - os soros dos animais também diluídos em PBS-Tween-20 a 0,05% na proporção 1:100. As placas foram guardadas com os soros diluídos a 4°C até o momento do uso. A placa foi incubada a 4°C *overnight*. No segundo dia foi preparada a solução bloqueio (PBS-BSA 2%) e em seguida descartado o conteúdo por versão das placas e retirado o excesso por movimentos de batimento em bancada plana. Posteriormente foram adicionados 200µl de PBS-BSA 2% em cada poço seguido de incubação em temperatura ambiente durante duas horas. Após o bloqueio foi retirada toda a solução por versão das placas e retirado o excesso por movimentos de batimento em bancada plana. Nos poços foram adicionados 100µl dos soros diluídos seguido de incubação a temperatura ambiente por uma hora e trinta minutos a 37°C. As placas foram posteriormente lavadas cinco vezes com solução PBS-Tween-20 a 0,05%. Foi feita diluição dos Ac secundários em PBS-Tween-20 a 0,05% nas proporções de 1:2500 para cão. Em seguida foram adicionados 100µl do anticorpo secundário

diluído nos poços com a incubação da placa a 37°C por uma hora de trinta minutos. Durante a incubação foi preparada a solução reveladora - 0,02g OPD em tubo falcon envolto em papel alumínio adicionado de 30ml de tampão citrato mais 12 µl de H₂O₂ (ácido cítrico 0,1 M, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%). As placas foram posteriormente lavadas cinco vezes com solução PBS-Tween-20 a 0,05% com adição de 100µl da solução reveladora em cada poço. A placa foi incubada a 37 °C ao abrigo de luz, durante dez minutos. A reação foi posteriormente interrompida adicionando-se 50µl de H₂SO₄ (Ácido sulfúrico) 4 M. A leitura foi realizada no leitor ELISA a 492nm.

4.2.4.7 Diagnósticos diferenciais

Das amostras de soro foram ainda realizados testes rápidos para a detecção de Ac dos hemoparasitos *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi* e pesquisa de antígeno de *Dirofilaria immitis* a partir do Snap4Dx Plus® (Figura 9). Após a abertura do kit, com o auxílio de pipeta do tipo *Pasteur*, foram pipetadas três gotas de soro e adicionadas em *eppendorff*, seguida de quatro gotas de conjugado e posterior homogeneização. Toda a solução foi adicionada no orifício receptor da amostra e percorreu a janela de resultado alcançando o círculo de ativação. Nesse momento o ativador foi pressionado para adicionar o fluxo de lavagem bidirecional. Após oito minutos foi realizada a leitura visual na janela de resultado, sendo que, na região superior esquerda a marcação circular de coloração azul, indicou o controle positivo. As amostras em que além do controle positivo, houve marcação circular azul no canto inferior esquerdo (*Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii*), no centro (*Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys*), na porção inferior central (*Borrelia burgdorferi*) e no canto inferior a direita (*Dirofilaria immitis*), foram consideradas positivas.

Para investigação de babesiose foi realizada investigação molecular de amostra de sangue total em EDTA a partir do uso do primer Piro para a detecção de *Babesia spp* de acordo com o protocolo pré estabelecido pelo LIGP.

4.2.4.8 Histologia

As amostras de biópsia de pele em NBF permaneceram em fixação sob refrigeração a 4°C durante 48 horas e foram encaminhadas para desidratação através da imersão em banhos gradativos em álcool na concentração de 50% até o álcool absoluto. Uma vez desidratados, os tecidos foram imergidos em Xilol, utilizado como substância de transição que precedeu a

inclusão por infiltração de parafina líquida a 56 °C. Em seguida foi realizada a transferência do tecido incluído para um molde metálico de formato cúbico contendo parafina líquida para a formação do bloco de parafina com o tecido, imediatamente após a parafina ter se resfriado à temperatura ambiente. Os blocos foram encaminhados para microtomia (micrótomo rotativo semi-automático-Zeiss) para obtenção de secções de 4 micrômetros de espessura, coletadas por lâmina de vidro (Invicta®, Brasil), previamente limpa e desgordurada. As lâminas de vidro contendo o corte histológico foram novamente imergidas em xilol para remoção da parafina residual e rehidratadas em banhos gradativos de álcool, desde o absoluto até a concentração de 50%, para que fossem submetidas à coloração por HE.

4.2.4.9 Imuno-histoquímica

Para a realização da imuno-histoquímica de pele, seguiu-se o protocolo descrito no item 4.1.

4.2.5 Estadiamento da LCan

O estadiamento clínico adotado nos cães diagnosticados com LCan da fase experimental do trabalho foi realizado a partir das diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina propostas pelo Brasileish (2018). Os cães positivos foram enquadrados nos estágios I, II, III, IV ou V de acordo com a associação dos dados clínicos, resultados sorológicos, de hematologia e bioquímica sérica, conforme a Tabela 2.

4.2.6 Análise estatística

Para todas as variáveis será verificado se elas atendem os pressupostos da análise de variância ANOVA (normalidade e homocedasticidade dos resíduos). Para as variáveis que atenderem aos pressupostos serão feitas as análises por ANOVA seguida pelo pós-teste de Duncan (a escolha do Duncan é devido ao coeficiente de variação de cada variável e pelo número amostral relativamente pequeno em cada grupo). Quando a variável não atender a um dos pressupostos ou ambos, a análise comparativa será feita pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A análise de correlação entre o estadiamento e as variáveis do mielograma e hemograma será feita pelo teste de correlação de Spearman. Em todas as análises será utilizado um nível de significância $<0,05$. Os softwares escolhidos para as análises são o Software R (R Core Team, 2021) e o Infostat (Di Rienzo et al., 2020).

Tabela 2: Estadiamento da LCan - Estadiamento clínico, manejo e tratamento da LCan baseado na sorologia, sinais clínicos e achados laboratoriais.

Estádios clínicos	Sorologia ¹	Sinais clínicos	Resultados laboratoriais	Terapia ²	Prognóstico
ESTÁDIO I Sem doença	Positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico negativo	Ausentes	Sem alterações	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴	Bom
ESTÁDIO II Sem Doença / Doença leve	Negativa ou positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico positivo	Sinais clínicos ausentes a leves, como linfadenopatia periférica, dermatite papular	Geralmente sem alterações. Perfil renal normal	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina	Bom
ESTÁDIO III Doença moderada	Positiva com níveis de anticorpos baixos a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio II, além de outros como esões neas ifusas ou imétricas, onicogribose, dermatite exfoliativa, onicogribose/ulcerações, anorexia, epistaxis, febre, emagrecimento	Anemia não regenerativa leve, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais >12 g/dl) oriundos da formação de imunocomplexos, tais como uveíte e glomerulonefrite. Subestádios a) Perfil renal normal (Creatinina <1,4 mg/dl; RPC <0,5 b) Creatinina <1,4 mg/dl; RPC = 0,5-1	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da nefropatia e controle PSS	Bom a reservado
ESTÁDIO IV Doença grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio III, sinais originários de lesões por imunocomplexo s: vasculite, artrite, uveíte e glomerulonefrite	Alterações do Estádio III, além de DRC no Estádio 1 (RPC >1) ou 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl) da IRIS	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Reservado a pobre
ESTÁDIO V Doença muito grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais dos Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final	Alterações do Estádio IV, além de DRC no estágio III (creatinina 2,1-5 mg/dl) e IV (creatinina > 5 mg/dl) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria com RPC >5)	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Pobre

Abreviações: RIFI (reação de imunofluorescência indireta); DRC (doença renal crônica); IRIS (International Renal Interest Society); PSS (pressão sistêmica sanguínea); RPC (razão proteína-creatinina urinárias).

1Em cães soronegativos ou com níveis de anticorpos baixos ou médios, a infecção deve ser confirmada por meio de citologia, histologia, imuno-histoquímica e/ou PCR. Níveis altos de anticorpos (aumento de 3-4 vezes acima do ponto de corte ou cut-off pré-estabelecido de um laboratório de referência) são conclusivos para o diagnóstico da LCan (Solano-Gallego et al., 2011; Ribeiro et al., 2013).

