

Raquel Trópia de Abreu

**Alterações Eritropoéticas e Leucopoéticas na
Leishmaniose Visceral Canina**

**Ouro Preto - MG
Março de 2008**

Raquel Trópia de Abreu

Alterações Eritropoéticas e Leucopoéticas na Leishmaniose Visceral Canina

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para obtenção do título de mestre. Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis - Laboratório de Imunopatologia/ Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carvalho - Laboratório de Hematologia Clínica/ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais.

**Ouro Preto - MG
Março - 2008**

A162a Abreu, Raquel Trópia.

Alterações eritropoéticas e leucopoéticas na leishmaniose visceral canina.
[manuscrito] / Raquel Trópia de Abreu. – 2008.

xvi, 114 f.: il., color; graf., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto
de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências
Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de protozoários.

1. Leishmaniose - Teses. 2. Cão - Teses. 3. Medula óssea - Teses. 4.
Eritropoese - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de
Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. II.
Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro ^I

Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti ^I

Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira ^{II}

Dr. Olindo Assis Martins Filho ^{III}

I - Laboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB), Universidade Federal de Ouro Preto (ICEB II/UFOP).

II – Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (IRR/FIOCRUZ).

III – Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (IRR/FIOCRUZ).

Suporte Financeiro & Instituições Colaboradoras

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

IRR - Instituto René Rachou

Dedico este trabalho aos meus pais, Gilberto (*saudades*) e Ana Maria, pelo amor, educação e exemplo de vida que serviram de alicerce para minha formação; Aos meus irmãos e melhores amigos Dé e Dri, pelo apoio e carinho sempre;

Ao meu querido Ricardo, pelo companheirismo, confiança e compreensão; e por estar sempre ao meu lado apoiando-me em todas as decisões.

**"A compaixão para com os animais é das
mais nobres virtudes da natureza humana."
(Charles Darwin)**

À Deus por estar sempre presente na minha vida me protegendo e guiando meus passos. Pela força e coragem concedidas para superar os obstáculos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador Alexandre Barbosa Reis pelo apoio, orientação e credibilidade no desenvolvimento desse trabalho e, sobretudo, por ser responsável pela minha formação científica me “apresentando” à Leishmaniose Visceral Canina. Obrigada pela confiança e amizade.

À minha co-orientadora Maria da Graças Carvalho pela participação efetiva neste trabalho. Minha eterna gratidão pela amizade, pelo estímulo e incentivo constantes e por me receber em seu laboratório de braços abertos.

À Prof^a. Cláudia Martins Carneiro pela amizade e carinho ao me receber no laboratório, além de grande contribuição na montagem das pranchas, pelas sugestões e críticas que auxiliaram na redação da dissertação.

Ao Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti pelos ensinamentos na pesquisa científica, contribuindo de forma determinante neste trabalho com sugestões, análises dos dados e pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

Ao Prof. Wanderson Lima pelo incentivo e estímulo no desenvolvimento final deste trabalho e pela convivência sempre agradável.

À Prof^a. Maria Cláudia de Castro e ao doutorando Wendel Coura Vital pela preciosa ajuda na realização da análise estatística.

Aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB que estão sempre prontos para ajudar, pela grande dedicação nas vistorias diárias do canil, cuidando dos filhotes e cães doentes para manutenção dos cães em experimentação. Gostaria de agradecer ao Bruno M. Roatt e ao Rodrigo O. Aguiar

Soares que agora são colegas de pós-graduação, Henrique G. Ker, Samuel L. Braga, Levi, Jamille e Fernando. Obrigada pelo apoio e amizade.

Aos demais estudantes e ex-estudantes do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB pela agradável convivência: Sheler, Vítor, Jerusa, Carolina, Kátia e Fabiana.

À funcionária do Laboratório de Imunopatologia/NUPEB, Maria Chaves dos Santos pela amizade e competência no desenvolvimento das atividades diárias do laboratório sempre ajudando a todos.

À Maria Aparecida Reis Trópia (Cida), secretária do programa de pós-graduação do NUPEB pela ajuda na resolução das questões burocráticas, pelo carinho e amizade.

Aos alunos de pós-graduação do NUPEB pelas experiências, alegrias e tristezas compartilhadas. Às doutorandas Nádia das D. Moreira e Juliana V.de Souza minhas amigas desde a minha chegada no laboratório, obrigada pelos conselhos, força nos momentos difíceis e ajuda na produção da dissertação. Aos queridos amigos da pós-graduação, Amanda Fortes, Paula Abreu e Rafael Teixeira pelo companheirismo e pela convivência sempre agradável; Às inesquecíveis amigas Fernanda Ferraz e Jamille Lula pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntas estudando.

Aos professores, funcionários e alunos do Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia/UFMG pela recepção e agradável convivência, colocando o laboratório à minha disposição para a realização da leitura das lâminas.

Aos meus pais, Ana e Gilberto (*saudades*), meus irmãos, André e Adriana e ao meu sobrinho Giuliano que sempre me apoiaram e me deram condições para chegar até aqui sem medir esforços, pelo amor, carinho e união. Agradeço à Deus todos os dias por ter uma família tão especial.

Ao meu namorado Ricardo por fazer minha vida mais feliz. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos felizes e tristes, pelo companheirismo, amor e incentivo do início ao fim deste trabalho.

À vovó Edwiges pelo exemplo de vida e força e por manter a família sempre unida me proporcionando momentos únicos.

Aos tios, tias, primos e primas, em especial à minha tia-madrinha Fatinha por acreditar em mim, me apoiando em todos os momentos e vibrando com as minhas conquistas e à tia Zezé por te me apresentado ao NUPEB, pelas dicas e ajuda nessa etapa da minha vida.

Aos funcionários da Veterinária Garibaldi pela amizade e agradáveis momentos e ao médico veterinário José Garibaldi de Oliveira por ter contribuído muito na minha formação profissional, pelo incentivo e amizade.

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1 - Leishmanioses	8
2.2 - Leishmaniose visceral canina (LVC)	11
2.2.1 - A importância do cão como reservatório, no controle e profilaxia da leishmaniose visceral	11
2.2.2 - Aspectos clínicos da doença no cão	12
2.2.3 - Alterações bioquímicas e hematológicas na leishmaniose visceral canina	15
2.2.4 - Imunopatologia da leishmaniose visceral canina	17
2.2.5 - Métodos de diagnóstico na leishmaniose visceral canina	20
2.3 - Medula óssea em cães	22
2.4 - Hematopoese	24
2.4.1 - Eritropoese	25
2.4.2 - Mielopoese	26
3. JUSTIFICATIVA	28
4. OBJETIVOS	30
4.1 - Objetivo geral	31
4.2 - Objetivos específicos	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1 - Animais - seleção e manejo dos cães	33
5.1.1 - Quarentena	34
5.1.2 - Caracterização clínica dos cães do grupo 1	35
5.2 - Coleta de material	36
5.2.1 - Sangue	36
5.2.2 - Medula óssea	37
5.3 - Realização do mielograma	38
5.4 - Captura de imagens e análise morfológica	40
5.5 - Estabelecimento das taxas de maturação	40
5.6 - Avaliação parasitológica	41
5.7 - Avaliação hematológica	41
5.8 - Análise estatística	42
6. RESULTADOS	44
6.1 - Alterações na celularidade da medula óssea de cães infectados por <i>L.chagasi</i> nos diferentes grupos clínicos	45
6.1.1 - Alterações eritropoéticas	45
6.1.2 - Alterações leucopoéticas	46
6.1.3 - Avaliação das taxas de maturação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> apresentando diferentes formas clínicas ..	52
6.2 - Avaliação da carga parasitária na medula óssea de cães infectados por <i>L.chagasi</i>	53
6.3 - Alterações na celularidade da medula óssea de cães infectados por <i>L.chagasi</i> nas diferentes densidades parasitárias	56

6.3.1 - Alterações eritropoéticas	56
6.3.2 - Alterações leucopoéticas	57
6.3.3 - Avaliação das taxas de maturação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> apresentando diferentes graus de parasitismo medular	60
6.4 - Avaliação do mielograma x hemograma de cães naturalmente infectados por <i>L.chagasi</i> portadores de diferentes formas clínicas (grupo 2)	63
6.4.1 - Alterações nos parâmetros hematológicos	63
6.4.2 - Alterações nos parâmetros medulares	64
6.4.3 - Análises de correlação do mielograma <i>versus</i> hemograma.....	66
6.4.3.1 - Alterações na série vermelha	66
6.4.3.2 - Alterações na série branca	67
7. DISCUSSÃO	71
8. CONCLUSÃO	83
9. PERSPECTIVAS.....	85
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
11. ANEXOS	110
11.1 - Características morfológicas e classificação de células em aspirado de medula óssea de cães (Penny, 1974; Jain, 1986; Harvey, 2001).....	111

Tabela 1: Principais sinais clínicos utilizados na classificação dos cães.....	36
Tabela 2: Cálculo das diferentes razões (taxas de maturação) para determinação numérica da celularidade na medula óssea	40
Tabela 3: Valores hematológicos de referência para a espécie canina segundo Jain (1993).....	42
Tabela 4: Avaliação das taxas de maturação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> apresentando diferentes formas clínicas..	53
Tabela 5: Padrões de densidades parasitárias na medula óssea de cães infectados por <i>L. chagasi</i> apresentando diferentes formas clínicas.....	54
Tabela 6: Avaliação das taxas de maturação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> apresentando diferentes graus de parasitismo	61
Tabela 7: Avaliação dos parâmetros hematológicos de cães naturalmente infectados e não-infectados	64
Tabela 8: Avaliação dos parâmetros medulares de cães naturalmente infectados e não-infectados	65

Diagrama 1: Esquema representativo da progressão de maturação das linhagens celulares presentes na medula óssea avaliadas neste estudo.....	38
Diagrama 2: Principais resultados observados na medula óssea de cães nos diferentes grupos clínicos e densidades parasitárias.....	62

Prancha 1: Fotomicrografias da celularidade presente no filme de medula óssea de cães.....	39
Prancha 2: Fotomicrografias das alterações celulares observadas nos filmes de medula óssea no grupo sintomático quando comparado ao grupo de cães não-infectados.....	51
Prancha 3: Fotomicrografias da densidade parasitária observada nos filmes de medula óssea de cães	55

Figura 1: Contagem celular da série eritroblástica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados.....	46
Figura 2: a) Contagem celular da série granulocítica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados.....	47
Figura 2: b) Contagem celular da série granulocítica neutrofilica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados.....	48
Figura 2: c) Contagem celular da série granulocítica eosinofílica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados.....	49
Figura 3: Contagem celular da série agranulocítica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados.....	50
Figura 4: Densidade parasitária (LDU) na medula óssea de cães naturalmente infectados por <i>L. chagasi</i> , com classificação baseada no <i>status clínico</i>	54
Figura 5: Contagem celular da série eritroblástica nas diferentes densidades parasitárias.....	56
Figura 6: a) Contagem celular da série granulocítica nas diferentes densidades parasitárias.....	57
Figura 6: b) Contagem celular da série granulocítica neutrofilica nas diferentes densidades parasitárias.....	58
Figura 6: c) Contagem celular da série granulocítica eosinofílica nas diferentes densidades parasitárias.....	59
Figura 7: Contagem celular da série agranulocítica nas diferentes densidades parasitárias.....	60
Figura 8: Correlação entre os valores obtidos no eritrograma e os valores obtidos no mielograma da linhagem eritropoética considerando todos os grupos clínicos.....	67
Figura 9: Correlação entre os valores obtidos no leucograma e os valores obtidos no mielograma da linhagem leucopoética considerando o grupo de cães assintomáticos.....	69
Figura 10: Correlação entre os valores obtidos no leucograma e os valores obtidos no mielograma da linhagem leucopoética considerando o grupo de cães oligossintomáticos e sintomáticos.....	70

Lista de Abreviaturas

% - percentual

A/G - Razão Albumina/Globulina

ALT - Alanina Amino Transferase

AP - Alto Parasitismo

AST - Aspartato Amino Transferase

BFU-E - *Burst forming unit-erythroid*

BFU-MK - *Burst forming unit-megakaryocyte*

BP - Baixo Parasitismo

CA - Cães Assintomáticos

CD - *Cluster differentiation*

CD4 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CD5 - Marcador de superfície celular de linfócitos T

CD8 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T

CD14 - Marcador de superfície celular de monócitos e granulócitos

CD21 - Marcador de superfície celular de linfócitos B

CFU - Eo - *Colony forming unit-eosinophil*

CFU - G - *Colony forming unit-granulocyte*

CFU - B - *Colony forming unit-lymphocyte B*

CFU - Ba - *Colony forming unit-basophil*

CFU - E - *Colony forming unit-erythroid*

CFU - GEMM - *Colony forming unit-granulocyte-eritrocyte-monocyte-macrophage*

CFU - GM - *Colony forming unit granulocyte-macrophage*

CFU - L - *Colony forming unit-lymphocyte*

CFU - M - *Colony forming unit-monocyte*

CFU - MK - *Colony forming unit-megakaryocyte*

CFU - S - *Colony forming unit-spleen*

CFU - T - *Colony forming unit-lymphocyte T*

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CNI - Cães Não Infectados

CO - Cães Oligossintomáticos

CS - Cães Sintomáticos

CTH - Células-tronco hematopoéticas

DAT - *Direct Agglutination Test*

DTH - *Delayed Type Hypersensitivity*

EB - Eritroblasto Basófilo

EDTA - *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EMI - *Erythroid Maturation Index*

EO - Eritroblasto Ortocromático

EP - Eritroblasto Policromático

FA - Fosfatase Alcalina

G-CSF - *Granulocyte-colony stimulating factor*

GM-CSF - *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*

Hb - Hemoglobina

Ht - Hematócrito

I:M - Razão imaturo:maduro

I:Me - Razão imaturo:maduro (eritropoese)

I:Mg - Razão imaturo:maduro (granulopoese)

ICB - Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)

IDR - Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ - Interferon gamma
IgA - Imunoglobulina da classe A
IgE - Imunoglobulina da classe E
IgG - Imunoglobulina da classe G
IgG1 - Imunoglobulina da subclasse G1
IgG2 - Imunoglobulina da subclasse G2
IgM - Imunoglobulina da classe M
IL-1 - Interleucina 1
IL-2 - Interleucina 2
IL-3 - Interleucina 3
IL-4 - Interleucina 4
IL-5 - Interleucina 5
IL-6 - Interleucina 6
IL-7 - Interleucina 7
IL-10 - Interleucina 10
IL-11 - Interleucina 11
IL-13 - Interleucina 13
IL-18 - Interleucina 18
LV - Leishmaniose visceral
LVC - Leishmaniose visceral canina
M:E - Razão mielóide:eritróide
MMI - *Myeloid Maturation Index*
MP - Médio Parasitismo
OMS - Organização Mundial de Saúde
PBMK - *Peripheral blood mononuclear cells*
PCLV - Programa de Controle da Leishmaniose Visceral
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
RBC - *Red blood cells*
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm - rotação por minuto
SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
SMF - Sistema Monocítico Fagocitário
SRD - Sem Raça Definida
Th1 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 1 de citocinas (IL-2 e IFN- γ)
Th2 - Células T CD4⁺ secretoras do padrão 2 de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL10)
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral tipo α
TRALd - Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani*
VCAM-1 - *Vascular cell adhesion molecule-1*
VCM - Volume Corpuscular Médio
WHO - *World Health Organization*
 μm – micrômetro

A medula óssea é considerada um importante reservatório de parasitos em cães infectados por *Leishmania chagasi*. Poucos trabalhos na literatura relatam o processo da gênese celular na medula óssea na Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em diferentes formas clínicas. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar as alterações na leucopoese e eritropoese bem como investigar a carga parasitária em aspirados de medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* apresentando diferentes formas clínicas e padrões distintos de densidade parasitária na medula óssea. Dessa forma, filmes de medula óssea corados por *Giemsa* foram avaliados considerando três grupos clínicos: assintomático (CA, $n=50$), oligossintomático (CO, $n=44$) e sintomático (CS, $n=65$) comparados com cães não-infectados (CNI, $n=28$). A densidade parasitária foi avaliada na medula óssea e os resultados expressos como “*Leishman Donovan Units*” (LDU), e classificados em tercis como baixo (BP, $n=51$), médio (MP, $n=51$) ou alto (AP, $n=48$) parasitismo. Em um segundo grupo de 48 cães (CA, $n=10$; CO, $n=9$; CS, $n=12$; CNI, $n=17$) o mielograma e hemograma completo foram realizados para investigar a associação entre a celularidade da medula óssea e do sangue periférico. Os resultados obtidos indicaram diferenças significativas em relação à eritropoese considerando proeritroblastos, eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos resultando em hipoplasia eritróide principalmente nos grupos CA e CS. A leucopoese apresentou algumas alterações em cães infectados. Por exemplo, células da linhagem eosinofílica mostraram uma diminuição significativa nos diferentes grupos clínicos comparado com o grupo CNI. Entretanto, células da linhagem neutrofílica mostraram alterações nos diferentes grupos clínicos, tais como um aumento significativo nos diferentes grupos clínicos. Em relação às células mononucleares, foi observado aumento de linfócitos nos grupos CO e CS quando comparado com o grupo CNI. Resultados similares foram encontrados em plasmócitos mostrando clara tendência ao aumento gradual de acordo com a gravidade da infecção. Por outro lado, monócitos tiveram significativo aumento no grupo CO comparado ao grupo CA. A contagem diferencial de células da medula óssea demonstrou um aumento na razão mielóide: eritróide (M:E) devido ao aumento de células granulocíticas nos diferentes grupos clínicos comparado com o grupo CNI. A avaliação parasitológica mostrou maiores índices de LDU em CS comparado com CA. Além disso, os dados demonstraram uma correlação positiva entre *status* clínico (CA,CO,CS) e densidade parasitária (BP,MP,AP). A avaliação do impacto do parasitismo na medula óssea mostrou resultados similares quando se avaliou os cães classificados em diferentes formas clínicas, tais como, hipoplasia eritróide, hipoplasia eosinofílica, proliferação de células precursoras neutrofílicas, um significativo aumento no número de linfócitos e plasmócitos, destacando o grupo de cães com alto parasitismo com resultados mais significativos. Os resultados do grupo 2 mostraram que as alterações do sangue periférico foram relacionadas às alterações da medula óssea principalmente no grupo CS. De forma interessante, o grupo CS demonstrou diminuição de células da linhagem eritropoética e eritrócitos, hemoglobina e hematócrito caracterizando anemia periférica não-regenerativa. Além disso, foram observados aumento de neutrófilos e seus precursores, diminuição de bastonetes e segmentados eosinófilos e significativo aumento de linfócitos na medula óssea associada à leucopenia com desvio à esquerda, eosinopenia, linfopenia e monocitopenia no sangue periférico. O presente estudo mostrou que a evolução clínica da LVC em cães naturalmente infectados promove claras alterações na medula óssea e no sangue periférico. A progressão da doença da forma clínica assintomática para sintomática foi acompanhada de parasitismo intenso na medula óssea. Assim, os dados analisados em conjunto permitem concluir que a avaliação desses parâmetros constitui uma ferramenta adicional bastante útil no prognóstico da leishmaniose visceral canina, bem como no diagnóstico em duas situações específicas, a saber: a) esclarecer casos com forte suspeita de LVC, porém não confirmados por sorologia, utilizando-se do mielograma; e b) orientar exames complementares para elucidar suspeita de LVC, a partir de dados clínicos e do hemograma.

The bone marrow is considered an important reservoir of parasites in sick *Leishmania*-infected dogs. Little is known about the process of cellular genesis in bone marrow in Canine Visceral Leishmaniasis (CVL) presenting different clinical status. In this context, the aim of the present study was to evaluate leucopoiesis and erythropoiesis alterations as well as to investigate parasite load in aspirates of bone marrow dogs naturally infected by *L. chagasi* with different clinical status and distinct patterns of bone marrow parasite density. Herein, bone marrow (BM) smears stained by *Giemsa* were evaluated considering three clinical groups: asymptomatic (AD, n=50), oligosymptomatic (OD, n=44) and symptomatic (SD, n=65) compared with non-infected dogs (NID, n=28). Parasite density was performed in bone marrow and the results expressed as “*Leishman Donovan Units*” (LDU index), and classified into tertiles as low (LP, n=51), medium (MP, n=51) or high (HP, n=48) parasitism. A second group of 48 dogs (AD, n=10; OD, n=9; SD, n=12; NID, n=17) was evaluated by bone marrow analysis and hemogram to investigate the association between bone marrow and peripheral blood parameters. The results obtained indicated significant differences in relation to erythropoiesis considering proerythroblasts, basophilic, polychromatic and orthochromatic erythroblasts resulting in an erythroid hypoplasia mainly in AD and SD groups. Leucopoiesis presented some alterations in infected dogs. For example, eosinophilic lineage cells number showed a significant decrease in the different clinical groups compared to NID group. However, neutrophilic lineage cells number showed alterations in the different clinical groups, such as a significant increase in the different clinical groups. Related to mononuclear cells, it was observed for lymphocytes number an increase in OD and SD groups when compared with NID group. Similar results were found for plasma cell number showing a clear tendency to a gradual increase according to the severity of the infection. By the other hand, monocytes cell number had significantly increase in OD group compared to AD group. Differential cell counts of bone marrow demonstrated an increase in the myeloid: erythroid (M:E) ratio due to the increased numbers of granulopoietic cells in the different clinical groups compared to NID group. Parasitological assessment showed higher LDU index in SD compared with AD. Moreover, our data demonstrated a positive correlation among clinical status (AD,OD,SD) and parasite density (LP,MP,HP). Assessment of the impact of parasite density on bone marrow showed similar results when the dogs were evaluated in different clinical stages such as erythroid hypoplasia, eosinophilic hypoplasia, proliferation of neutrophilic precursors cells, a significant increase in lymphocytes and plasma cells number, highlighting the high parasitism dogs group with the most significant results. The results of second group showed that peripheral blood alterations were related to those shown by bone marrow, mainly in SD group. Indeed, SD group dogs demonstrated significant decrease in erythropoietic lineage cells number and erythrocytes, hemoglobin and hematocrit resulting in a nonregenerative anemia. Moreover, there were observed increase in neutrophils and their precursors, decrease in band eosinophils and eosinophils and significant increase in lymphocytes number in bone marrow associated to leukopenia with left shift, decrease in eosinophils, lymphocytes and monocytes number in peripheral blood. The present study showed that the clinical evolution of CVL in naturally infected dogs promotes clear alterations in the bone marrow and peripheral blood. The progression of the disease from asymptomatic to symptomatic clinical status was accompanied by intense parasitism in the bone marrow. So, the data analysed together allow to conclude that the assessment of these parameters constitute a useful and additional tool for CVL prognosis, as well as for diagnosis in two specific situations, namely: a) to clarify cases with a strong suspicion of CVL, however not confirmed by serologic tests, by using bone marrow analysis; and b) to orientate complementary laboratory tests to investigate CVL suspicion, based on clinical and hemogram data.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* descrito em 1903 por Ross compreende protozoários digenéticos que apresentam formas promastigotas e paramastigotas, que se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado e formas amastigotas, que permanecem e multiplicam no Sistema Monocítico Fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado. A multiplicação deste parasito ocorre por divisão binária, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado (Bastien *et al.*, 1992).

A transmissão entre hospedeiros vertebrados ocorre através da picada de fêmeas dos flebotomíneos. Os flebotomíneos pertencem à ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, sendo conhecidos dois gêneros: *Lutzomyia*, presente no Novo Mundo, e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Lainson & Shaw, 1987). No Brasil, são encontradas inúmeras espécies de flebotomíneos, sendo considerada como a principal espécie vetora de *Leishmania (L.) chagasi* a *L. longipalpis*. Entretanto, outros vetores podem eventualmente assumir este papel em áreas geográficas limitadas, com a ocorrência de *L. evansi* na Colômbia (Travi *et al.*, 1996) e *L. cruzi* no Mato Grosso do Sul, Brasil (Santos *et al.*, 1998).

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por espécies do gênero *Leishmania*, podendo acometer desde o homem até animais silvestres e domésticos e sua distribuição mundial é ampla, ocorrendo em diversas partes do mundo, exceto Oceania e Antártida (WHO, 1990; Desjeux, 1991; Bryceson, 1996).

A leishmaniose visceral (LV) é a mais relevante dentre as doenças emergentes no mundo alcançando 98% de mortalidade em casos humanos não tratados (Tesh, 1995). Apresenta característica endêmica em 88 países, sendo que cerca de 90% dos casos de LV notificados no mundo ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia e Sudão. O Brasil é responsável por 90% das notificações de LV que ocorrem no continente americano (Monteiro *et al.*, 1994).

Estudos epidemiológicos preliminares realizados no Ceará por Deane & Deane (1962) relataram a participação do cão como reservatório doméstico e a raposa (*Dusicyon vetulus*) como reservatório silvestre da *L. chagasi*. Posteriormente Lainson *et al.* (1969) encontraram, no Pará, outro canídeo infectado, *Cerdocyon thous*, incluindo-o também na lista de reservatórios silvestres.

Do ponto de vista epidemiológico a Leishmaniose visceral canina (LVC) é considerada ser mais importante que a doença humana devido a sua alta prevalência e pelo fato de tanto cães assintomáticos quanto sintomáticos apresentarem intenso parasitismo cutâneo e serem igualmente fonte de infecção para o vetor (Molina *et al.*, 1994, Giunchetti *et al.*, 2006).

Estratégias de controle da LV foram estabelecidas por Deane (1956) e baseiam-se em um tripé de ações que preconiza o tratamento dos casos humanos, combate ao vetor por aspersão de inseticida com efeito residual em domicílio e peridomicílio, além do sacrifício dos cães soropositivos. Esta última, por sua vez, vem sendo contestada pelos proprietários dos cães e por veterinários. O fato de mais de 50% dos cães infectados apresentarem-se clinicamente saudáveis (Lanotte *et al.*, 1979; Gradoni *et al.*, 1980; Mancianti *et al.*, 1986; Abranches *et al.*, 1991; Brandonisio *et al.*, 1992; Alvar *et al.*, 1994) gera grande resistência dos proprietários de cães infectados em colaborar com o programa de controle. Dessa forma, essas medidas, muitas vezes realizadas de forma isolada, não apresentaram efetividade para redução da incidência da doença (Palatnik *et al.*, 2001). O Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) desenvolvido pelo Ministério da Saúde tem o novo enfoque de incorporar os estados e municípios silenciosos, ou seja, sem ocorrência de casos humanos ou caninos da doença, nas ações de vigilância epidemiológica. Dessa forma, poderia se evitar ou minimizar os problemas referentes a este agravo em áreas sem transmissão. Nas áreas com transmissão de LV, após estratificação epidemiológica, as medidas de controle devem ser distintas e adequadas para cada área a ser trabalhada (Ministério da Saúde, 2003). Entretanto até o momento esta política ainda não foi efetivamente adotada em todos os estados federativos.

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte. Em Minas Gerais, Profeta da Luz *et al.* (2001) relataram que a notificação de casos de LV passou de seis municípios da região metropolitana de Belo Horizonte no período de 1994/1995 para quinze no período de 1998/1999. Estes dados mostram de forma clara e preocupante a grande expansão da LV no Brasil e na área metropolitana de Belo Horizonte, ilustrando claramente o caráter emergente e re-emergente desta endemia.

O tratamento de cães doentes vem sendo realizado com frequência em clínicas veterinárias de forma indiscriminada, já que o mesmo não é recomendado pelo Ministério da Saúde. Entretanto, como a quimioterapia não proporciona cura parasitológica ao cão, o desenvolvimento de uma vacina anti-LVC seria a melhor alternativa para combater a crescente expansão da LV no ambiente urbano (Marzochi *et al.*, 1985; Genaro, 1993). No ano de 2005 o Ministério da Saúde lançou uma portaria proibindo o uso de glucantime® em clínicas veterinárias em função da possibilidade de se gerar cepas refratárias ao tratamento por esta droga em humanos (Ministério da Saúde, 2005).

Diversos aspectos relacionados ao quadro clínico da LVC assemelham-se ao da LV humana, tais quais: com febre irregular por longos períodos, palidez de mucosas e emagrecimento progressivo, até um estado de caquexia, em seu estágio final (Marzochi *et al.*, 1985; Genaro, 1993).

Alguns autores buscam classificar a doença no cão em formas clínicas por meio da estratificação de sinais clínicos. A classificação clínica mais amplamente empregada e reconhecida na literatura científica foi preconizada por Mancianti *et al.* (1988) que propuseram a classificação da LVC baseada em sinais clínicos abrangendo três grupos clínicos distintos, a saber: cães assintomáticos (CA), cães oligossintomáticos (CO) e cães sintomáticos (CS).

Portanto, a LVC pode envolver desde casos assintomáticos aparentemente saudáveis até uma a doença sistêmica e grave, a qual na maioria das vezes culmina no óbito.

O diagnóstico da LVC é geralmente realizado através de testes sorológicos, tais como, RIFI (Reação de Imunofluorescência Indireta) e ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), associado com os aspectos clínicos e epidemiológicos. Entretanto o diagnóstico parasitológico é considerado por muitos, padrão ouro em função da visualização do parasito em esfregaços por aposição de tecidos (Sacks *et al.*, 1993). Estudos demonstraram que a RIFI apresenta títulos sorológicos mais elevados em animais sintomáticos quando comparados aos oligossintomáticos, que por sua vez apresentam títulos sorológicos superiores aos cães assintomáticos (Genaro, 1993; Reis, 2001; Reis *et al.*, 2006a). Entretanto esta correlação nem sempre é constatada, pois é dependente de inúmeros fatores tais como: parasitismo, estágio clínico, resposta imune,

antígeno empregado, dentre outros. Além disso, observa-se que alguns cães assintomáticos podem apresentar altos títulos e cães sintomáticos podem apresentar baixos títulos (Reis *et al.*, 2006b).

O maior problema em relação ao diagnóstico clínico é o fato dos sinais clínicos da LVC serem muito similares àqueles observados em outras infecções caninas. O aspecto crônico da doença e seu longo período de incubação podem gerar um atraso, falha e principalmente confundimento no diagnóstico clínico (Cardoso & Cabral, 1998).