2Monitorar a cada 4 a 6 meses com exames sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares, exames gerais para estadiamento e revisão de tratamento (Ribeiro, 2016; Leishvet, 2018).

3Imunoterapia com a vacina LeishTec: um frasco aos 0, 14 e 28 dias em animais infectados (Toepp et al., 2018) ou dois frascos nos dias 0, 21 e 42, em monoterapia ou associada ao alopurinol, com reforços semestrais (Ribeiro et al., 2013, 2017).

4Imunomodulação com domperidona: 0,5-1 mg/kg duas vezes ao dia por 30 dias (Gómez-Ochoa et al., 2009).

Fonte: (BRASILEISH, 2018).

5. RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO 1

5.1.1 Histologia de medula óssea

Das 46 amostras do ER, 36 apresentaram adequacidade para análise histológica da M.O. (Tabela 3). Dentre os principais achados, destacam-se: (1) As displasias megacariocíticas e/ou emperiopolese observadas em 17/36 (47,2%); (2) Eritrofagocitose histiocítica em 9/36 (25%); (3) Hipoplasia medular em 3/36 (8,3%); (4) Displasia eritróide 3/36 (8,3%) e (5) Células epitelióides multinucleadas 1/36 (2,8%) (Figura 8).

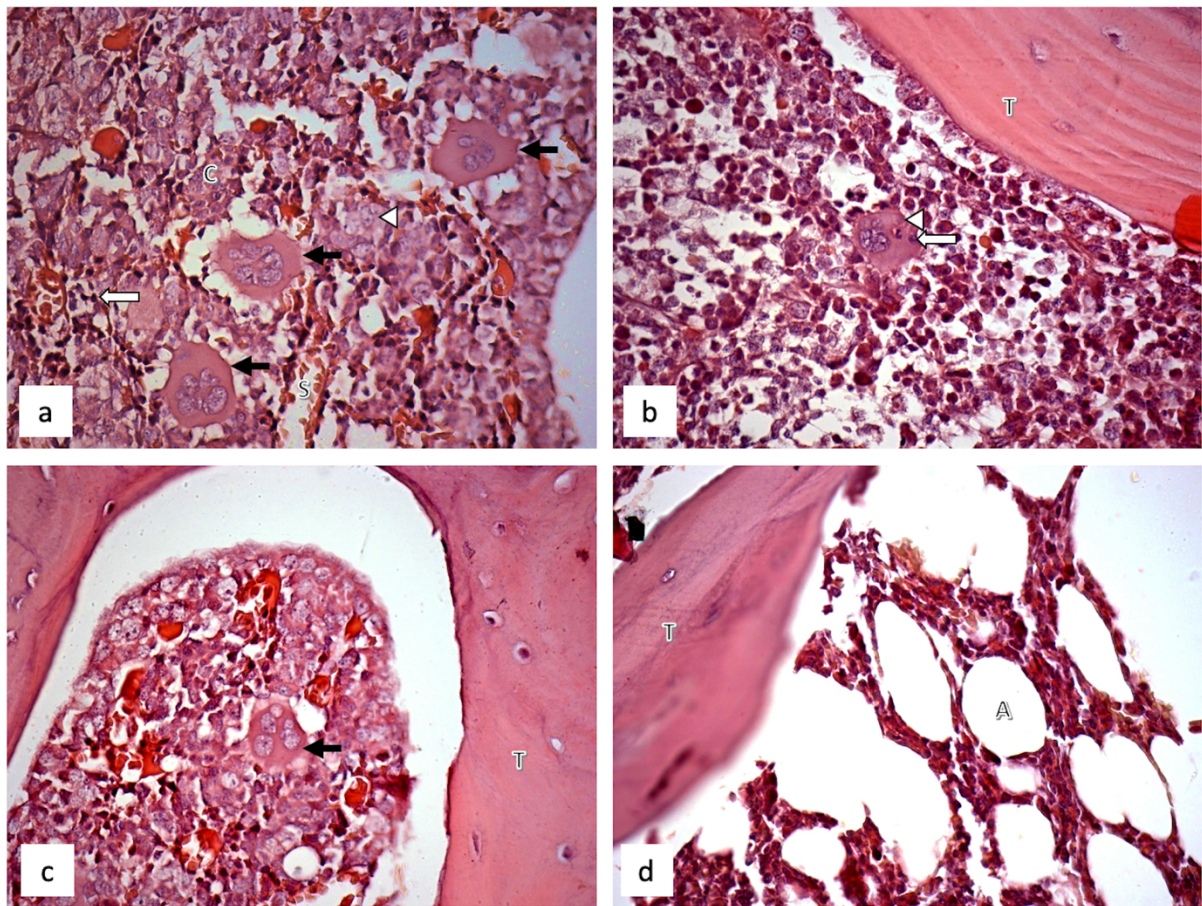


Figura 8: Fotomicrografias de cortes histológicos de medula óssea (M.O.) vermelha de cães do grupo retrospectivo (GR) coradas em HE. Aumento 400x. (a). M.O. sem alterações no parênquima. Nota-se a presença de vasos sinusóides (S) e cordões hematopoiéticos (C). Seta preta: Megacariócitos. Seta branca: Precursores eritróides. Ponta de seta branca: precursor mielóide. (b). Emperiopolese com presença de neutrófilo (seta branca) e eritrócito (ponta de seta branca) no citoplasma de megacariócito localizado no centro da imagem. É possível visualizar a direita a trabécula de osso esponjoso (T) (c). Seta preta: Displasia megacariocítica com núcleos individualizados e dispersos no citoplasma. A direita observa-se trabécula de osso esponjoso (T). (d). Hipoplasia medular evidenciada por menores concentrações de cordões hematopoiéticos e maior concentração de adipócitos (A). Observa-se trabécula de osso esponjoso (T) a esquerda.

5.1.2 IHQ

Das 46 amostras do ER, 36 apresentaram adequacidade para IHQ da M.O (Tabela 3). Foi observada a presença de formas amastigotas de *Leishmania* spp nas amostras de M.O. variando de discreta a intensa , mas positiva em 34 amostras (97,2%). As amostras de pele de orelha obtidas de 13 cães demonstraram diferentes intensidades de imunomarcção sendo que 12/13 (92,3%) foram positivos na IHQ (Figura 11).

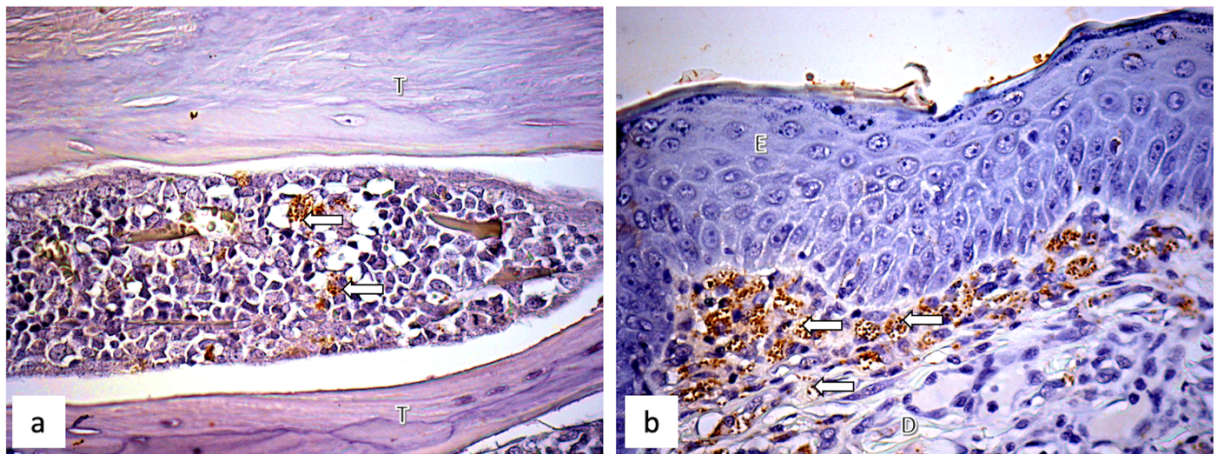


Figura 9: Fotomicrografias de imuno-histoquímica de medula óssea (M.O.) e pele de cão do grupo retrospectivo (GR). Aumento 400x. (a). M.O. do cão apresentando imunomarcção para formas amastigotas de *Leishmania* spp. (setas brancas). É possível visualizar trabécula de osso esponjoso (T) circunscrita a região. (b). Pele de orelha do cão apresentando imunomarcção para formas amastigotas de *Leishmania* spp. (setas brancas) na região da junção da derme (D) e epiderme (E).