Há relatos de várias alterações bioquímicas e hematológicas em cães naturalmente ou experimentalmente infectados, tais como: anemia normocítica e normocrômica, leucopenia, trombocitopenia, elevação das proteínas totais com hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia e alterações nas enzimas hepatocelulares (alanina amino transferase e aspartato amino transferase) (Abranches *et al.*, 1991; Genaro, 1993; Reis *et al.*, 2006a).

A gênese das alterações hematológicas seja da série vermelha ou da série branca muitas vezes está relacionada às disfunções medulares tais como displasia e aplasia (Diebold *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2001; Weiss, 2006). Entretanto, pouco se conhece sobre as alterações mielopoéticas em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*.

A avaliação da celularidade na medula óssea em cães portadores de LVC é um tópico pouco abordado por hematologistas e parasitologistas, porém alguns autores relataram ocorrência de hiperplasia de determinados precursores como, granulócitos neutrófilos proporcionando um aumento da relação mielóide:eritróide (M:E). Outras alterações descritas tais como aumento na população de monócitos e macrófagos e a elevação no número de plasmócitos e células de Mott, parecem indicar uma estimulação antigênica associada à infecção no compartimento medular (Anosa & Idowu, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1983).

Foglia *et al.* (2006) relataram alterações patológicas da medula óssea na LVC considerando três grupos clínicos: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. As alterações descritas por estes autores são tanto da série vermelha (eritrofagocitose, hipoplasia e displasia eritróide), quanto da série branca (hiperplasia mielóide, neutrofílica e eosinofílica). Entretanto, o trabalho não relata os valores obtidos na contagem diferencial celular da medula óssea nas diferentes formas clínicas e diferentes graus de parasitismo medular não foram estabelecidos.

Dessa forma, a evolução clínica da LVC em cães naturalmente infectados parece promover claras alterações nas células da medula óssea, sendo que essas alterações são diretamente relacionadas ao *status* clínico dos cães. Neste sentido, acreditamos que as alterações medulares podem contribuir seja no contexto do diagnóstico em função da presença de formas amastigotas neste importante sítio, seja no prognóstico clínico laboratorial da LVC no âmbito das alterações eritropoéticas e leucopoéticas. Entretanto, novos estudos são necessários para estabelecer um padrão hematológico medular para diagnóstico de LVC nas diferentes formas clínicas, principalmente em nosso meio. Além disso, considerando a importância da densidade parasitária da medula óssea, capaz de decodificar as principais alterações clínicas da LVC (Reis *et al.*, 2006c), a avaliação das alterações medulares pode auxiliar no entendimento da imunopatogênese observada pelos achados hematológicos no decorrer da história natural da LVC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Leishmanioses

As Leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* (Lainson & Shaw, 1987). Os flebotomíneos transmissores das leishmanioses estão amplamente distribuídos na natureza entre os reservatórios silvestres e/ou domésticos. Ao menos 30 das 400 espécies conhecidas são capazes de transmitir *Leishmania sp.* (Shaw, 2003; Lainson & Rangel, 2005), destacando-se os gêneros *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* na África, Europa e Ásia (Killick-Kendrick, 1990). Na leishmaniose visceral, os hospedeiros vertebrados, reconhecidos como reservatórios estão limitados a um grupo específico de mamíferos, particularmente os pertencentes à família *Canidae*.

A expressão clínica da doença é variável e reflete as complexas interações da virulência da espécie ou cepa infectante com a resposta imune do hospedeiro (Pearson, 1993). Devido ao caráter espectral das manifestações clínicas das leishmanioses, diversos autores propõem diferentes classificações clínicas, entretanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divide e reconhece as leishmanioses em quatro grupos clínicos: cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral. Cada forma apresenta um perfil epidemiológico distinto. As formas tegumentares no Brasil são determinadas por seis espécies, cinco do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lansoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis*, a forma mucosa, pela *L. (V.) braziliensis* e eventualmente pela *L. (V.) guyanensis* e a forma visceral por única espécie, do subgênero *Leishmania*: a *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Lainson & Shaw, 1987; Marzochi & Marzochi, 1994).

A leishmaniose cutânea é doença de baixa gravidade, caracterizada por lesões ulcerosas e indolores. Já a forma mucocutânea pode causar lesões extremamente mutilantes na região nasofaríngea, enquanto a forma cutânea difusa, além de ser um grande desafio terapêutico, apresenta-se com o aspecto hanseniforme com lesões nodulares disseminadas não-ulceradas. A forma visceral (LV) é acompanhada de elevada mortalidade quando não tratada (WHO, 1990). A LV humana, considerada a

mais grave de todas as formas clínicas, caracteriza-se por febre irregular de longa duração, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, epistaxe, hipergamaglobulinemia, hematêmese, emagrecimento e debilidade progressiva. Geralmente evolui para a morte, quando não tratada a tempo, em consequência do estado clínico do paciente (Alencar & Neves, 1982).

O complexo *Leishmania donovani* (Lainson & Shaw, 1987) reúne as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pelo quadro visceral: *Leishmania (L.) donovani* (Laveran & Mesnil, 1903), *Leishmania (L.) infantum* (Nicolle, 1908) e *Leishmania (L.) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937) que apresentam características epidemiológicas distintas.

Leishmania (Leishmania) donovani (Laveran & Mesnil, 1903) além da forma visceral clássica, pode provocar a leishmaniose dérmica pós-calazar em áreas restritas da Índia, Sudão, Paquistão, Nepal e regiões do leste da China.

Leishmania (Leishmania) infantum (Nicolle, 1908) tem ampla distribuição geográfica no Velho Mundo, atingindo partes dos continentes asiático, africano e europeu.

Leishmania (Leishmania) chagasi (Cunha & Chagas, 1937) possui ampla distribuição geográfica no Novo Mundo, ocorrendo na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Guadalupe, Honduras, Martinica, México, Paraguai e Venezuela. O cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado a principal fonte de infecção para o flebotomíneo, sendo importante na manutenção da doença (Deane & Deane, 1962; Quinnell *et al.*, 1997; Reithinger *et al.*, 2004). No Brasil, as raposas *Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous* possuem notável participação como hospedeiro silvestre nas regiões Nordeste (Deane & Deane, 1954) e Sudeste (Silva *et al.*, 2001) do país, e na Amazônia (Lainson *et al.*, 1969; Silveira *et al.*, 1982; Lainson & Shaw, 1987), respectivamente. Estudos realizados na Colômbia (Corredor *et al.*, 1989) e na região de Jacobina, no estado da Bahia (Sherlock *et al.*, 1984), relataram a ocorrência de gambás, *Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*, naturalmente infectados com *L. chagasi*.

Estudos isoenzimáticos e genéticos realizados com amostras de *L. infantum* e *L. chagasi*, provenientes de várias localidades, indicaram que as diferenças entre elas são tão restritas que não é possível diferenciá-las (Mauricio *et al.*, 2000; Dantas-Torres, 2006). Em função das características bioquímicas e moleculares serem muito

semelhantes entre essas espécies especula-se que *L. chagasi* é na verdade *L. infantum*, trazida para a América por colonizadores europeus através de cães infectados por *L. infantum* (Killick-Kendrick, 1990).

A leishmaniose visceral pode apresentar-se como uma zoonose ou antroponose, possui amplo espectro epidemiológico no mundo, com ocorrência em vastas áreas tropicais e subtropicais do mundo. Uma vez que a ocorrência de leishmaniose é de notificação obrigatória em apenas 32 dos 88 países que se apresentam endêmicos para a doença (WHO, 1995), verifica-se discrepância significativa entre o número de casos ocorridos e o número de casos registrados (Ashford *et al.*, 1992). No entanto, há estimativas que cerca de 350 a 400 milhões de pessoas, no mundo todo, estão sob risco de contrair leishmaniose e, que aproximadamente 12 a 14 milhões encontram-se infectadas (Ashford *et al.*, 1992; Mott *et al.*, 1995; WHO, 1995).

No Brasil a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, sendo que aproximadamente 1.600 municípios apresentam transmissão autóctone. Entre os anos de 1984 e 2002, o Ministério da Saúde registrou 48.455 casos de LV em território nacional. A média anual de casos nos últimos dez anos foi de 3.156 casos (Ministério da Saúde, 2003).

Os dados epidemiológicos da última década revelam a periurbanização e a urbanização da doença no país, destacando-se surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e, recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (Ministério da Saúde, 2003).

O aumento do número de casos e a expansão territorial da LV, humana e canina são devido às alterações epidemiológicas ocorridas nos últimos anos: a adaptação do ciclo de transmissão ao ambiente peridoméstico, como resultado da urbanização e desflorestamento; a ineficácia das campanhas de controle do vetor e reservatório; o surgimento de novos fatores imunodepressores, como a infecção pelo vírus causador da síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA); o aumento nas evidências da circulação de cepas resistentes ao tratamento e os intensos processos migratórios (Wijeyaratne *et al.*, 1994; WHO, 2002; Silva *et al.*, 2001; Reithinger & Davies, 2002).

Portanto, as leishmanioses parecem estar muito mais disseminadas e por isso devem possuir uma maior importância na saúde pública (Cardoso & Cabral, 1998).

2.2 - Leishmaniose visceral canina (LVC)

2.2.1 - A importância do cão como reservatório, no controle e profilaxia da leishmaniose visceral

Desde 1908, quando relataram pela primeira vez na Tunísia a presença de formas amastigotas em canídeos domésticos (Nicolle & Comte, 1908) e no Brasil (Deane & Deane, 1954; 1955a; 1955b; 1962) ao observarem intenso parasitismo cutâneo em cães e raposas do Ceará, os cães têm sido considerados como importantes reservatórios no ciclo doméstico da LV.

Os trabalhos conduzidos por Deane & Deane no nordeste brasileiro forneceram valiosa contribuição no esclarecimento do papel do cão como reservatório da *L. chagasi* e no estabelecimento dos aspectos principais da epidemiologia da LV na região. Além disso, determinaram a importância da raposa como reservatório silvestre do calazar, ao descreverem intenso parasitismo cutâneo na espécie *Dusicyon vetulus*, similar ao encontrado em cães e infectando flebotomíneos.

No Brasil, a alta prevalência da infecção canina próximo aos locais de ocorrência da doença em humanos, a preferência alimentar não-antropofílica do vetor e a abundância e íntima proximidade com que a população canina convive com os seres humanos são alguns fatores relacionados com a participação do cão na disseminação e manutenção da doença em humanos (Brenner, 1957; Lainson & Shaw, 1979).

Segundo Palatnik-de-Souza *et al.* (2001), o Brasil é o único país endêmico que regularmente conduz um programa epidemiológico e profilático no combate à doença composto pela integração de três medidas de saúde pública: o diagnóstico e tratamento dos casos humanos registrados, a identificação e a eliminação dos reservatórios domésticos (cães infectados) e a aplicação de inseticidas para eliminação do vetor (Ministério da Saúde, 2003). Para que o controle da LV seja eficaz, as medidas devem ser mantidas durante longo período evitando dessa forma a reativação de focos, uma vez que as medidas anti-vetoriais não têm obtido sucesso e um grande número de pacientes

não respondem à quimioterapia convencional com antimoniais, demonstrando a resistência das cepas locais a estas drogas (WHO, 1991).

Segundo dados da Gerência de Epidemiologia e Informação da cidade de Belo Horizonte, no ano de 2006 foram observadas 8.101 amostras positivas entre os 82.379 cães avaliados, que representa uma prevalência da ordem de 9,83% (Prefeitura de Belo Horizonte, 2007). Aproximadamente 25.000 cães soropositivos são eliminados todos os anos em nosso país (Tesh, 1995). O sacrifício de cães positivos, uma das principais ações profiláticas da LV recomendada pela OMS, vem sofrendo crescentes críticas por parte da sociedade, já que a população apresenta grande estima pelos animais (WHO, 1990; Desjeux, 1996; Alvar *et al.*, 2004). Dessa forma, um número cada vez maior de cães é submetido ao tratamento no Brasil, já praticado nos países da Europa. Diversos experimentos mostram que após o tratamento geralmente ocorre remissão temporária de sinais clínicos, seguida de recidivas (Alvar *et al.*, 1994; Vercammen *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 1999; Cavaliero *et al.*, 1999; Lamothe, 2001; Ikeda-Garcia *et al.*, 2007).

Desta forma a imunoprofilaxia representa uma eficiente ferramenta de controle, diversos estudos sugerem o uso de vacinas profiláticas, humanas ou caninas, substituindo o sacrifício animal (Marzochi *et al.*, 1985; Genaro, 1993; Dye, 1996; Da Silva *et al.*, 2000; Giunchetti *et al.*, 2007). Além disto, medidas de controle alternativas, tais como, o uso de coleiras impregnadas com inseticidas tópicos (deltametrina) tem sido recomendado para proteção dos cães contra as picadas de flebotomíneos e, conseqüentemente, para o bloqueio do ciclo de transmissão da doença (Killick-Kendrick, 1997; David *et al.*, 2001; Maroli *et al.*, 2001; Reithinger *et al.*, 2004).

2.2.2 - Aspectos clínicos da doença no cão

A doença clínica no cão é multifacetada com sintomatologia variada ou mesmo ausência de sinais clínicos e período de incubação de difícil estabelecimento. Segundo Genaro (1993), em infecções experimentais, o período de incubação que segundo o autor é caracterizado pelo encontro do parasito na medula óssea pode variar de três meses até vários anos. Estudos demonstraram que o período de incubação sofre influência da imunocompetência do hospedeiro, portanto, os sinais clínicos na LVC podem tornar-se evidentes no período de um mês a sete anos (Genaro, 1993; Vexenat *et*

al., 1994; Acedo-Sanchez *et al.*, 1996). Em cães susceptíveis, a partir de uma infecção cutânea localizada, o parasito pode disseminar via vasos linfáticos ou sanguíneos, infectando macrófagos da medula óssea, linfonodo, fígado e baço, bem como rins e trato gastrointestinal, podendo causar doenças crônicas, que culminam em morte na maioria dos casos (Genaro *et al.*, 1988; Reis *et al.*, 2006a).

A dificuldade do diagnóstico clínico se deve ao fato de 50-60% dos cães infectados não apresentarem sinais clínicos da doença (Lanotte *et al.*, 1979; Gradoni *et al.*, 1980; Mancianti *et al.*, 1986; Abranches *et al.*, 1991a; Brandonisio *et al.*, 1992), mas constituírem fonte de infecção para o vetor (Adler & Theodor, 1932; Alvar *et al.*, 1994; Molina *et al.*, 1994). Os cães infectados podem apresentar uma grande variedade de perfis clínicos, desde aparentemente saudáveis a severamente acometidos, sendo este grau de apresentação dos sinais clínicos determinado pela cepa do parasito, genética e estado imunológico do animal (Handman, 2001).

As manifestações clínicas da doença apresentam sinais inespecíficos, tais como, febre irregular por longos períodos, anemia, perda progressiva de peso, caquexia, hepatoesplenomegalia e hipertrofia dos gânglios linfáticos, principalmente poplíteos, pré-escapulares e submaxilares (Abranches *et al.* 1991b; Genaro, 1993).

Alterações dermatológicas são muito frequentes em animais portadores da LVC e raramente ocorrem na ausência de outros sinais clínicos da doença (Ferrer *et al.*, 1988). No quadro dermatológico clássico estão presentes: dermatite esfoliativa com formação de caspas, hipotricose e alopecia não-pruriginosa, dermatites ulcerativas, formação de pústulas e nódulos, hiperkeratose e despigmentação do focinho e coxins, descamação e alopecia focais das pinas, focinho e região periocular, onicogribose (Slappendel, 1988; Genaro, 1993; Koutinas *et al.* 1993; Solano-Gallego *et al.* 2004; Reis *et al.*, 2008).

A proliferação de linfócitos B, plasmócitos, histiócitos e macrófagos, nos órgãos linfóides pode resultar em linfadenomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia (Slappendel & Ferrer, 1998; Koutinas *et al.* 1999). A multiplicação de amastigotas em macrófagos do fígado produz uma hepatite crônica ativa (Ferrer, 1992; Noli, 1999; Blavier *et al.*, 2001). A deposição de imunocomplexos nos rins ocasionalmente resulta em glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite tubulointersticial e pode progredir

para um quadro de síndrome nefrótica ou insuficiência renal crônica (Ferrer, 1999; Noli, 1999).

Embora não estejam necessariamente presentes em todos os animais doentes, outros sinais são freqüentes como epistaxe, atrofia muscular, edema das patas, paresia das patas posteriores, diarreia, hemorragia intestinal, apatia, emaciação, onicogribose, ceratoconjuntivite e uveíte (Lanotte *et al.*, 1979; Marzochi *et al.*, 1985; Slappendel & Greene, 1990; Genaro, 1993). Viñuelas *et al.* (2001) demonstraram que o parasito pode atingir os tecidos cerebrais e produzir um quadro clínico conhecido como LVC cerebral, caracterizado por manifestações neurológicas e alterações na composição do líquido.

Mancianti *et al.* (1988) baseado no exame clínico de cães infectados por *L.infantum* na Ilha de Elba, Itália, classificaram clinicamente estes animais em três formas: cães assintomáticos (CA), com ausência de sinais clínicos sugestivos de infecção por *L. chagasi*; cães oligossintomáticos (CO), com pelagem opaca, alopecia localizada, emagrecimento moderado e/ou adenopatia linfóide; cães sintomáticos (CS), com todos ou alguns sinais severos da doença, característicos de LV ativa, tais como, alterações cutâneas (alopecia, eczema furfuráceo, úlceras, hiperqueratose), onicogribose, emagrecimento acentuado, ceratoconjuntivite, paresia dos membros posteriores, entre outras.

Estudos relatam a ocorrência de cura espontânea sendo que aproximadamente 15% dos cães infectados são capazes de se recuperar e eliminar os parasitos espontaneamente (Lanotte *et al.*, 1979; Gradoni *et al.*, 1987; Genaro *et al.*, 1992a).

A correlação de variáveis tais como, a idade, sexo e raça com a aquisição da infecção são contraditórios, apesar de muitos autores relatarem uma tendência de aumento da prevalência de infecção à medida que a idade progride (Alencar & Cunha, 1963; Lanotte *et al.*, 1975; Sideris *et al.*, 1996). Abranches *et al.* (1991a) notificaram a doença somente em cães adultos jovens e idosos. Com relação ao sexo, os trabalhos relatam que a condição de macho ou fêmea, para os cães, não favorece, nem beneficia a susceptibilidade à infecção (Pozio *et al.*, 1981; Abranches *et al.*, 1991a ; Sideris *et al.*, 1996; França-Silva *et al.*, 2003). Um estudo comparativo de Hasibeder *et al.* (1992) demonstrou que cães de raça de trabalho possuíam risco três vezes maior de adquirir a LVC comparado com as raças de companhia, possivelmente em consequência do tempo

despendido por estes grupos de raças em ambientes extradomiciliares e, portanto, a maior exposição ao inseto vetor.

2.2.3 - Alterações bioquímicas e hematológicas na leishmaniose visceral canina

Diversos pesquisadores relataram alterações bioquímicas e hematológicas na LVC com aplicações limitadas no diagnóstico da doença, porém, estas podem ser muito importantes na avaliação prognóstica e no acompanhamento do *status* clínico do animal, bem como na elucidação da patogênese (Ikeda *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2006a).

Dentre as alterações bioquímicas observadas na LVC, uma característica marcante é a disproteinemia, provocada pela marcada resposta imune humoral policlonal, que ocorre após a infecção. O desequilíbrio protéico é explicado pelo aumento das proteínas séricas totais, hiperglobulinemia devido ao ligeiro aumento das frações α e β -globulinas e ao aumento significativo da fração gama-globulina (hipergamaglobulinemia), hipoalbuminemia e conseqüentemente, inversão da relação albumina/globulina (A/G) (Groulade, 1983; Slappendel, 1988; Cardoso & Cabral, 1998; Noli, 1999). O trabalho de Reis *et al.* (2006a) confirmou esses achados e também demonstrou que o grupo de cães sintomáticos apresentou menor razão A/G quando comparado aos grupos de cães assintomáticos e não infectados.

Slappendel & Ferrer (1998) relataram em um estudo com 80 cães portadores de LVC que as elevações das atividades séricas das enzimas hepáticas alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA) ocorreram em 61 e 51% dos animais, respectivamente. Entretanto, a maioria dos trabalhos demonstra valores normais de ALT e aspartato amino transferase (AST) (Keenan *et al.*, 1984 a, b; Genaro, 1993; Amusategui *et al.*, 2003). A azotemia, entretanto, ocorre em aproximadamente 45% dos cães portadores de LVC (Slappendel & Greene, 1990), sendo que em somente 38% destes a creatinina está elevada. Amusategui *et al.* (2003) correlacionaram sintomatologia visceral em cães e aumento nos valores médios de uréia e creatinina, porém a porcentagem de casos no estágio avançado da doença, com elevação de ALT, uréia e/ou creatinina devido à disfunção renal ou falha hepática, foi relativamente baixa.

Vários estudos têm relatado uma alta produção de anticorpos durante a LVC ativa com elevadas concentrações de imunocomplexos circulantes de IgM e IgA e

depósito dos mesmos nos glomérulos, estabelecendo o que se denomina de glomerulonefrite mesangioproliferativa que irá levar a um quadro de disfunção renal (Tafari *et al.*, 1989; Margarito *et al.*, 1998). Os parâmetros laboratoriais mais importantes para a determinação dos danos renais são as proteínas totais, tanto no sangue quanto na urina, e a sua relação com a creatinina. A urinálise costuma revelar alterações típicas de um quadro de nefrite, isto é, proteinúria acompanhada de sedimento urinário contendo células epiteliais renais livres ou sob a forma de cilindros, glóbulos vermelhos e piócitos (Palácio *et al.*, 1995).

As alterações hematológicas descritas inicialmente na LVC por Laveran (1917), Alencar (1959), Detet (1979), Keenan *et al.* (1984a), Genaro *et al.* (1988), Abranches *et al.* (1991), Ciaramella *et al.* (1997), Koutinas *et al.* (1999), Ikeda *et al.* (2002) e Reis *et al.* (2006a) são anemia normocítica, normocrômica e não-regenerativa e linfocitose com leucopenia, que pode ser moderada ou acentuada. Em alguns casos podem ocorrer neutrofilia (Keenan *et al.*, 1984a) e trombocitopenia (Detet, 1979; Keenan *et al.*, 1984a).

A anemia é um sinal clínico freqüente na LVC ocorrendo em 50-70% dos casos, apesar da ocorrência de resultados discordantes (Moreno *et al.* 1998; Amusategui *et al.*, 2003). As possíveis causas da anemia são perdas de sangue devido à epistaxe e ulcerações de pele, hemólise associada com hiperesplenismo, inflamação generalizada, insuficiência renal e hipoplasia ou aplasia da medula óssea (Anosa & Idowu, 1983; Keenan *et al.* 1984a; Slappendel & Greene, 1990; Koutinas *et al.*, 1999). Em pacientes humanos com Kalazar (Knight *et al.*, 1967), como também em hamsters (Biswas *et al.*, 1995), a anemia foi associada com tempo de vida curto de eritrócitos. De Luna *et al.* (2000) demonstraram diminuição da fluidez lipídica da membrana de eritrócitos de cães com anemia proveniente da infecção por *L. chagasi*. Seqüestro de eritrócitos pelo baço devido ao aumento na rigidez celular, alterações nos mecanismos de citoaderência nos receptores/ ligantes de eritrócitos ou ambos poderiam ser conseqüência da diminuição da fluidez da membrana e contribuir com a anemia em cães infectados por *Leishmania*.

A mais freqüente alteração relatada no leucograma inclui leucopenia branda (Slappendel, 1988; Ferrer, 1992; Binhazim *et al.*, 1993) e uma inversão da contagem de leucócito, devido a um aumento de linfócitos e uma queda no número de neutrófilos (Binhazim *et al.*, 1993). Reis *et al.* (2006c) relataram anemia e leucopenia como

marcadores de disfunção hematológica associados com alta densidade parasitária e a forma sintomática grave na LVC.

A associação da LVC sintomática com leucopenia pode ser devido a um mecanismo multifatorial, na qual ocorre disfunção medular com hematopoese diminuída, afetada pelo intenso parasitismo na medula óssea, como também o recrutamento de leucócito e distribuição para os diversos órgãos (Alvar *et al.* 2004). Entretanto, discreta leucocitose associada à neutrofilia tem sido relatada na fase inicial da infecção enquanto Keenan *et al.* (1984a) e Amusatogui *et al.* (2003) relataram que cães com sinais cutâneos mostraram os maiores valores médios de eosinófilos.

Reis *et al.* (2006a) demonstraram que a evolução clínica da LVC em cães naturalmente infectados promove alterações nos parâmetros imunológicos, parasitológicos e bioquímico-hematológicos. Considerando o quadro hematológico, foi relatada anemia normocítica e normocrômica, com diminuição de hematócrito (Ht), hemácias e concentração de hemoglobina principalmente nos cães sintomáticos. Na avaliação da série branca houve linfocitose em cães assintomáticos e leucopenia caracterizada por monocitopenia, linfocitopenia e eosinopenia em cães sintomáticos. Com relação aos neutrófilos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos clínicos avaliados. Por outro lado, Costa-Val *et al.* (2007) não observaram correlação entre os valores de hematócrito e leucócitos e os sinais clínicos apresentados pelos cães, exceto em linfócitos, uma vez que, cães assintomáticos apresentaram linfocitose quando comparados aos demais grupos.

2.2.4 - Imunopatologia da leishmaniose visceral canina

A imunidade protetora contra a leishmaniose é mediada por células T e associada à produção de IFN- γ como foi demonstrado em cães (Cabral *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994), humanos e camundongos (Liew & O'Donnell, 1993). A depressão da imunidade celular em cães, assim como em humanos é manifestada por reação de hipersensibilidade tardia negativa na pele e ausência de resposta proliferativa *in vitro* (Carvalho *et al.*, 1981; Sacks *et al.*, 1987).

A resposta celular em cães através do teste de hipersensibilidade tardia (DTH), utilizando diversos antígenos, mostrou resultados variados: Battistini & Herrer (1945) obtiveram positividade em alguns animais com infecção experimental. Marzochi & Barbosa Santos (1988) e Genaro *et al.* (1992b) alcançaram resultados positivos utilizando antígenos diferentes em cães infectados por *Leishmania braziliensis*. Pinelli *et al.* (1994) e Cardoso *et al.* (2007) demonstraram que em cães assintomáticos a reação intradérmica é positiva.

A LVC em cães sintomáticos é caracterizada pela ausência de reação de hipersensibilidade tardia (DTH) (Cardoso *et al.*, 1998), diminuição de células T no sangue periférico (Pinelli *et al.*, 1994; De Luna *et al.*, 1999), e ausência de IFN- γ e IL-2 no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) *in vitro* (Pinelli *et al.*, 1994; Santos-Gomes *et al.*, 2002). Além disso, altos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* são detectados em animais sintomáticos (Abranches *et al.*, 1991a). Por outro lado, resistência a LVC foi inicialmente associada à ativação de células e produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (Pinelli *et al.*, 1994). O principal mecanismo envolvido na resposta imune protetora de cães infectados por *L. chagasi* é a ativação de macrófagos através de IFN- γ e TNF- α e morte de amastigostas intracelulares pela via do óxido nítrico (Pinelli *et al.*, 2000). O envolvimento de IL-10 na LVC ativa ainda é controverso. Estudos realizados utilizando sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) obtidos de cães sintomáticos e ensaios de ELISA altos níveis de IL-10 foram detectados (Pinelli *et al.*, 1999). Em contraste, concentrações baixas ou não detectáveis desta citocina foram encontradas no sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de animais oligossintomáticos e assintomáticos, respectivamente (Pinheiro *et al.*, 2005). Resultados semelhantes foram obtidos com relação aos níveis de IL-4 no mesmo estudo.

Com relação ao perfil de citocinas presentes na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, Quinnell *et al.* (2001) relataram que a expressão de mRNA IL-10, IL-4 e IL-18 não foi elevada em cães infectados. Entretanto, alguns cães infectados tiveram expressão detectável de mRNA IL-4 correlacionada significativamente aos sinais clínicos mais severos. Além disso, não foi detectada expressão de mRNA IL-13 tanto em cães controle como infectados. IFN- γ foi elevado

em cães infectados e positivamente correlacionado com resposta humoral (IgG1), mas não com respostas linfoproliferativas a antígenos de *Leishmania*.

Recentemente Lage *et al.* (2007) estudaram o perfil de citocinas expressas no baço em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas e graus de parasitismo. De forma interessante estes autores mostraram que 100% dos cães com alta carga parasitária apresentaram aumento da expressão de IL-10 quando comparados aos cães com baixo e médio parasitismo. O aumento do parasitismo foi correlacionado com a expressão de IL-10 na presença de IFN- γ . Portanto, foi observado que a LVC é marcada por uma produção balanceada de citocinas do tipo 1 (Th1) e 2 (Th2) com expressão de mRNA de IL-10 e IFN- γ que estão relacionadas à intensidade parasitária e a progressão clínica.

Estudos avaliando a LVC natural e/ou experimental relatam a ocorrência de ativação policlonal de linfócitos B com conseqüente elevação na produção de imunoglobulinas (Abranches *et al.*, 1991a; Genaro, 1993; Reis,2001; Reis *et al.*, 2006a,b; Giunchetti *et al.*, 2008). Embora não esteja bem definida na literatura a associação entre um padrão de resposta humoral anti-*Leishmania* associada à resistência ou susceptibilidade na LVC (Day, 2007), nosso grupo de pesquisa relata em cães assintomáticos, menores títulos de anticorpos circulantes, com presença predominante de IgG1 associada a uma menor freqüência de intensidade parasitária em diversos tecidos (Reis *et al.*, 2006a,b). Por outro lado, cães sintomáticos apresentaram elevada produção de imunoglobulinas tais como, IgG2, IgA, IgM e IgE (Reis *et al.*, 2006a,b). A presença de IgG2 e IgE na forma clínica sintomática poderia indicar uma associação dessa forma clínica com a resposta imune do tipo 2 (Th2) (Reis *et al.*, 2006b).