Tabela 3: Achados histológicos e imuno-histoquímicos do estudo retrospectivo

M.O.						
Megacariócitos*	Hipoplasia	Displasia eritróide	Eritrofagocitose histiocítica	Células epitelióides multinucleadas	IHQ	IHQ PELE
17/36	3/36	3/36	9/36	1/36	34/36	12/13
47,20%	8,30%	8,30%	25%	2,80%	97,20%	92,30%

Grupo ER: Estudo retrospectivo oriundo do acervo do LPL. *Presença de displasia megacariocítica e/ou emperipoese

5.2 CAPÍTULO 2

5.2.1 Diagnóstico sorológico, parasitológico, molecular e estadiamento da LCan

Sessenta e quatro cães tiveram suas amostras de soro analisadas através dos testes rápidos DPP®, K39-KDDR, SNAP Leishmania® e ELISA para detecção de Ac de *L. infantum*. Todas as amostras de soro dos 64 animais incluídos no estudo foram analisadas pela técnica de ELISA. Ainda, dessas amostras, 33 foram utilizadas simultaneamente nos testes rápidos SNAP Leishmania®, 23 no DPP® e 23 no K39-KDDR. Foram considerados positivos em pelo menos um dos testes sorológicos 59/64 (92,18%)

Na análise citológica na M.O. foi realizada a investigação de formas amastigotas de *Leishmania spp* (confirmação parasitológica). Dos 46 cães que tiveram a M.O. analisadas, 39/64 (60,9%) obtiveram confirmação parasitológica (tabela 4). Foi possível observar inclusões basofílicas no citoplasma de macrófagos e por vezes de forma extracelular, por ruptura das células hospedeiras. Em maior detalhe nota-se que essas conformações basofílicas possuem núcleo e cinetoplasto, caracterizando-se portanto como formas amastigotas de *Leishmania* livres (Figura 12). A relação M:E apresentou-se elevada na progressão dos estadiamentos mas sem diferença estatística. No PCR foram positivos 48/64 (75%) das amostras, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados positivos para *Leishmania infantum* nos testes sorológicos, parasitológicos e moleculares

Sorologia	Diagnóstico Parasitológico	PCR
59/64 (92,18%)	39/64 (60,9%)	48/64 (75%)

Após análise criteriosa dos parâmetros clínicos, resultados de hematologia, exames bioquímicos, sorológicos, moleculares, parasitológicos e de acordo com as diretrizes do BRASILEISH (2018) foi possível estadiar os animais incluídos no estudo prospectivo (Tabela 5). Aqui, os animais negativos foram classificados como Estadiamento 0 (E0), controle negativo para LCan.

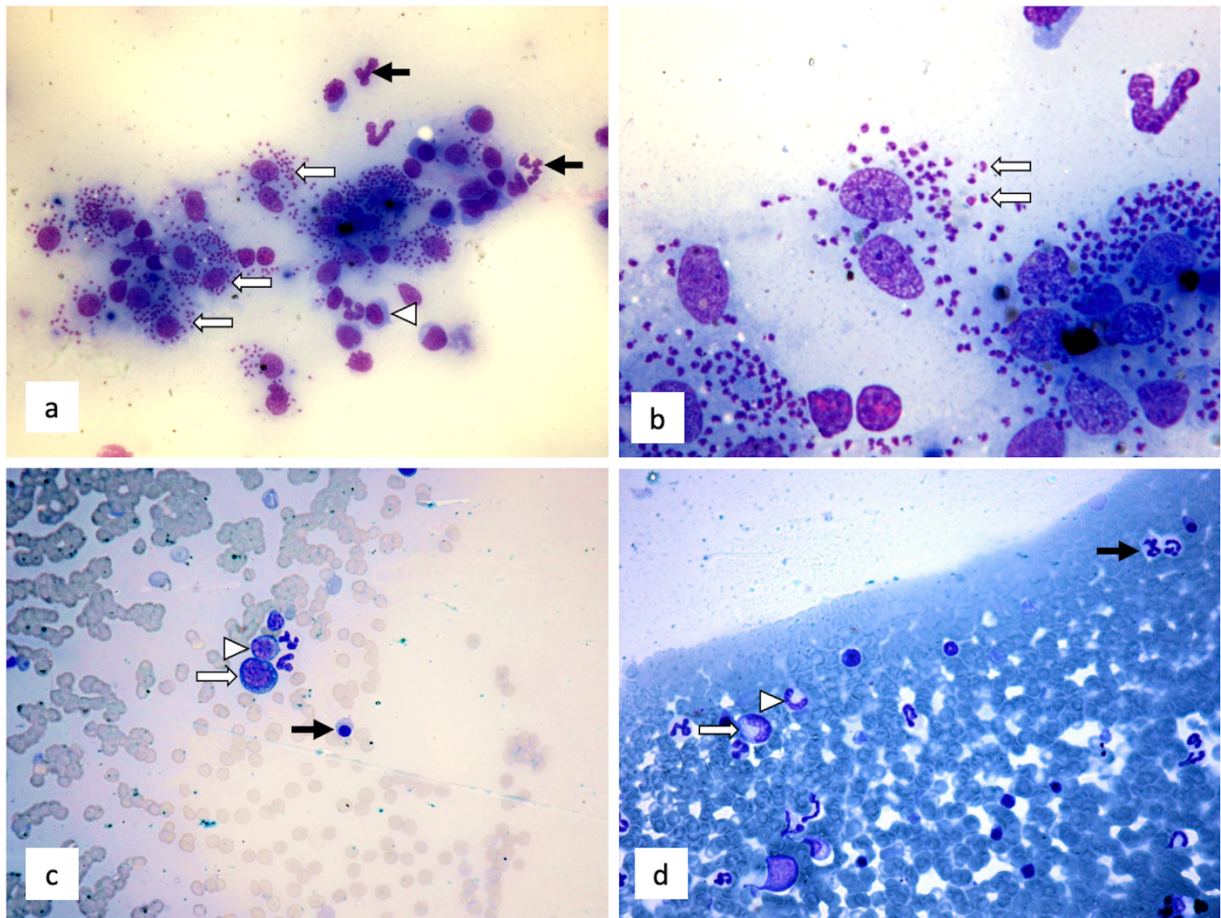


Figura 10: Fotomicrografia de citologia de medula óssea (M.O.) de cão do Estudo prospectivo corada em Panótico. Aumento 1000x. (a). M.O de cão apresentando inúmeros macrófagos contendo inclusões basofílicas em seu citoplasma (setas brancas). Dentre as outras células presentes, encontram-se células eritróides (ponta de seta branca) e mielóides (setas pretas). (b). Detalhe de (a), evidenciando incontáveis formas amastigotas de *Leishmania* no citoplasma dos macrófagos. É possível visualizar o núcleo e o cinetoplasto (setas brancas). (c). Células da linhagem eritróide. Rubriblasto (seta branca). Pró-rubricitos (ponta de seta branca). Metarrubricito (seta preta) fundo de hemácias. (d). Células da linhagem mielóide. Metamielócito (seta branca). Bastonete (ponta de seta branca). Neutrófilo segmentado (seta preta). Fundo de hemácias.