Ao avaliar o fenótipo de leucócitos do sangue periférico na LVC, Reis *et al.* (2006c) demonstraram aumento de linfócitos T CD5⁺ e das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) em cães assintomáticos em relação aos cães sintomáticos. Além disto, estes autores mostram que ocorre queda de linfócitos B CD21⁺ nos animais sintomáticos quando comparados aos cães não infectados e assintomáticos. Ao reagrupar os mesmos animais, considerando a carga parasitária da medula óssea, foram observados resultados semelhantes, como aumento de linfócitos T CD5⁺ e das subpopulações de linfócitos T CD8⁺ nos grupos com baixo e médio parasitismo quando comparado ao grupo com alto

parasitismo. Este último, por sua vez, apresentou queda na população de linfócitos B CD21⁺ e monócitos CD14⁺ em relação ao grupo com médio parasitismo.

2.2.5 - Métodos de diagnóstico na leishmaniose visceral canina

O diagnóstico da LVC é geralmente realizado através de testes sorológicos, tais como, RIFI e ELISA, associado com os aspectos clínicos e epidemiológicos. Entretanto, o diagnóstico definitivo da doença requer a demonstração direta do parasito em tecidos de animais suspeitos (Sacks *et al.*, 1993). O diagnóstico clinico-laboratorial da LVC é complexo pela prevalência de um grande número de animais assintomáticos (Lanotte *et al.*, 1979; Gradoni *et al.*, 1980; Mancianti *et al.*, 1986; Abranches *et al.*, 1991a; Brandonisio *et al.*, 1992). Observam-se ainda que os sinais clínicos da doença sejam muito semelhantes aos de outras enfermidades infecciosas, além da ocorrência de reações cruzadas nos testes sorológicos (Grimaldi & Tesh, 1993). A natureza crônica dos sinais clínicos da doença e o seu longo período de incubação são fatores responsáveis pelo atraso ou mesmo falha no diagnóstico clínico (Slappendel, 1988).

A forma mais segura do diagnóstico da LV é a observação de amastigotas do parasito. As técnicas parasitológicas são comumente empregadas para demonstração do parasito em tecidos linfóides, no fígado, baço, pele e medula óssea. O parasito pode ser pesquisado através de punção da medula óssea, de gânglios, fígado, baço, biopsia ou escarificação de pele e esfregaços de matriz ungueal (Genaro, 1993). Esse material coletado é utilizado no preparo de esfregaços por aposição de tecidos corados pelo *Giemsa*, confecção de lâminas por técnicas histopatológicas, inoculação em hamsters, cultivo *in vitro* e pesquisa de DNA pela PCR (De Andrade *et al.*, 2006).

A biopsia de medula óssea pode ser realizada nas costelas, na crista ilíaca da tíbia e no esterno sendo esta mais sensível que a de linfonodos (Bryceson, 1996; Cardoso & Cabral, 1998). Estudos relatam que o exame da medula óssea fornece resultados positivos apenas durante os estágios avançados da LVC (Abranches *et al.*, 1991a), portanto, a sensibilidade deste método é variável, sendo o diagnóstico mais difícil nas situações onde a carga parasitária é menor (Ashford, 1995).

Um grande avanço nos métodos parasitológicos é a possibilidade de tais testes permitirem a avaliação da infecção através da densidade parasitária ou “*Leishman Donovan Units*” (LDU). Reis *et al.* (2006a) demonstraram que a densidade parasitária

na pele, medula óssea e baço aumentaram de acordo com a gravidade das manifestações clínicas. Além disso, observaram que todos os cães infectados apresentaram maior parasitismo na pele quando comparado à medula óssea. Esses achados reforçam a importância da densidade parasitária cutânea no diagnóstico da LVC bem como na transmissão da doença de cães assintomáticos a espécies susceptíveis de flebotomíneos (França-Silva, 2003).

Os testes sorológicos são usados para diagnóstico em áreas endêmicas e também como ferramentas em estudos epidemiológicos, uma vez que a excessiva produção de anticorpos observada no decorso da infecção facilita o diagnóstico. Entretanto, a reatividade cruzada com outros tripanossomatídeos, bem como a inexistência de um teste que apresente 100% de sensibilidade e especificidade dificulta o diagnóstico sorológico (Costa *et al.* 1991; Dye *et al.*, 1993). Dentre as técnicas sorológicas mais usadas no diagnóstico de rotina da LVC, a RIFI (reação imunofluorescência indireta) é considerada padrão ouro. Por outro lado, ELISA (ensaio imunoenzimático) e DAT (teste de aglutinação direta) têm sido relatadas como mais sensíveis e práticas nos estudos epidemiológicos (Evans *et al.* 1990; Cardoso *et al.*, 2007). Ferreira *et al.* (2007) demonstraram que RIFI, ELISA e DAT apresentaram 100% de especificidade quando testados em soros de cães apresentando exame parasitológico positivo ou negativo apenas para Leishmaniose. Em amostras de soros de cães infectados por outros parasitos (*T.cruzi*, *L. braziliensis*, *Toxoplasma gondii*, *Ehrlichia canis*) apenas a taxa de especificidade de DAT permaneceu alta (95%), enquanto ELISA e RIFI apresentaram taxas de especificidades de 60 e 45%, concordando com relatos prévios da presença de reação cruzada em RIFI e ELISA quando amostras de soro de cães infectados por *T.cruzi* e *L. braziliensis* foram analisadas (Costa *et al.*,1991).

Um outro teste baseado em imunocromatografia em papel, TRALd - Teste Rápido Anticorpo *Leishmania donovani* utilizando a proteína recombinante rK-39, foi avaliado por Genaro *et al.* (1997) no diagnóstico da LVC em área endêmica e demonstrou 92,1% de sensibilidade e 99,5% de especificidade quando comparado com a RIFI. Entretanto, foi demonstrado que este teste é título dependente com relação à RIFI, uma vez que cães com títulos até 1:640 na RIFI podem ser negativos no TRALd, o que indica uma necessidade de aprimoramento da técnica (Genaro *et al.*, 1997).

Recentemente, métodos moleculares, tais como, reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido usada no diagnóstico da LVC e apresentam alta sensibilidade e especificidade detectando quantidades mínimas do DNA do parasito nas mais variadas amostras (Lachaud *et al.*, 2002; Cortes *et al.*, 2004). Porém, tal ferramenta de diagnóstico não é prática para o uso em larga escala, como requerido em levantamentos epidemiológicos (Reed, 1996). Quando comparada com imuno-histoquímica e histologia convencional, a PCR mostrou-se mais sensível para o diagnóstico parasitológico da LVC, a partir da mesma amostra clínica (Xavier *et al.*, 2006).

2.3 - Medula óssea em cães

Um dos primeiros relatos na literatura a respeito da citologia de medula óssea em cães foi realizado por Alexandrov (1930). Este pesquisador avaliou material colhido por biopsia do esterno de 12 cães e relatou a porcentagem de distribuição das células da medula óssea destes animais.

Posteriormente Stasney (1937), demonstrou em um estudo comparativo utilizando medula óssea da costela, porção proximal e medial do fêmur de cães saudáveis que as três regiões possuem uma mesma tendência na porcentagem da distribuição relativa de células, indicando que um mecanismo uniforme regula a hematopoese nas diferentes porções de medula óssea canina. Assim como Van Loon (1943), que também relatou similaridade na distribuição da celularidade em filmes de medula óssea da costela e “*imprints*” de medula óssea do fêmur.

Rekers (1948) em seu estudo utilizando sangue periférico e medula óssea da costela, fêmur, tíbia e úmero de cães saudáveis, descreveu morfologicamente as células da medula óssea e demonstrou distribuição celular uniforme nas diferentes regiões de medula óssea. Estes estudos são altamente relevantes uma vez que definiram a homogeneidade em relação à morfologia dos elementos celulares colhidos em ossos distintos da anatomia canina.

Segundo Lazarus (1968), há uma clara associação entre o perfil do hemograma e do mielograma em um mesmo animal tanto em cães saudáveis quanto nos doentes. Mais tarde Hoff *et al.*, (1988), avaliaram os achados do sangue periférico e medula óssea de

cães normais e cães portadores de várias doenças, tais como, anemia, trombocitopenia, insuficiência renal, mielofibrose e outras.

Embora haja relatos na literatura de estudos de medula óssea em muitas espécies domésticas com propósito de pesquisa, médicos veterinários têm evitado o uso de biopsia e aspirado de medula óssea como um auxílio no diagnóstico. Dentre as razões pelas quais isto ocorre, estão a falta de conhecimento da técnica, dos locais de coleta e como interpretar os resultados (Penny, 1974).

O exame detalhado da medula óssea fornece o estado hematopoético do indivíduo, uma vez que a medula óssea é o principal órgão hematopoético e importante como órgão linfóide primário e secundário (Picker & Siegelman, 1999). Além disso, quando avaliado em conjunto com o hemograma, o exame de medula óssea fornece informações relacionadas ao sistema hematopoético que poderiam ser perdidas unicamente com o exame do sangue periférico (Travlos, 2006a). Dentre as várias indicações do exame de medula óssea, estão as anemias não-responsivas, algumas anemias megaloblásticas ou microcíticas, neutropenias persistentes, citopenias ou pancitopenias inexplicadas, distúrbios linfoproliferativos ou mieloproliferativos (Jain, 1993).

Um dos grandes dilemas na clínica da LV humana encontra-se no diagnóstico diferencial entre a leishmaniose e leucemias (Ministério da Saúde, 2003; Singh *et al.*, 2003) em função das diversas alterações hematológicas observadas no decurso das diferentes formas clínicas principalmente na forma aguda e na forma crônica clássica do calazar (Miescher *et al.*, 1982).

Em humanos com LV tem sido observada medula óssea hiperclular (El-Shoura, 1994; Kumar *et al.*, 2007) e hiperplasia eritróide com eritroblastos apresentando alterações diseritropoéticas (Wickramasinghe *et al.*, 1987; Shahriar *et al.*, 1999; Sheikha, 2004). Formas amastigotas de *L.donovani* são encontradas na medula óssea dentro de macrófagos e ocasionalmente em neutrófilos e eosinófilos (Wickramasinghe *et al.*, 1987; El-Shoura, 1994). Segundo o Ministério de Saúde (2003), há alterações no parênquima medular humano que podem ser observadas na LV, tais como: hipocelularidade granulocítica, com diminuição de neutrófilos segmentados e aumento de promielócitos e mielócitos neutrófilos, hiperclularidade eritróide relativa, linfocitose, plasmocitose, número aumentado de macrófagos e megacariócitos normais

ou ligeiramente diminuídos. Além disso, a positividade com a presença do parasito nos filmes varia entre 70-80%. Pastorino *et al.* (2002) relataram positividade em 85,7% dos pacientes com LV através do mielograma e/ou mielocultura. Dessa forma, recomenda-se associar mielocultura ao mielograma para aumentar a chance de positividade (Sinha *et al.*, 1993). Há alguns estudos relatando síndrome hemofagocítica associada à LV, que ocorre devido à proliferação excessiva, não-maligna de histiócitos, com resultante hemofagocitose (Dash *et al.* 2005; Agarwal *et al.*, 2006; Mathur *et al.*, 2007).

Entretanto, pouco se conhece a respeito das alterações medulares em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Há alterações medulares relatadas em cães que coincidem com as alterações relatadas em humanos: aumento na população de monócitos e macrófagos e plasmócitos (Tryphonas *et al.*, 1977; Anosa & Idowu, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1983), eritrofagocitose e displasia eritróide (Foglia *et al.*, 2006), assim como há alterações controversas: hiperplasia granulocítica (Anosa & Idowu, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1983), hipoplasia eritróide, hiperplasia mielóide, neutrofilica e eosinofílica (Foglia *et al.*, 2006).

2.4 - Hematopoese

A produção das células do tecido sangüíneo tem início na fase embrionária, mais precisamente no saco vitelino, de onde as “*stem cells*” embrionárias migram para o fígado, baço, medula óssea e timo, que constituem os órgãos hematopoéticos fetais dos recém-nascidos. No animal adulto estas células são produzidas na medula óssea, baço e, em alguns animais, no timo (Zon, 1995; Feldman *et al.*, 2000).

A hematopoese é realizada no sistema hematopoético, o qual é constituído por células-tronco hematopoéticas (CTH), célula precursora, células sangüíneas morfofuncionalmente maduras e tecido de sustentação da hematopoese (microambiente hematopoético), localizado nas cavidades medulares de ossos chatos e longos, baço, fígado, linfonodo e timo (Gasper, 2000). Para a hematopoese ocorrer é necessário um microambiente capaz de reconhecer e reter “*stem cells*” hematopoéticas e fornecer os fatores, tais como citocinas, requeridos para suportar a proliferação, diferenciação e maturação das “*stem cells*” (Travlos, 2006b). O tecido hematopoético é sensível a

influências externas e pode tornar-se suprimido em resposta à restrição alimentar, desnutrição, inflamação crônica, toxicidade e distúrbios neoplásicos e proliferativos (Reagan, 1993; Weiss, 2000).

O sistema hematopoético é uma rede integrada de células que inicia o ciclo contínuo de diferenciação de uma pequena população de CTH, que são pluripotentes, e que dão origem a todas as células heterogêneas funcionais do sangue e do sistema imune, fundamentando a teoria monofilética da origem do sangue (Gasper, 2000). Divide-se em três compartimentos morfofuncionais distintos: compartimento das “*stem cells*” (células pluripotentes), compartimento das células progenitoras e compartimento das células precursoras. As células do compartimento das “*stem cells*” (pluripotente) possuem a capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação, contudo, poucas células deste compartimento estão mitoticamente ativas, já que a maioria permanece no estágio G0 do ciclo celular. Estas células representam 0,05% das células da medula óssea de camundongos e do homem (Morrison *et al.*, 1995).

Os elementos celulares do compartimento de células progenitoras eritropoéticas BFU-E (*burst forming unit-erythroid*) e CFU-E (*colony forming unit-erythroid*) possuem uma capacidade limitada de auto-renovação, mas entram no ciclo celular em maior número que as células do compartimento das “*stem cells*” (Gasper, 2000), enquanto as células do compartimento precursor são células blásticas, comprometidas com os processos de eritropoese, leucopoese, linfopoese e trombopoese. São as células mais abundantes no ambiente medular e, apesar de estarem ativas no ciclo celular, não possuem a capacidade de autorenovação (Gasper, 2000).

2.4.1 - Eritropoese

O processo de desenvolvimento do eritrócito é denominado eritropoese, abrange uma série de alterações morfológicas sucessivas que resultam na produção de eritrócitos. No adulto o tecido eritropoético encontra-se na extremidade proximal dos ossos longos e chatos e no esterno. Nesse local, ocorre a formação inicial de células progenitoras chamadas BFU-E. As BFU-E se maturam em CFU-E, capazes de formar pequenos agrupamentos de eritroblastos associados à hemoglobina (Car,2000).

O processo de eritropoese ocorre em uma unidade microanatômica denominada de ilha eritroblástica, a qual é formada por um macrófago central (denominada de célula enfermeira) circundado por um anel de células eritróides em desenvolvimento. As ilhas eritróides são estruturas frágeis e, por isso, raramente estão presentes no aspirado de medula óssea. Os precursores eritróides estão unidos ao macrófago através de moléculas de adesão, como a VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), a caderina, o colágeno do tipo I e IV, fibronectina e trombospondina (Car, 2000). Jain (1993) relata que quando as células eritróides vão maturando, estas se distanciam do macrófago e fazem contato com as células endoteliais dos sinusóides através das moléculas de adesão e com isso entram na circulação sangüínea.

Conforme Car (2000) a expressão dessas moléculas geralmente é alta nas BFU-E e nas CFU-E, e diminuem progressivamente conforme a maturação da célula eritróide. Na linhagem eritróide, as células das BFU-E são as primeiras a expressar receptores para eritropoetina, mas a expressão máxima destes receptores ocorre nas células das unidades formadoras de colônias de eritrócitos (CFU-E). A partir daí, as células precursoras de eritrócitos apresentam uma diminuição gradativa de receptores para este hormônio (Moritz *et al.*, 1997).

Car (2000) relata que os fatores de crescimento agem sinergicamente com a eritropoetina, contudo, estes não são capazes de induzir por si só a eritropoese *in vitro*. Entre os fatores que estimulam o crescimento eritropoético, estão a IL-3, IL-6, IL-11, fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento de hepatócitos, trombopoetina, testosterona.

2.4.2 - Mielopoese

Segundo Gasper (2000), as células pluripotentes ou “*stem cells*” (CFU-S) são comuns aos elementos hemopoéticos presentes na medula óssea. Pelo fato de originarem os precursores de todas as células sangüíneas, através da formação de células progenitoras específicas, tem-se um precursor da série granulocítica/ eritróide/ monocítica/ megacariocítica (CFU-GEMM) e um precursor para a série linfóide (CFU-L).

A célula progenitora CFU-GEMM originará os precursores para cada uma das séries hemopoéticas, como segue:

- Formação de BFU-E e CFU-E que originará células precursoras da eritropoese e finalmente os eritrócitos;
- Formação de BFU-MK e CFU-MK que originará megacarioblasto, megacariócitos e plaquetas;
- Formação de CFU-GM e CFU-M que originará monoblastos e monócitos;
- Formação de CFU-GM e CFU-G (neutrófilo), CFU - Eo (eosinófilo) e CFU-Ba (basófilo) que originará mieloblastos, promielócitos, células precursoras dos granulócitos e finalmente os granulócitos;

A célula progenitora CFU-L originará os precursores CFU-T e CFU-B, pró-linfócito T e B e, posteriormente, linfócitos T e B.

Cada etapa da mielopoese pode ser influenciada por fatores estimulatórios, tais como, citocinas, por exemplo. A IL-1, IL-3, IL-6 e o GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) são significativos para a maturação dos polimorfonucleares, macrófagos, basófilos e eosinófilos. A IL-7 é importante para o amadurecimento dos linfócitos B e T. Similarmente, G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) atua nos estágios iniciais e tardios da granulopoese (Hammond *et al.*, 1990; Nash *et al.*, 1994).

3. JUSTIFICATIVA

O crescimento da periurbanização e urbanização da LVC, aliado ao aumento do número de casos em nosso meio, bem como dos inconsistentes relatos da literatura sobre diversas alterações hematológicas conseqüentes à infecção, motivou o desenvolvimento do presente estudo. Já estão bem conhecidos os aspectos epidemiológicos relativos à transmissão da doença, no entanto, algumas lacunas permanecem obscuras no que tange à caracterização exata das alterações hematológicas que ocorrem no curso da LVC, principalmente em relação às diferentes formas clínicas apresentadas pelo animal infectado. Além disto, ainda não sabemos qual o impacto do parasitismo medular sobre a eritropoese e leucopose na LVC.

Considerando o caráter emergente da LV e o importante papel do cão na disseminação e manutenção da doença apresentando parasitismo cutâneo e visceral, sendo a medula óssea como um compartimento fundamental no processo da gênese celular e um dos órgãos mais acometido por amastigotas com relatos de alterações caracterizadas por displasia e aplasia; torna-se de fundamental importância estabelecer o padrão hematológico medular nas diferentes populações de células da linhagem eritroblástica e leucoblástica. Estas alterações ainda não foram estabelecidas em diferentes formas clínicas da LVC e em diferentes graus de parasitismo. Diante do confundimento diagnóstico da LV com leucemias e da importância dos cães como modelo para doença humana, este estudo se propõe a avaliar detalhadamente a celularidade da medula óssea buscando caracterizar suas particularidades hematopoéticas.

4. OBJETIVOS

4.1 - Objetivo geral

- Avaliar detalhadamente a celularidade da medula óssea das séries eritroblástica e leucoblástica em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) chagasi*.

4.2 - Objetivos específicos

- Avaliar em cães categorizados por forma clínica ou carga parasitária na LVC:
 - Alterações no perfil da celularidade da série eritroblástica;
 - Perfil da celularidade das séries leucoblásticas;
 - As taxas de maturação celular na medula óssea.
- Correlacionar as alterações do mielograma e hemograma em um grupo de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 - Animais - seleção e manejo dos cães

Os cães (*Canis familiaris*) utilizados no presente estudo foram distribuídos em dois grupos. O grupo 1 compreendia um total de 187 animais onde 159 eram cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção e 28 cães não infectados, sem raça definida (SRD), com idade variando entre 1-6 anos provenientes do Centro de Controle de Zoonoses cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Esses animais são pertencentes a um projeto de campo conduzido pelo Prof. Alexandre Barbosa Reis durante o período de 1999-2003. O projeto compreendia o preenchimento de formulário com dados do cão (nome, idade, sexo), coleta de sangue para exames sorológicos, coleta de medula óssea para realização do mielograma e parasitológico e avaliação clínica para detectar a presença de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*.

Os testes sorológicos, tais como RIFI, considerado no período deste estudo “padrão ouro” para diagnóstico da LVC, foi utilizado para selecionar cães infectados e cães não infectados. Cento e cinquenta e nove cães apresentaram títulos para RIFI >1:40, os quais foram considerados positivos e 28 cães com RIFI negativo na diluição do soro de 1:40 e exames parasitológicos negativos para *Leishmania* foram considerados não-infectados (CNI). A infecção por *L. chagasi* foi confirmada em todos os cães RIFI positivos através de pelo menos um método sorológico adicional, incluindo ELISA e ELISA r-K39 e/ou exame parasitológico como descrito abaixo. Esses dados, juntamente com os sinais clínicos e a classificação clínica do cão avaliado, foram planilhados no Banco de Dados Access para posteriores consultas.

Os animais do grupo 2 são também cães naturalmente infectados e foram cedidos pelo Centro de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte - MG, porém passaram obrigatoriamente por um período de quarentena antes da realização dos experimentos. Os animais do grupo controle pertencente ao grupo 2 são cães nascidos criados e mantidos no canil do Laboratório de Leishmanioses do departamento de Parasitologia do ICB-UFMG e integraram o grupo de cães não infectados da Tese de Doutorado do Prof. Alexandre (Reis, 2001). Este grupo era compreendido por 17 cães

não infectados e 10 cães assintomáticos, 9 cães oligossintomáticos e 12 cães sintomáticos totalizando 31 cães naturalmente infectados por *L. chagasi* caracterizados clinicamente da mesma forma descrita abaixo utilizada para classificação do grupo 1.

5.1.1 - Quarentena

Antes da chegada dos animais, as celas foram submetidas ao “vazio sanitário”, que consistiu na desinfecção das mesmas através de lavagens com solução de hipoclorito a 1%. Foi mantida inspeção periódica do ambiente externo e desinsetização trimestral com piretróide (k-otrine) para impossibilitar a presença de flebotomíneos.

Além disso, os cães foram submetidos à coleta de fezes para o diagnóstico de infecções por protozooses ou helmintíases intestinais e coleta de sangue para triagem sorológica através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Em seguida, receberam tratamento anti-helmíntico de largo espectro (Endal Plus[®]), composto de febantel, palmoato de pirantel e praziquantel, além de banho com inseticida de ação ectoparasitária (Butox[®], Quimio) e imunizados contra parvovirose, leptospirose, raiva, influenza e hepatite (HTLP 5CV-L vacina Pfizer[®]). Posteriormente foram identificados em fichas, conforme suas características físicas (sexo, tamanho, cor, pelagem, etc.), numerados e mantidos em quarentena. Durante este período os cães foram vistoriados diariamente e examinados semanalmente e após 15 dias foi realizado novo exame coproparasitológico, para certificarmos da eficácia do tratamento anti-helmíntico, bem como análise ectoscópica, para avaliar a eficiência da ação do inseticida. Os animais foram mantidos no canil do ICB/UFMG, com água potável e ração balanceada (Kinus[®] - BRASWEY-SA), fornecida “*ad libitum*”. Após o período de quarentena foram realizados testes sorológico, parasitológico, mielograma e hemograma completo com o objetivo de conduzir as análises de correlação entre a celularidade na medula óssea e no sangue periférico.

5.1.2 - Caracterização clínica dos cães do grupo 1

Após a avaliação clínica, os cães foram então classificados clinicamente de acordo com a ausência ou presença de sinais da infecção, em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, conforme Mancianti *et al.* (1988) e subdivididos em quatro grupos clínicos:

Grupo I - Cães não infectados (CNI): Compreendido por 28 cães sadios. Estes animais apresentaram exames sorológicos e parasitológicos negativos para leishmaniose e ausência de sinais clínicos sugestivos da infecção por *Leishmania*.

Grupo II - Cães assintomáticos (CA): Composto por 50 cães com sorologia positiva pelas reações de imunofluorescência indireta e/ou ELISA que não apresentaram sinais clínicos sugestivos da infecção por *L. chagasi* após exame clínico.

Grupo III - Cães oligossintomáticos (CO): Composto por 44 cães com sorologia positiva pelas reações de imunofluorescência indireta e/ou ELISA apresentando no máximo até três dos sinais clínicos da doença, entre eles: opacificação da pelagem, alopecia localizada e emagrecimento moderado.

Grupo IV - Cães sintomáticos (CS): Composto por 65 cães com sorologia positiva pelas reações de imunofluorescência indireta e/ou ELISA e sinais clínicos da doença, entre eles: pelagem opaca, onicogribose, lesões cutâneas, emagrecimento acentuado, apatia e ceratoconjuntivite, característicos de leishmaniose visceral ativa.

Na Tabela 1 estão relatados os sinais clínicos observados que permitiram a alocação dos cães aos grupos CNI, CA, CO e CS. Os sinais clínicos encontram-se descritos nesta tabela mostrando o número de animais e percentual por grupo para cada sinal clínico observado.

Tabela 1: Principais sinais clínicos utilizados na classificação dos cães

SINAIS CLÍNICOS	NÚMERO DE ANIMAIS (%)			
	GRUPOS CLÍNICOS			
	CNI (n=28)	CA (n=50)	CO (n=44)	CS (n=65)
Pelagem Opaca	A	A	13 (29,5%)	33 (50,8%)
Alopecia Localizada	A	A	19 (43,2%)	34 (52,3%)
Onicogribose	A	A	A	42 (64,6%)
Ceratoconjuntivite	A	A	A	15 (23,0%)
Opacificação das Córneas	A	A	1 (2,3%)	4 (6,1%)
Úlceras Localizadas	A	A	6 (13,6%)	14 (21,5%)
Úlceras Generalizadas	A	A	A	2 (3,0%)
Paresia das Patas	A	A	A	3 (4,6%)
Edema das Patas	A	A	A	1 (1,5%)
Emagrecimento Moderado	A	A	18 (40,9%)	20 (30,8%)
Emagrecimento Severo	A	A	A	15 (23,0%)

As observações clínicas estão expressas em número de cães com determinado sinal clínico por grupo e entre parênteses como percentagem; A (Ausente); n = número de cães em cada grupo.

5.2 - Coleta de material

5.2.1 - Sangue

As amostras sanguíneas foram coletadas a partir da veia cefálica com auxílio de agulha e seringa estéreis (BD Plastipak[®], Becton Dickinson Ltda, Brasil). A região da coleta foi previamente submetida à anti-sepsia com álcool iodado a 70%. Um volume total de 9 mL de sangue foi colhido e fracionado em três alíquotas de 3 mL cada. Cada

alíquota foi vertida em tubos de vidro individuais, sendo que, em apenas um dos tubos havia solução anticoagulante de EDTA a 10% (na proporção de 1mg/mL). O sangue coletado com anticoagulante foi destinado às avaliações hematológicas, enquanto que os outros dois tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante dez minutos e tiveram seus sobrenadantes alíquotados e encaminhados para as avaliações sorológicas.

5.2.2 - Medula óssea

A coleta de medula óssea foi realizada como descrita por Penny *et al.* (1970).

Para realização deste procedimento, os animais foram tranqüilizados com Cloridrato de Xilazina 2% na dosagem de 0,1 mL/kg de peso por via intravenosa, após 10 minutos foi administrado anestésico geral, Tiopental Sódico 2,5% (Thionembutal[®]), na dose de 0,5mL/kg de peso por via intravenosa.

O cão foi posicionado sentado para coleta no esterno ou em decúbito lateral para coleta na crista da tíbia e após tricotomia e anti-sepsia local (Polivinil Pirrolidona Iodo 10% - PVPI Tópico), uma agulha acoplada a uma seringa descartável (BD Plastipak[®], Becton Dickinson Ltda, Brasil) de 20 mL foi posicionada verticalmente na extremidade inferior do esterno ou na crista da tíbia e, por meio de movimentos rotatórios, foi exercida uma pressão até atingir a cavidade medular e, posteriormente, procedeu-se à aspiração do material medular. Um volume máximo de 0,5 mL de medula óssea foi aspirado por coleta. Imediatamente, após a retirada da agulha, uma gota do aspirado foi colocada em lâmina de vidro previamente desengordurada com éter para realização dos filmes, seguindo a mesma técnica dos filmes sanguíneos, tendo sido realizados dois filmes por animal.

As lâminas contendo os filmes foram identificadas com o número do cão e coradas pelo *Giemsa* e guardadas para posterior observação ao microscópio óptico, em aumento de 100X, para avaliação descritiva e para pesquisa de formas amastigotas do parasito no filme.

Os cães infectados por *Leishmania* não receberam tratamento para LVC e foram eutanasiados após a coleta de medula óssea. Pelo fato do tratamento para LVC não estar oficialmente permitido no Brasil, todos os cães infectados devem ser submetidos à

eutanásia conforme recomendação do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV).

5.3 - Realização do mielograma

A contagem diferencial de células da medula óssea foi realizada por meio de microscópio óptico em aumento de 100X e um contador diferencial de células sanguíneas. Ao analisar a lâmina, campos de melhor celularidade e coloração (área próxima à franja do filme) foram escolhidos para se proceder a uma contagem diferencial de 500 células. Na diferenciação celular, foi utilizada a classificação segundo Penny (1974), Jain (1986), Harvey (2001), como representado no diagrama 1. A lâmina foi observada percorrendo todos os campos e analisando a morfologia das células presentes no filme, abrangendo séries eritropoética, leucopoética e megacariopoética.