Tabela 5: Estadiamento dos cães a partir das diretrizes do Brasileish

E0 Controle Negativo	Estadiamento I	Estadiamento II	Estadiamento III	Estadiamento IV	Estadiamento V	N total
5	5	26	20	4	4	64

5.2.2 Hematologia

Ao hemograma, 47/64 (73,4%) dos cães apresentaram anemia, incluindo 2 animais do grupo controle negativo para LCan. Leucocitose foi observada em 14/64 (21,9%) e leucopenia

em 3/64 (8,8%) dos cães com LCan. Trombocitose foi observada em 23/64 (35,9%) e trombocitopenia em 5/64 (7,8%) nos cães com LCan. Houve correlação significativa entre os valores de eritrócitos, HCT, HGB, EOS, BASO, MONO e PCT com o estadiamento clínico. O valor absoluto dessas células foi inversamente proporcional à evolução do estadiamento clínico, demonstrando o potencial de evolução para anemia, eosinopenia, basopenia, monocitopenia e trombocitopenia com a evolução do estadiamento (Tabela 6). A contagem total de leucócitos não diferiu estatisticamente entre os estágios 0 a V.

Tabela 6: Resultados da correlação de Spearman entre as variáveis do hemograma e mielograma e os estadiamentos (em negrito as variáveis cuja correlação foi significativa)

	Variable	n	Spearman correlation	p-valor
Hemograma	Eritrocito	64	-0,60	<0,0001
	HCT	64	-0,59	<0,0001
	HGB	64	-0,56	<0,0001
	EOS	63	-0,48	0,0001
	%EOS	64	-0,41	0,0009
	BASO	63	-0,40	0,0012
	%BASO	63	-0,36	0,0037
	%NEU	64	0,31	0,0114
	%MONO	64	-0,30	0,0162
	MONO	63	-0,28	0,0247
	PLQ	63	-0,26	0,0421
	LYM	64	-0,23	0,0726
	RETIC1	27	-0,35	0,0745
	MCHC	64	-0,21	0,1002
	PCT	26	0,32	0,1113
	RETIC	27	-0,27	0,1699
	RET_He	27	-0,24	0,2220
	%LYM	64	-0,12	0,3459
	MCV	64	0,11	0,3778
	Leucocitos	64	-0,11	0,4006
MCH	64	-0,10	0,4210	
VPM	27	0,15	0,4507	
RDW	27	0,08	0,6872	
PDW	18	-0,08	0,7404	
NEU	64	0,04	0,7745	
Mielograma	Macrofagos	43	0,51	0,0004
	Rubricitos	43	-0,49	0,0009
	Eosinofilos	43	-0,47	0,0015
	Rubriblastos	43	-0,39	0,0102
	Segmentados	43	0,30	0,0483
	Relação M:E	43	0,29	0,0600
	Mielocitos	43	0,28	0,0685
	Promielocitos	43	0,28	0,0728
	Prorrubricitos	43	-0,25	0,1121
	Metamielocitos	43	0,20	0,2005
	Plasmocitos	43	0,18	0,2527
	Metarrubricitos	43	-0,16	0,3164
	Linfocitos	43	-0,14	0,3844
	Bastonetes	43	-0,12	0,4608
Mieloblastos	43	-0,08	0,6169	

A comparação das médias das variáveis do hemograma pelo estadiamento, que atenderam aos pressupostos da ANOVA e foram submetidas a esta análise seguida do teste de Duncan,

demonstra que os seguintes parâmetros do eritrograma: HCT, HGB, RBC e RETIC não só diminuíram com a progressão do estadiamento, mas foram estatisticamente diferentes ao longo dos estágios (Figura 12).

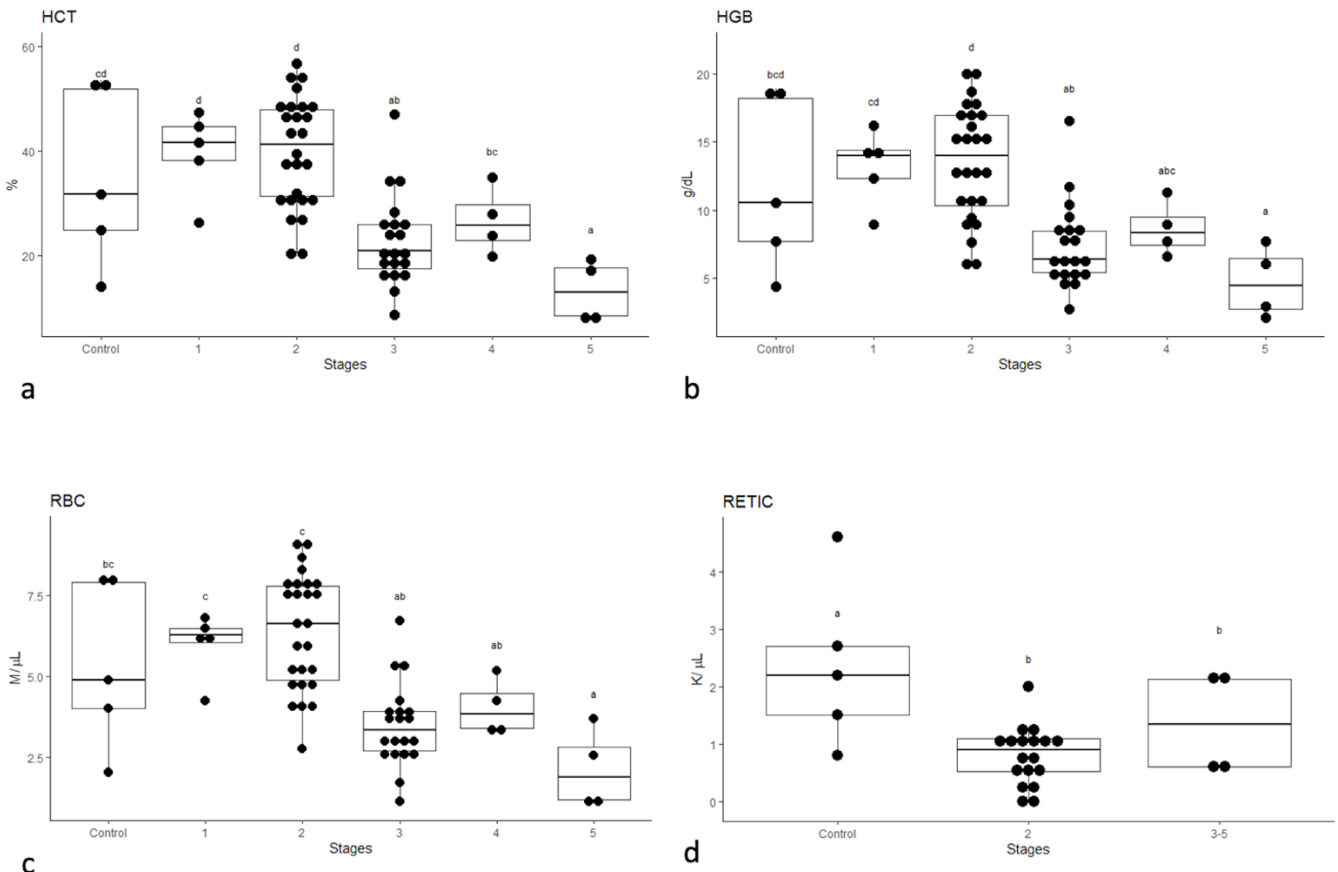


Figura 11: Comparação das médias das variáveis do hemograma pelo estadiamento. Para HCT, HGB, RBC, RETIC os pressupostos da ANOVA foram atendidos. Assim para essas variáveis foi utilizado o método ANOVA seguido pelo teste de Duncan. O nível de significância considerado foi de 5%. Letras diferentes indicam diferença estatística considerando esses testes. (a) O hematócrito diminuiu do Estágio III para o V sendo estatisticamente diferente entre os estágios 0, I e II para III, IV e V. (b) A hemoglobina diminuiu do Estágio III para o V sendo estatisticamente diferente entre os estágios 0, I e II para III, IV e V. (c) Os glóbulos vermelhos diminuíram do estágio III para o V sendo estatisticamente diferente entre os estágios 0, I e II para III, IV e V. (d) Menores valores de reticulócitos no estágios II, III-IV com diferença estatística do estágio 0.