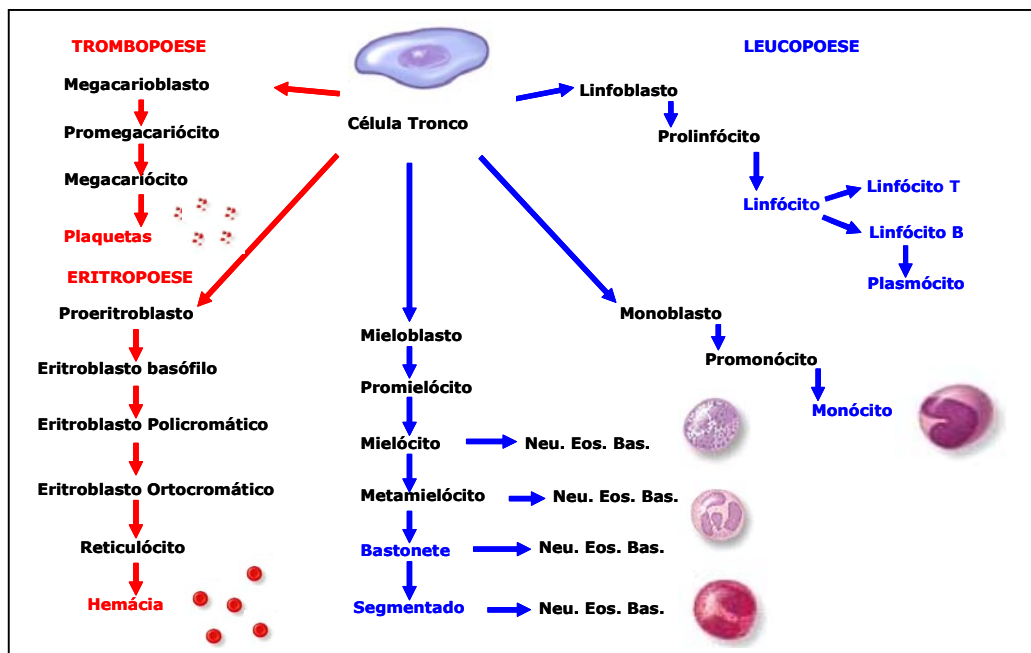
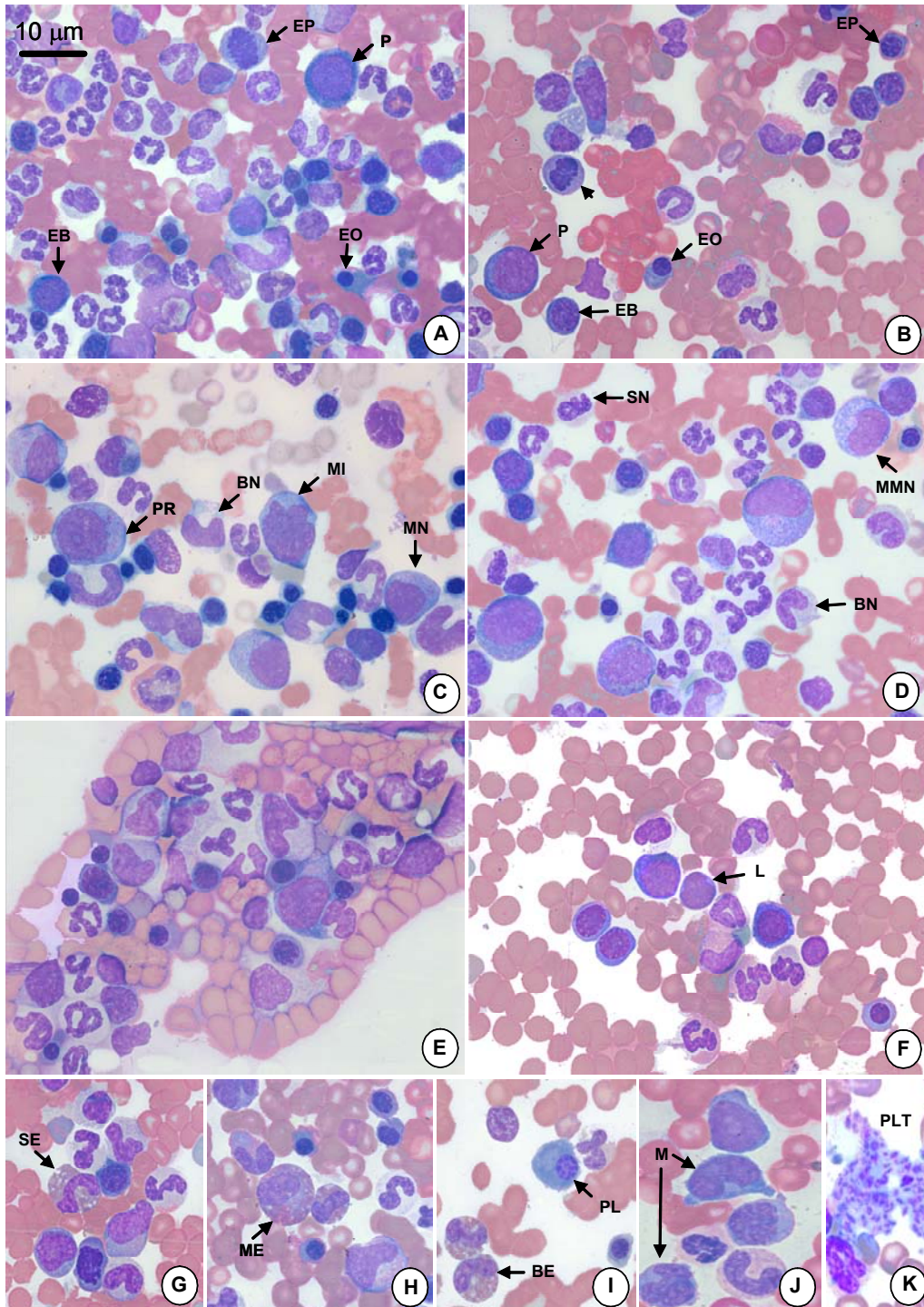


Diagrama 1: Esquema representativo da progressão de maturação das linhagens celulares presentes na medula óssea avaliadas neste estudo; Neu. = neutrófilo; Eos. = eosinófilo; Bas. = basófilo.

Na prancha 1 estão representados os principais tipos celulares encontrados em filmes de medula óssea de cães classificados morfologicamente de acordo com o anexo 1.



Prancha 1: Fotomicrografias do filme de medula óssea de cães, com os tipos celulares representados por siglas. (A) e (B) Células da linhagem eritropoética em diferentes estágios. P = Proeritoblasto; EB = Eritroblasto basófilo; EP = Eritroblasto policromático; EO = Eritroblasto ortocromático. Célula eritropoética em divisão mitótica (cabeça de seta). (C) e (D) Células da linhagem leucopoética (precursoras e da linhagem neutrofílica) em diferentes estágios. MI = Mieloblasto; PR = Promielócito; MN = Mielócito neutrófilo; MMN = Metamielócito neutrófilo; BN = Bastonete neutrófilo; SN = Segmentado neutrófilo. (E) Microambiente medular composto de células hematopoéticas das linhagens vermelha e branca. (F) L = Linfócito. (G) SE = Segmentado eosinófilo. (H) ME = Mielócito eosinófilo. (I) BE = Bastonete eosinófilo; PL = Plasmócito. (J) M = Monócito. (K) PLT = Plaquetas. Coloração: *Giemsa*, Barra=10µm.

5.4 - Captura de imagens e análise morfológica

Para fotodocumentação das características morfológicas, parasitismo e alterações celulares foi realizada a captura de imagens (programa Leica Application Suite - Versão 2.4.0 R1) com a objetiva de 100x e utilização de microcâmara acoplada a microscópio Leica DM5000B.

5.5 - Estabelecimento das taxas de maturação

As diferentes razões foram calculadas (Tabela 2) de acordo com Winqvist (1954), Hoff *et al.* (1985) e Mischke *et al.* (2002).

Tabela 2: Cálculo das diferentes razões (taxas de maturação) para determinação numérica da celularidade na medula óssea

TAXAS DE MATURAÇÃO	Cálculo da fórmula
Razão M:E	Nº. de células mielóides/ Nº. de células eritróides nucleadas
Razão I:M	Nº. de mieloblastos + promielócitos + mielócitos/ Nº. de metamielócitos + bastonetes + segmentados
Razão I:Mg	Nº. de mieloblastos + promielócitos + mielócitos neutrófilos/ Nº. de metamielócitos neutrófilos + bastonetes neutrófilos + segmentados neutrófilos
MMI (1/razão I:Mg)	Nº. de metamielócitos neutrófilos + bastonetes neutrófilos + segmentados neutrófilos/ Nº. de mieloblastos + promielócitos + mielócitos neutrófilos
Razão I:Me	Nº. de proeritroblastos + eritroblastos basófilos/ Nº. de eritroblastos policromáticos + eritroblastos ortocromáticos
EMI (1/razão I:Me)	Nº. de eritroblastos policromáticos + eritroblastos ortocromáticos / Nº. de proeritroblastos + eritroblastos basófilos

Siglas: M: mielóide; E: eritróide; I: imaturo; M: maduro; I:Mg: imaturo: maduro (granulopose); MMI: índice de maturação mielóide; I:Me: imaturo: maduro (eritropose); EMI: índice de maturação eritróide.

5.6 - Avaliação parasitológica

A avaliação da densidade parasitária foi realizada nos filmes de medula óssea confeccionados como já relatado e os resultados expressos como “*Leishman Donovan Units*” (LDU index), segundo Stauber (1955), que corresponde ao número de amastigotas por 1000 células nucleadas da série leucopoética. Os resultados foram classificados em tercís como baixo (BP), médio (MP) ou alto (AP) parasitismo conforme Reis *et al.* (2006c).

5.7 - Avaliação hematológica

A contagem total das células foi realizada em um contador automático de células sanguíneas (Celm – CC510). O estudo hematológico abrangeu, no eritrograma, a contagem RBC (Eritrócitos), Hb (Hemoglobina), Ht (Hematócrito), VCM (Volume Corpuscular Médio), CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média) e plaquetas e no leucograma, a contagem de leucócitos totais e a contagem diferencial de leucócitos (neutrófilos segmentados, bastonetes, linfócitos, eosinófilos e monócitos). A contagem diferencial de 100 leucócitos e a avaliação morfológica e qualitativa das plaquetas foram processadas em filmes corados com corante hematológico rápido, seguindo as recomendações e critérios de Jain (1986). Foram utilizados na discussão dos resultados do hemograma, valores de referência segundo Jain (1993), como demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3: Valores hematológicos de referência para a espécie canina segundo Jain (1993)

Valores Normais do Hemograma para Cães	
Parâmetros	Valores
Eritrócitos	5,5-8,5 ($\times 10^6$ / μ l)
Hemoglobina	12,0 – 18,0 (g/dl)
Hematócrito	37,0 – 55,0 (%)
V.C.M.	60,0 – 77,0 (fl)
C.H.C.M.	32,0 – 36,0 (%)
Leucócitos totais	6.000 – 17.000 (/ μ l)
Neutrófilos bastonetes	0 – 300 (/ μ l)
Neutrófilos segmentados	3.000 – 11.500 (/ μ l)
Linfócitos	1.000 – 4.800 (/ μ l)
Monócitos	150 – 1.350 (/ μ l)
Eosinófilos	100 – 1.250 (/ μ l)
Basófilos	Raros (/ μ l)
Plaquetas	2 – 5 ($\times 10^5$ / μ l)

5.8 - Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada com o apoio instrumental dos *softwares* GraphPad Prism 4.03 (Prism Software, Irvine, CA, USA) e Minitab 13.20 para Windows (Minitab Inc., Pennsylvania, USA). A normalidade dos dados foi demonstrada no grupo 2 pelo teste Kolmogorov-Smirnoff. Os testes de análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste de comparações múltiplas de Tukey foram empregados para avaliação entre os grupos clínicos relacionados aos valores da contagem celular da medula óssea e aos valores do hemograma. Os dados avaliados no grupo 1 foram não-paramétricos, portanto, teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunns foram utilizados para o estudo comparativo entre os grupos clínicos e densidade parasitária relacionados aos valores da contagem celular da medula óssea e aos valores da LDU.

Correlação de Spearman (r) foi utilizada para investigar associações entre os parâmetros densidade parasitária e *status* clínico. Foi empregada correlação de Pearson (r) com o objetivo de conduzir as análises de correlação entre a celularidade na medula óssea e no sangue periférico. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi $< 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 - Alterações na celularidade da medula óssea de cães infectados por *L.chagasi* nos diferentes grupos clínicos

6.1.1 - Alterações eritropoéticas

As alterações da série vermelha incluíram uma tendência à diminuição no número de proeritroblastos, eritroblastos policromáticos e ortocromáticos para as formas assintomáticas, oligossintomáticas e sintomáticas em relação ao grupo de cães não infectados. Não foram encontradas diferenças significativas para eritroblasto basófilo entre os grupos. No entanto, análises estatísticas das comparações entre os grupos demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formas assintomáticas e cães não infectados para o proeritroblasto (CNI: $9,3 \pm 5,1$; CA: $6,9 \pm 3,4$) e para eritroblasto policromático (CNI: $64,3 \pm 17,7$; CA: $51,6 \pm 18,5$). Além disso, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cães assintomáticos, oligossintomáticos, sintomáticos e o grupo de cães não infectados para o eritroblasto ortocromático (CNI: $99,2 \pm 33,4$; CA: $79,6 \pm 27,6$; CO: $81,7 \pm 23,5$; CS: $79,2 \pm 24,9$) (Figura 1-1, 2, 3, 4). Na avaliação microscópica da lâmina não foram encontradas alterações patológicas como eritrofagocitose e displasia eritróide, porém foi observada a incidência de células da série eritropoética em maior divisão mitótica nos cães sintomáticos.