Nos estágios 0, I e II, HT, HGB e RBC estavam dentro da faixa de normalidade. Os estágios III, IV e V apresentaram anemia com diferença estatística entre os estágios. O valor de RETIC foi menor nos estágios II, III-IV com diferença estatística para estadiamento 0 (Tabela 7).

Tabela 7: Comparação das médias das variáveis do hemograma por estadiamento.

Variáveis*	Estadiamento						CV (%)	p-valor
	0 (n=5)	1 (n=5)	2 (n = 26)	3 (n=20)	4 (n=4)	5 (n=4)		
%MONO	13.18 ^b	1.2 ^a	4.63 ^a	2.05 ^a	2.05 ^a	3.5 ^a	99.38	0.0001
HCT	35.14 ^{cd}	39.60 ^d	39.84 ^d	22.74 ^{ab}	26.55 ^{bc}	13.05 ^a	31.86	<0.0001
HGB	11.94 ^{bcd}	13.16 ^{cd}	13.50 ^d	7.37 ^{ab}	8.63 ^{abc}	4.68 ^a	36.07	<0.0001
Eritrocito	5.37 ^{bc}	5.97 ^c	6.4 ^c	3.49 ^{ab}	4.04 ^{ab}	2.15 ^a	32.07	<0.0001
%NEU	57.60 ^a	79.00 ^{bc}	64.65 ^{ab}	73.29 ^{abc}	84.18 ^c	79.50 ^{bc}	19.37	0.0068
%LYM	21.9	15.2	22.14	20.57	12.73	12	55.92	0.3325
MCH	21.74	22	20.93	21.12	21.2	22.05	12.53	0.927

Variáveis**	Estadiamento					CV (%)	
	0 (n=5)	1 (n=0)	2 (n = 18)	3 ou 4 (n=4)	5 (n=0)		
RETIC1	106.1	-	59.47	58.73	-	58.2	0.0778
RETIC	2.36 ^b	-	0.81 ^a	1.38 ^a	-	67.23	0.0026
PCT	0.09	-	0.26	0.18	-	72.63	0.0992
RET-He	23.12	-	22.09	21.25	-	10.79	0.5061
PDW	16.93	-	13.93	17.20	-	17.74	0.1122

*

Todas as variáveis acima atenderam aos pressupostos da ANOVA e foram submetidas a essa análise seguida pelo teste de Duncan. Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença estatística. Foi considerado o nível de significância de 5%. ** Variáveis do hemograma sem dados para os estadiamentos 1 e 5. Existia apenas um animal para o estadiamento 4 e ele foi agrupado com os dados do estadiamento 3 para permitir a comparação. CV = Coeficiente de Variação.

A comparação das medianas das variáveis do hemograma pelo estadiamento, que não atenderam aos pressupostos da ANOVA e foram submetidas à análise de Kruskal-Wallis, demonstra que o número absoluto de eosinófilos começou a diminuir a partir do Estágio I e foi estatisticamente diferente entre os estágios 0, I e II e estágios III e IV. O número absoluto de basófilos não apresentou diferença estatística entre os estágios (Tabela 8).

5.2.3 Mielograma

No mielograma, houve correlação significativa entre os valores absolutos de rubrícitos e rubriblastos, inversamente proporcional à evolução do estadiamento clínico. Os eosinófilos, macrófagos e neutrófilos segmentados tiveram seus valores absolutos diretamente proporcionais à evolução do estadiamento clínico (Tabela 6).

A comparação das variáveis do mielograma para os diferentes estágios mostrou que o número de rubrícitos começa a diminuir no estágio II com diferença estatística dos estágios 0-II para os

estágios III, IV e V. Os mielócitos só apresentaram diferença estatística no estágio IV, aumentado, quando comparado com todos os outros estágios (Figura 13). O número de macrófagos começa a aumentar a partir do estágio II com diferença estatística entre os estágios 0-2 e os estágios III-IV, sem diferença estatística com o estágio V. O número de eosinófilos aumentou no estágio II com diferença estatística do estágio 0 (Figura 13). Não houve diferença estatística na relação M:E (Tabela 6).

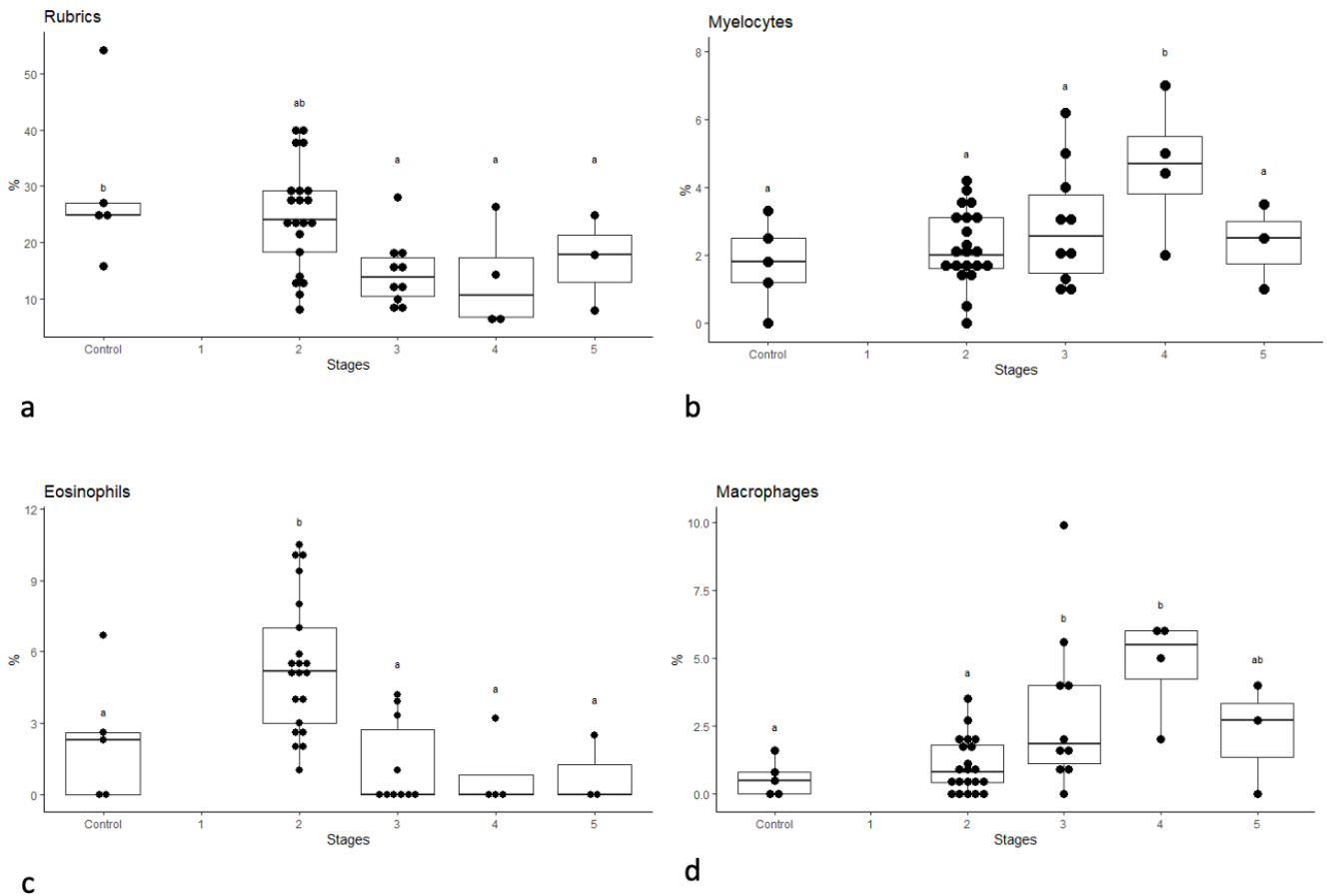


Figura 12: Comparação das variáveis do mielograma para as diferentes fases. Para Rubrics (Rubricitos) e Myelocytes (Mielócitos), os pressupostos da ANOVA foram atendidos. Assim para essas variáveis foi utilizado o método ANOVA seguido pelo teste de Duncan. Eosinophils (Eosinófilos) e Macrophages (Macrófagos) não atenderam o pressuposto de normalidade exigido pela ANOVA, assim para essas duas variáveis foi feito o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. O nível de significância considerado foi de 5%. Letras diferentes indicam diferença estatística considerando esses testes. (a) O número de rubricitos começa a diminuir no estágio II com diferença estatística dos estágios 0/II para os estágios III, IV e V. (b) Os mielócitos só apresentaram diferença estatística no estágio IV, aumentado, quando comparados com todos os outros estágios. (c) O valor de eosinófilos aumentou no estágio II com diferença estatística do Estágio 0. (d) O número de macrófagos começa a aumentar a partir do estágio II com diferença estatística entre os estágios 0/2 e os Estágios III/IV, sem diferença estatística com o estágio V.

5.2.4 Bioquímica sérica

Do total de 64 cães, 59 tiveram a análise de bioquímica sérica realizada. No perfil protéico plasmático, foram observadas alterações principalmente na razão albumina sérica/globulina (A/G). Os cães positivos para LCan apresentaram uma inversão dos valores de A/G, com razões abaixo de 0,6 em 41/59 (69,5%). Hipoalbuminemia estava presente em 32/59 (54,2%) e hiperalbuminemia em 1/59 (1,7%). Hiperгамaglobulinemia esteve presente em 38/59 (64,4%) e hipogамaglobulinemia não ocorreu. No controle negativo, a inversão dos valores de A/G esteve presente em 2/5 cães (40%) relacionados com hipoalbuminemia.

Tabela 8: Medianas (mínimo – máximo) das variáveis do hemograma por Estadiamento.

Variáveis Mediana (Min- Max)*	Estadiamento						p-valor
	0 (n=5)	1 (n=5)	2 (n = 26)	3 (n=20)	4 (n=4)	5 (n=4)	
MONO	0.97 (0.48 – 4.98)	0.00 (0.00 – 1.90)	0.52 (0.00 – 1.78)	0.00 (0.00 – 1.27)	0.08 (0.00 – 1.98)	0.10 (0.00 – 1.16)	0.0576
EOS	1.07 ^b (0.15 – 2.80)	0.49 ^{ab} (0.00 – 9.23)	0.90 ^b (0.14 – 3.06)	0.16 ^a (0.00 – 1.70)	0.07 ^a (0.00 – 0.25)	0.15 ^{ab} (0.00 – 1.86)	0.0012
%EOS	9.40 ^b (4.90 – 20.00)	1.00 ^a (0.00 – 6.00)	7.30 ^b (1.00 – 16.80)	2.15 ^a (0.00 – 12.00)	0.45 ^a (0.00 – 2.00)	2.00 ^{ab} (0.00 – 16.00)	0.0004
NEU	4.06 (1.78 – 10.77)	20.80 (8.93 – 27.20)	7.11 (4.04 – 23.50)	6.80 (2.30 – 35.79)	15.81 (4.95 – 21.68)	7.00 (4.60 – 40.80)	0.0911
LYM	1.77 (0.54 – 4.90)	3.22 (1.60 – 5.00)	2.54 (0.58 – 6.01)	1.93 (0.21 – 5.50)	1.60 (0.79 – 3.55)	0.95 (0.69 – 2.32)	0.2314
MCV	65.60 (61.50 – 67.80)	69.00 (61.00 – 69.00)	63.25 (43.30 – 73.00)	65.90 (53.00 – 76.00)	66.70 (51.00 – 69.00)	69.00 (45.90 – 74.70)	0.5608
MCHC	33.10 (31.00 – 35.40)	34.00 (32.00 – 34.00)	34.10 (20.00 – 37.60)	32.40 (28.00 – 35.10)	32.20 (32.00 – 33.00)	34.65 (28.00 – 40.30)	0.0635
BASO	0.05 ^c (0.01 – 1.43)	0.00 ^a (0.00 – 0.00)	0.01 ^{bc} (0.00 – 0.37)	0 ^{ab} (0.00 – 0.08)	0.00 ^{abc} (0.00 – 0.08)	0.00 ^a (0.00 – 0.00)	0.0004
%BASO	0.40 ^b (0.00 – 3.00)	0.00 ^a (0.00 – 0.00)	0.10 ^{ab} (0.00 – 2.50)	0.00 ^a (0.00 – 1.10)	0.00 ^{ab} (0.00 – 0.30)	0.00 ^{ab} (0.00 – 0.00)	0.0024
Leucócitos	12.31 (3.05 – 15.84)	22.60 (12.20 – 38.30)	13.05 (6.59 – 29.70)	10.34 (3.50 – 42.10)	17.15 (6.60 – 27.54)	10.10 (6.00 – 41.60)	0.2006
Plaquetas	375.00 (200 – 484)	120.00 (60 – 300)	226.50 (15 – 775)	90.00 (27 – 500)	113.50 (50 – 300)	240.00 (120 – 308)	0.0633
	Estadiamento						
	0 (n=5)	1 (n=0)	2 (n = 18)	3 ou 4 (n=4)	5 (n=0)		
RDW	18.30 (15.60 – 19.50)	-	18.90 (14.90 – 28.20)	18.55 (15.10 – 23.50)	-	0.9424	
VPM	12.00 (11.00 – 75.00)	-	12.80 (10.40 – 16.80)	14.15 (11.50 – 16.10)	-	0.5479	

* As variáveis desta tabela não atenderam os pressupostos da ANOVA foram submetidas a análise de Kruskal-Walis. O nível de significância considerado foi de 5%. Na mesma linha, letras diferentes indicam diferença significativa entre os estadiamentos. Min = Mínimo; Max = máximo.

Apenas cães positivos para LCan apresentaram aumento nos valores de BUN e creatinina. O BUN estava acima do intervalo de referência (<27mg/dL) em 7/59 (12%) e a creatinina estava acima do intervalo de referência (<1,8mg/dL) em 11/59 (12 %) sem diferença estatística entre os estadiamentos porém presentes nos cães a partir do estadiamento IV.

A enzimologia hepática não foi significativamente diferente entre os estadios, apenas sendo observados atividades de ALT acima dos limites de referência em 4/64 (6,3%) dos animais com LCan.

6. DISCUSSÃO

Os achados hematológicos, bioquímicos e clínicos inespecíficos em cães com suspeita de LCan exigem associação com testes sorológicos, parasitológicos e moleculares para um diagnóstico adequado. Além disso, o estadiamento LCan proposto pelas diretrizes do BRASILEISH (2018) auxilia o clínico no manejo terapêutico dos pacientes. A vasta imunopatogenia da leishmaniose representa um desafio para determinar em que estágio o cão com LCan será encaminhado. Essa é uma das razões que promove a busca de diferentes biomarcadores em relação ao parasitismo tecidual, histopatologia, alterações hematológicas e bioquímicas, perfil protéico plasmático, enzimúria e proteinúria (Giunchetti et al., 2019; Valle et al., 2021).

A característica mais notável dos distúrbios hematológicos relacionados à LCan é a anemia normocítica normocrômica, não regenerativa com leucocitose ou leucopenia (Ciaramella et al., 1997; Nicolato et al., 2013; A. B. Reis et al., 2006). Neste estudo demonstramos que a anemia normocítica normocrômica esteve presente e evoluiu de acordo com os estágios. Os valores de hematócrito, hemoglobina e eritrócitos diminuíram do estágio III para o V. Esse achado complementa estudos anteriores que relataram esse tipo de anemia e também as diretrizes BRASILEISH que indicam que a anemia começa a estar presente no estágio III da LCan (ANIMAL., 2018; Reis et al., 2006). Esses achados corroboram com dados anteriores que indicavam que distúrbios na mielopoiese na LCan refletem diretamente nas células vermelhas levando a consequências como a anemia (Nicolato et al., 2013).

O aumento do número de macrófagos na M.O. no mielograma a partir do estadiamento II caminha junto com os dados de anemia no sangue periférico a partir do estadiamento II. A ativação histiocitária no estroma medular da LCan libera mediadores inflamatórios, dentre eles IL-6, que interferem na atividade eritropoiética. As também chamadas “nurses cells” passam a ter sua atividade comprometida pela inflamação. A excessiva liberação de citocinas e proteínas de fase aguda aumentam a liberação do hormônio hepcidina que gera um desarranjo eritropoiético (Grotto, 2008). Na literatura, há trabalhos com LCan que evidenciam diminuição de ferro e diminuição de enzimas antioxidantes séricos em detrimento a uma maior deposição de ferro tecidual, inflamação e fibrose de forma sistêmica, sobretudo nos cães sintomáticos (Souza et al. 2014). A análise pareada dos dados do mielograma na avaliação global do paciente com LCan pode inferir o potencial de anemia de doença crônica, do tipo não regenerativa do paciente grávido ou mesmo nos pacientes em estadiamento precoce, ainda sem sinais de

anemia no sangue periférico. Ou seja, os macrófagos medulares podem atuar como células sentinelas no mielograma do paciente com LCan, quando aumentadas, em associação ao estadiamento, alertando o clínico quanto ao potencial de desenvolvimento de uma anemia inflamatória crônica. Esse fato demonstra que mesmo aquele paciente estadiado e posteriormente tratado para leishmaniose poderá necessitar de cuidados direcionados a eritropoiese.

Na LCan, as investigações do estroma da M.O. por mielograma demonstram distúrbios na mielopoiese refletindo nas células vermelhas e brancas circulantes, resultando não apenas em anemia, mas também em leucopenia (Nicolato et al., 2013). Neste estudo, documentou-se que os precursores de eritrócitos na M.O., rubríctos e rubriblastos, diminuíram com a progressão do estadiamento, refletindo na diminuição no sangue periférico dos valores de HCT, HGB, RBC e RET. Esses dados corroboram achados de outros grupos (Amaral et al., 2013; da Costa-Val et al., 2007; Momo et al., 2014; Yarali et al., 2002). Aqui, sugerimos que a partir do estadiamento III, pacientes com LCan podem apresentar disfunção da M.O.

Nesse estudo a investigação da M.O. através do mielograma associada ao estadiamento da LCan foi pontual para cada paciente. Seria interessante abordar a M.O. do mesmo paciente em tempos diferentes, antes, durante e após a aplicação dos protocolos terapêuticos no intuito de investigar se as hematopatias consequentes da alteração do estroma medular iriam persistir, mesmo após a remissão dos sinais clínicos e redução da carga parasitária da *Leishmania* spp.

A histologia da M.O. no estudo retrospectivo salienta as possíveis alterações do estroma medular na LCan. Apesar de não ter sido possível associar o estadiamento com a histologia, foi demonstrado que na LCan ocorrem displasias eritropoiéticas (diseritropoiese), displasias megacariocíticas e eritrocitárias e emperiopolese. Os fatores que determinam a diseritropoiese ainda são desconhecidos podendo-se relacionar com a individualidade imunológica do paciente (MANZILLO et al., 2006; MOMO et al., 2014; WICKRAMASINGHE et al., 1987). Hipoteticamente, caso fosse possível ter acesso ao hemograma desses cães, haveria a possibilidade da presença hematopatias periféricas, dentre elas, anemia e trombopatias, conforme observado em alguns animais do estudo prospectivo.

A avaliação RETIC é uma abordagem não invasiva para acessar a saúde da M.O. Esta célula é uma precursora das hemácias e está localizada principalmente no compartimento de maturação e reserva da M.O., mas também pode ser observada no sangue periférico. A dosagem de RETIC em sangue periférico é utilizada na rotina de atendimento de cães como biomarcador

de anemia regenerativa e se mostrou um bom biomarcador quando associado aos estágios da LCan. Foi possível notar a diminuição dos RETIC a partir do Estágio 0 (controle negativo). Mesmo antes da anemia, que se inicia no estágio III, as taxas de RETIC foram estatisticamente diferentes entre os estágios. Assim, observamos que os RETIC podem ser usados como um biomarcador para um subestadiamento entre os estágios II e III inferindo um status de integridade da M.O. na LCan.

No leucograma os valores médios da contagem total de leucócitos não seguiram nenhum padrão e não foram significativamente influenciados pela evolução da LCan. Outros autores também relataram achados semelhantes (da Costa-Val et al., 2007; Valle et al., 2021). Entretanto, destacamos a necessidade de interpretação dos números absolutos individuais de eosinófilos e monócitos. Quando analisadas individualmente, essas células seguiram o mesmo padrão descrito anteriormente (Reis et al., 2006). A diminuição do valor absoluto de monócitos e eosinófilos no sangue periférico pode atuar como biomarcador na gravidade da LCan. Apesar do mesmo padrão das demais células leucocitárias, a faixa de referência dos basófilos para cães é muito baixa (de 0 a 0,10 K/ μ L) sendo uma célula muito rara no sangue periférico, não sendo, portanto, indicada como um bom biomarcador.

As análises bioquímicas também podem auxiliar o clínico no estadiamento da LCan. Na mensuração das proteínas plasmáticas, a presença de hipergamaglobulinemia associada a hipoalbuminemia é um achado laboratorial comum na LCan (ANIMAL., 2018; CIARAMELLA ET AL., 1997; LAIA SOLANO-GALLEG0 ET AL., 2011). Nesse estudo, os achados corroboram com outros autores, uma vez que cães positivos para LCan a partir do estágio III, apresentam inversão significativa da relação A/G associada ou não à azotemia. Na progressão da LCan a doença renal crônica é apontada como uma das principais causas que levam os animais a óbito. Apesar disso, a azotemia renal não é um achado laboratorial comum (Ciaramella et al., 1997; Solano-Gallego et al., 2011). Nossos achados evidenciaram azotemia em 12% das amostras sendo que os valores de CREA acima do limite superior ocorreram nos animais a partir do estadiamento IV conforme sugerido pelo BRASILEISH. A variação nos achados laboratoriais bioquímicos decorre muitas das vezes pelo uso de biomarcadores tardios. BUN e CREA tem seus valores elevados por doença renal quando o paciente já apresenta disfunção de pelo menos três quartos da função do órgão (Hall et al., 2014). Uma das maneiras de melhorar a avaliação renal seria a partir do uso de biomarcadores precoces, como a microalbumina urinária, RPC e SDMA (BRASILEISH., 2018).

Nesse estudo, a dificuldade para coleta à campo e de armazenamento por tempo adequado da amostra de urina impossibilitou a associação dos níveis de RPC e urinálise aos valores de BUN e CREA, pois não houve N estatístico para tal. De acordo com o BRASILEISH (2018), somente a partir do estadiamento III haveria elevação dos níveis de RPC. Outros biomarcadores precoces de função renal poderiam elucidar subestadiamentos entre os estagios I e II da LCan, como por exemplo o uso da microalbumina urinária.

A complexidade da LCan demanda do clínico um olhar individualizado do seu paciente. A criação de ferramentas a partir dos exames de rotina que possam gerar inferências sobre a saúde hematopoiética depende vasta discussão e das trocas de experiências dos profissionais na rotina médica veterinária. O estabelecimento de células sentinelas como os RETIC no sangue periférico ou macrófagos medulares para inferências quanto a gravidade da anemia na LCan cria um novo olhar no monitoramento do paciente infectado e doente. Em conjunto, nossos resultados mostram que exames laboratoriais de rotina, quando associados ao estadiamento CanL podem auxiliar os clínicos no manejo da LCan.

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que este experimento foi conduzido, e na amostra selecionada, pode-se concluir que as alterações do mielograma pelo estadiamento LCan refletem na contagem periférica de hemácias e leucócitos. Aqui demonstramos pela primeira vez que o RETIC no sangue periférico pode ser usado como um biomarcador da progressão da LCan seguindo as diretrizes BRASILEISH. O monitoramento dos macrófagos medulares a partir do mielograma pode relacionar-se aos mecanismos de causa e efeito dos processos anêmicos na LCan. Os achados de deseritropoiese na histologia da M.O. na LCan evidencia uma alteração no arranjo do estroma medular, chamando a atenção do clínico para esse órgão durante o diagnóstico e monitoramento dos pacientes com LCan. Além disso, destacamos a necessidade de interpretação dos números absolutos individuais de células leucocitárias. A eosinopenia e a monocitopenia podem atuar como biomarcadores de LCan grave. Assim, é importante correlacionar os testes de avaliação de biomarcadores habituais e novos no protocolo de diagnóstico, estadiamento e acompanhamento da LCan.

REFERÊNCIAS

ABBOUD, C. N.; LICHTMAN, M. A. **Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment**. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLER, B. S.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U. *Williams' Hematology*. 6th ed. McGraw-Hill: New York, 2001. p. 29-58.

Amaral, G., et al., (2013). Title. In *Journal of Petrology* (Vol. 369, Issue 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Amusatogui, I., Sainz, A., & Tesouro, M. A. (2003). Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in. *European Journal of Epidemiology*, 147–156.

Bates, P. A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, 37(10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BRASILEISH. (2018). *Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. único*.

Calvi, L. M., et al., (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960), 841–846. <https://doi.org/10.1038/nature02040>

Castro, R. S., et al., (2018). Hepatic fibropoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* treated with liposome-encapsulated meglumine antimoniate and allopurinol. *Veterinary Parasitology*, 250(December 2017), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.12.005>

Celkan, T. T. (2020). What does a hemogram say to us? *Turk Pediatri Arsivi*, 55(2), 103–116. <https://doi.org/10.14744/TurkPediatriArs.2019.76301>

Ciaramella, P., et al., (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, 141(21), 539–543. <https://doi.org/10.1136/vr.141.21.539>

da Costa-Val, et al. (2007). Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Veterinary Journal*, 174(3), 636–643. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.006>

Dantas-Torres, F., & Brandão-Filho, S. P. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 48(3), 151–156. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000300007>

Dantas-Torres, F., et al., (2019). Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerging Infectious Diseases*, 25(12), E1–E4. <https://doi.org/10.3201/eid2512.190164>

Dantas-Torres, et al., (2019). Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends in Parasitology*, 35(2), 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>

Dantas-Torres, F., et al., (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology*, 28(12), 531–538. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.007>

de Abreu, R. T., 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(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018873>

de Freitas, J. C. C., et al., (2012). Alterações clínicas e laboratoriais em cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(1), 24–29. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822012000100006>

De Luna, R., et al., (2000). Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *Journal of Comparative Pathology*, 122(2–3), 213–216. <https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0357>

Eggold, J. T., & Rankin, E. B. (2020). Erythropoiesis, EPO, Macrophages, and Bone Joshua. *Physiology & Behavior*, 176(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>

Foglia Manzillo, et al., (2013). Prospective Study on the Incidence and Progression of Clinical Signs in Naïve Dogs Naturally Infected by *Leishmania infantum*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002225>

Geddis, A. E. (2010). Megakaryopoiesis. *Seminars in Hematology*, 47(3), 212–219. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.03.001.Megakaryopoiesis>

Giunchetti, R. C., et al., (2019). Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Veterinary Parasitology*, 271(April), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.05.006>

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(5). <https://doi.org/10.1590/s1516-84842008000500012>

Hall, J. A., et al., . (2014). Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(6), 1676–1683. <https://doi.org/10.1111/jvim.12445>

IDEXX Laboratories. (2016). *IDEXX ProCyte Dx* Hematology Analyzer Operator's Guide*. pp.9-10.

Junt, T., et al., (2007). *Dynamic Visualization of*. 350(September), 1767–1771.

Kaushansky, K. (2015). Thrombopoiesis. *Seminars in Hematology*, 52(1), 4–11. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2014.10.003>

Kumar, P. V., et al., (2007). Visceral leishmaniasis: Bone marrow biopsy findings. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, 29(2), 77–80. <https://doi.org/10.1097/MPH.0b013e31803076a8>

Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., & Pieri, S. (1988). 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*,

82(4), 566–567. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(88\)90510-X](https://doi.org/10.1016/0035-9203(88)90510-X)

Manzillo, V. F., et al., (2006). Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Veterinary Record*, 158(20), 690–694. <https://doi.org/10.1136/vr.158.20.690>

Maroli, M., et al., (2010). Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(11), 1200–1206. <https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1200>

Marshall, P. N. (1978). Romanowsky-type stains in haematology. *The Histochemical Journal*, 10(1), 1–29. <https://doi.org/10.1007/BF01003411>

Mescher, A. L. (2018). Junqueira's Basic Histology: Text & Atlas (15th ed.), 2018. In *Morphologia* (Vol. 15). <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.101-104>

Momo, C., Jet al., (2014). Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Medicine International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/150582>

Morimoto, A., et al., 2016). Hemophagocytosis in Experimental Visceral Leishmaniasis by *Leishmania donovani*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004505>

Morimoto, A., et al., (2019). Hemophagocytosis induced by *Leishmania donovani* infection is beneficial to parasite survival within macrophages. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(11), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007816>

Neuber, H. (2008). Leishmaniasis. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 6(9), 754–765. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2008.06809.x>

Nicolato, R. D. C., et al., (2013). Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum*-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082947>

Ovchinnikova, et al., (2018). The shape shifting story of reticulocyte maturation. *Frontiers in*

Physiology, 9(JUL), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00829>

Reis, A. B., et al., (2006). 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(2), 303–311. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03206.x>

Reis, Alexandre B., et al., (2006). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, 81(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.09.011>

Reis, A. B., et al., (2009). Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128(1–3), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>

Ribeiro, V. M., et al., (2013). Control of visceral leishmaniasis in Brazil: Recommendations from Brasileish. *Parasites and Vectors*, 6(1), 1–2. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-8>

Ribeiro, V. M., et al., (2019). Performance of different serological tests in the diagnosis of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs. *Veterinary Parasitology*, 274(April), 108920. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.08.014>

Santos, S. O., et al., (2016). A minimally invasive approach to spleen histopathology in dogs: A new method for follow-up studies of spleen changes in the course of *Leishmania infantum* infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 48, 87–92. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.08.007>

Solano-Gallego, L., et al., (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>

Solano-Gallego, L., et al., (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

- Sukhbaatar, N., & Weichhart, T. (2018). Iron regulation: Macrophages in control. *Pharmaceuticals*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/PH11040137>
- Travlos, G. S. (2006). Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicologic Pathology*, *34*(5), 548–565. <https://doi.org/10.1080/01926230600939856>
- Valle, P. G., et al., (2021). Characterization of proteinuria in treated and untreated dogs naturally infected with *Leishmania* sp. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, *41*, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6905>
- Weiss, L., & Geduldig, U. (1991). Barrier cells: Stromal regulation of hematopoiesis and blood cell release in normal and stressed murine bone marrow. *Blood*, *78*(4), 975–990. <https://doi.org/10.1182/blood.v78.4.975.bloodjournal784975>
- Wickramasinghe, S. N., Abdalla, S. H., & Kasil, E. G. (1987). Ultrastructure of bone marrow in patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Clinical Pathology*, *40*(3), 267–275. <https://doi.org/10.1136/jcp.40.3.267>
- Yarali, N., Fişgin, T., Duru, F., & Kara, A. (2002). Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. *American Journal of Hematology*, *71*(3), 191–195. <https://doi.org/10.1002/ajh.10200>