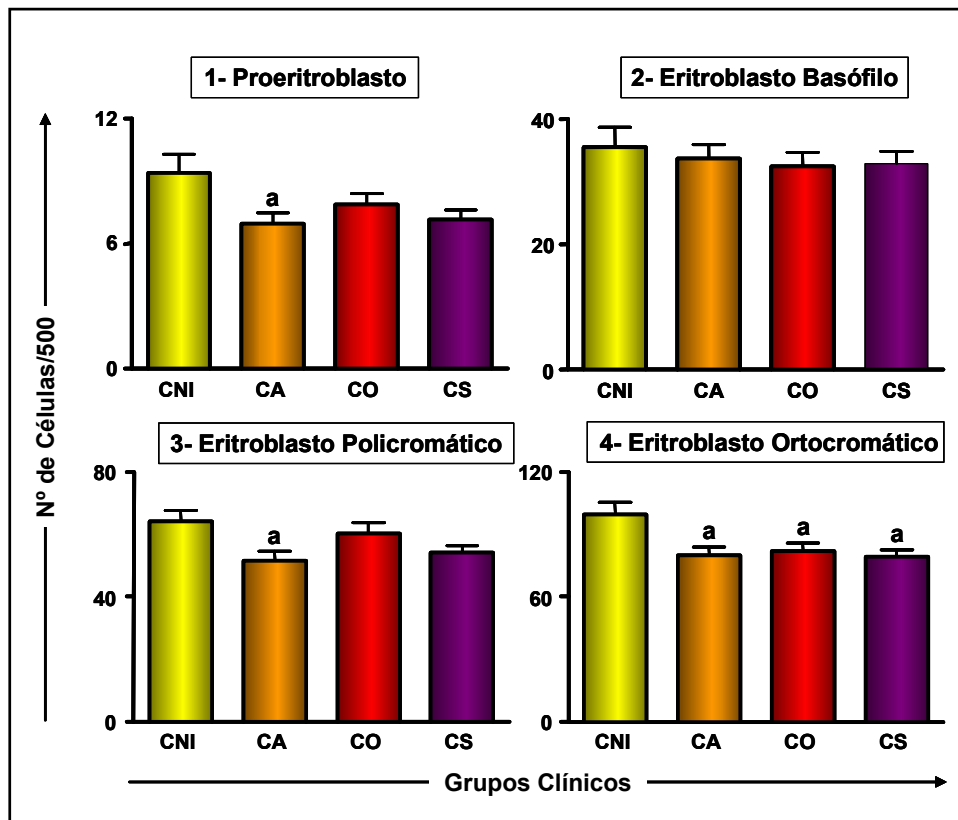


Figura 1: Contagem celular da série eritroblástica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados. Cães Não-Infetados (CNI; ■), Cães Assintomáticos (CA; ■), Cães Oligossintomáticos (CO; ■), Cães Sintomáticos (CS; ■). Os estágios da série eritroblástica estão representados pelos números 1, 2, 3, 4 respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra **a** relacionadas ao grupo CNI.

6.1.2 - Alterações leucopoéticas

Algumas alterações da leucopose foram observadas em cães infectados. Quanto à linhagem granulocítica houve uma diminuição ($p < 0,05$) no número de mieloblastos em cães sintomáticos quando comparado ao grupo de cães oligossintomáticos (CO: $4,9 \pm 4,2$; CS: $3,1 \pm 2,1$) que, por sua vez, apresentou número mais alto de mieloblastos (Figura 2a-1). Quanto ao número de promielócitos, este tipo celular se mostrou significativamente mais elevado ($p < 0,05$) no grupo de cães assintomáticos quando comparado com os demais grupos clínicos (CA: $6,7 \pm 4,5$; CO: $4,5 \pm 3,3$; CS: $4,5 \pm 3,2$) e com o grupo cães não infectados (CNI: $3,5 \pm 2,4$) (Figura 2a-2).

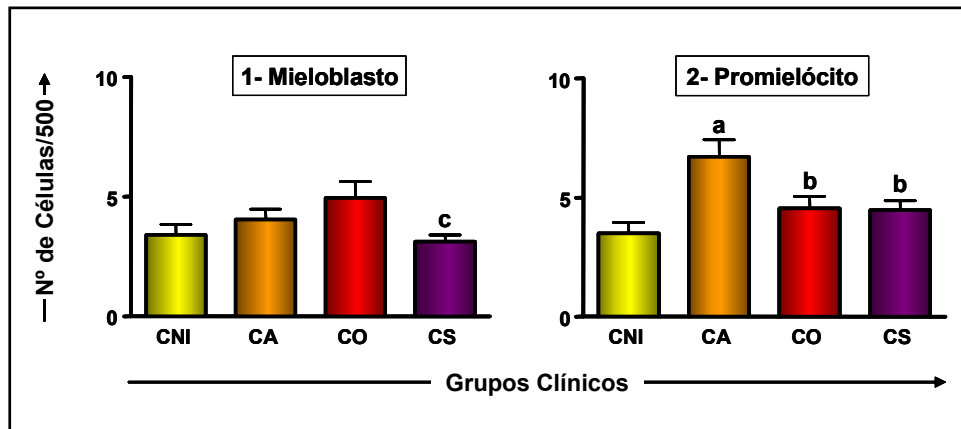


Figura 2: a) Contagem celular da série granulocítica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados. Cães Não-Infectados (CNI; ■), Cães Assintomáticos (CA; ■), Cães Oligossintomáticos (CO; ■), Cães Sintomáticos (CS; ■). Os estágios da série granulocítica estão representados pelos números 1 e 2 respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras **a**, **b** e **c** relacionadas ao grupo CNI.

Os precursores da série neutrofilica, mielócitos neutrófilos, mostraram-se aumentados ($p < 0,05$) nos diferentes grupos clínicos quando comparados com o grupo cães não infectados (CNI: $3,3 \pm 2,0$; CA: $6,2 \pm 5,2$; CO: $6,7 \pm 4,3$; CS: $7,5 \pm 4,1$) (Figura 2b-1), entretanto, para os demais estágios da série neutrofilica foi observado aumento ($p < 0,05$) de metamielócitos neutrófilos em cães assintomáticos e sintomáticos em relação aos cães não infectados (CNI: $7,9 \pm 5,8$; CA: $12,1 \pm 8,4$; CS: $12,2 \pm 5,6$) bem como aumento ($p < 0,05$) de bastonetes neutrófilos em cães oligossintomáticos (CO: $48,9 \pm 19,6$) comparados com ao grupo CNI (CNI: $36,0 \pm 11,9$) (Figura 2b-2,3). Não foram encontradas diferenças significativas para neutrófilos segmentados entre os grupos (Figura 2b-4).

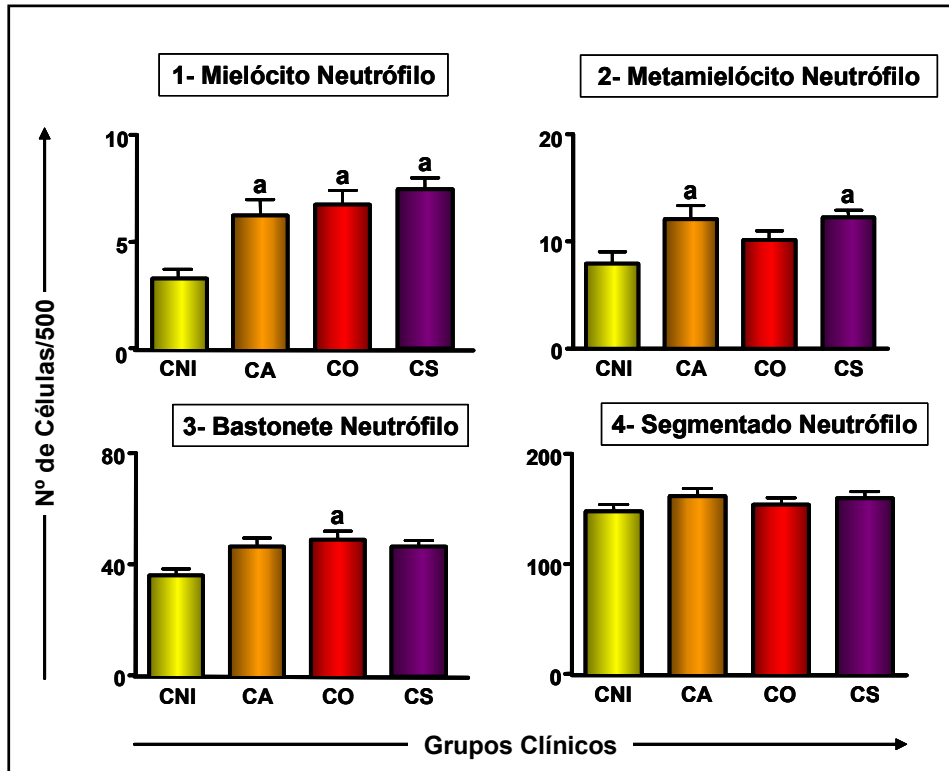


Figura 2: b) Contagem celular da série granulocítica neutrofílica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados. Cães Não-Infectados (CNI; ■), Cães Assintomáticos (CA; ■), Cães Oligossintomáticos (CO; ■), Cães Sintomáticos (CS; ■). Os estágios da série granulocítica neutrofílica estão representados pelos números 1, 2, 3, 4 respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra **a** relacionadas ao grupo CNI.

Com relação aos precursores da série eosinofílica, foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de células desta linhagem nos diferentes grupos clínicos de cães infectados em relação ao grupo de cães não infectados, para metamielócitos (CNI: $3,4 \pm 2,3$; CA: $2,1 \pm 1,8$; CO: $1,7 \pm 1,3$; CS: $2,2 \pm 1,8$), bastonetes (CNI: $6,9 \pm 3,8$; CA: $4,3 \pm 3,6$; CO: $4,1 \pm 2,9$; CS: $4,4 \pm 3,7$) e segmentados eosinófilos (CNI: $21,4 \pm 16,2$; CA: $14,1 \pm 9,6$; CO: $13,4 \pm 8,7$; CS: $14,9 \pm 9,0$) (Figura 2c- 2, 3, 4). Para mielócitos eosinófilos, apenas o grupo de cães oligossintomáticos apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo de cães não infectados (CNI: $4,0 \pm 3,8$; CO: $2,3 \pm 2,2$) (Figura 2c- 1).

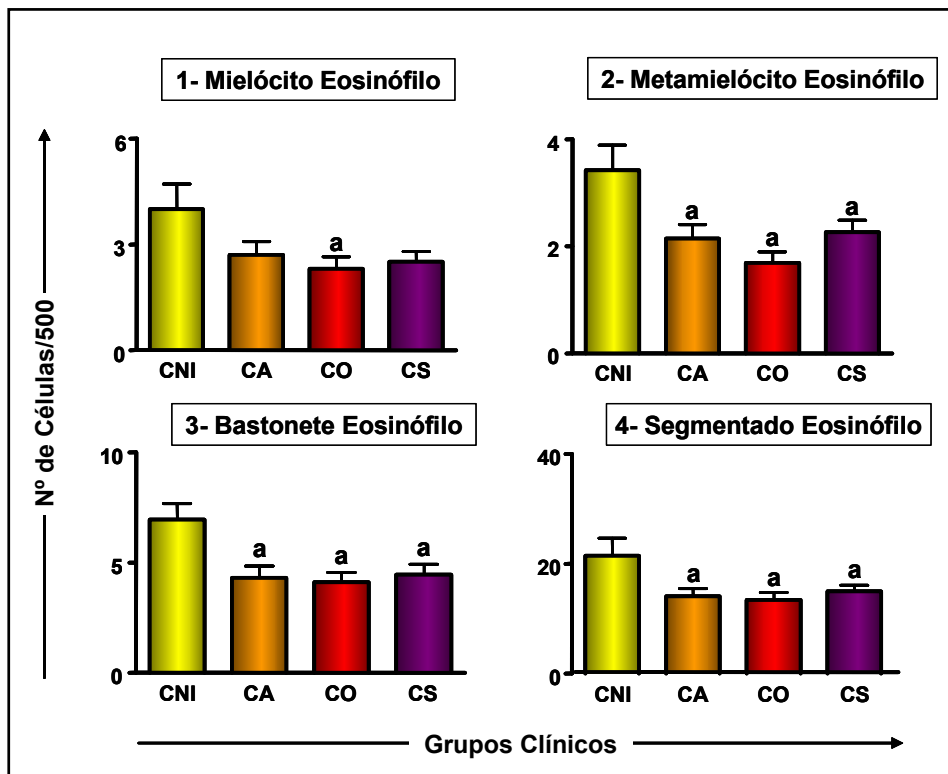


Figura 2: c) Contagem celular da série granulocítica eosinofílica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados. Cães Não-Infectados (CNI; ■), Cães Assintomáticos (CA; ■), Cães Oligossintomáticos (CO; ■), Cães Sintomáticos (CS; ■). Os estágios da série granulocítica eosinofílica estão representados pelos números 1, 2, 3, 4 respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra a relacionadas ao grupo CNI.

Para as células agranulocíticas, aumento ($p < 0,05$) no número de linfócitos em cães oligossintomáticos e sintomáticos quando comparados com o grupo de cães não infectados (CNI: $27,8 \pm 17,1$; CO: $46,1 \pm 26,3$; CS: $49,1 \pm 28,8$) (Figura 3-1), foi observado. Resultados similares foram encontrados para plasmócitos mostrando uma tendência a um aumento gradual dessas células de acordo com a severidade da infecção, dessa forma foi demonstrado aumento significativo ($p < 0,05$) no número de plasmócitos em cães sintomáticos em relação ao grupo de cães não infectados (CNI: $2,3 \pm 1,8$; CS: $4,9 \pm 4,5$) (Figura 3-3). Por outro lado, monócitos tiveram aumento significativo ($p < 0,05$) apenas em cães oligossintomáticos quando comparado a cães assintomáticos (CA: $4,7 \pm 5,2$; CO: $8,1 \pm 7,8$) (Figura 3-2). Na prancha 2 estão representadas algumas

das principais alterações encontradas na celularidade da medula óssea de cães sintomáticos comparados com o grupo CNI.

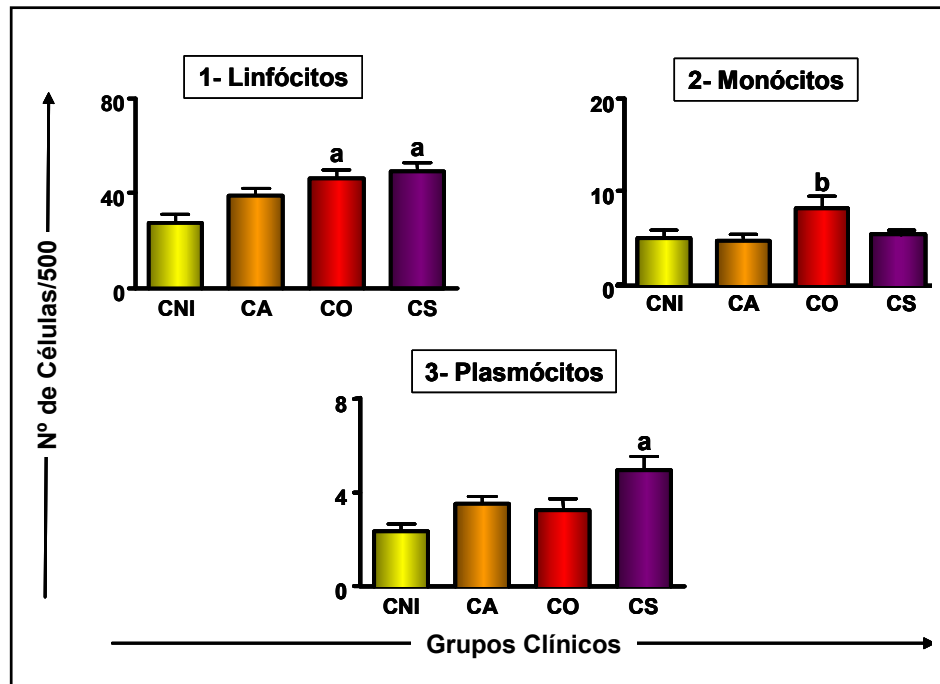
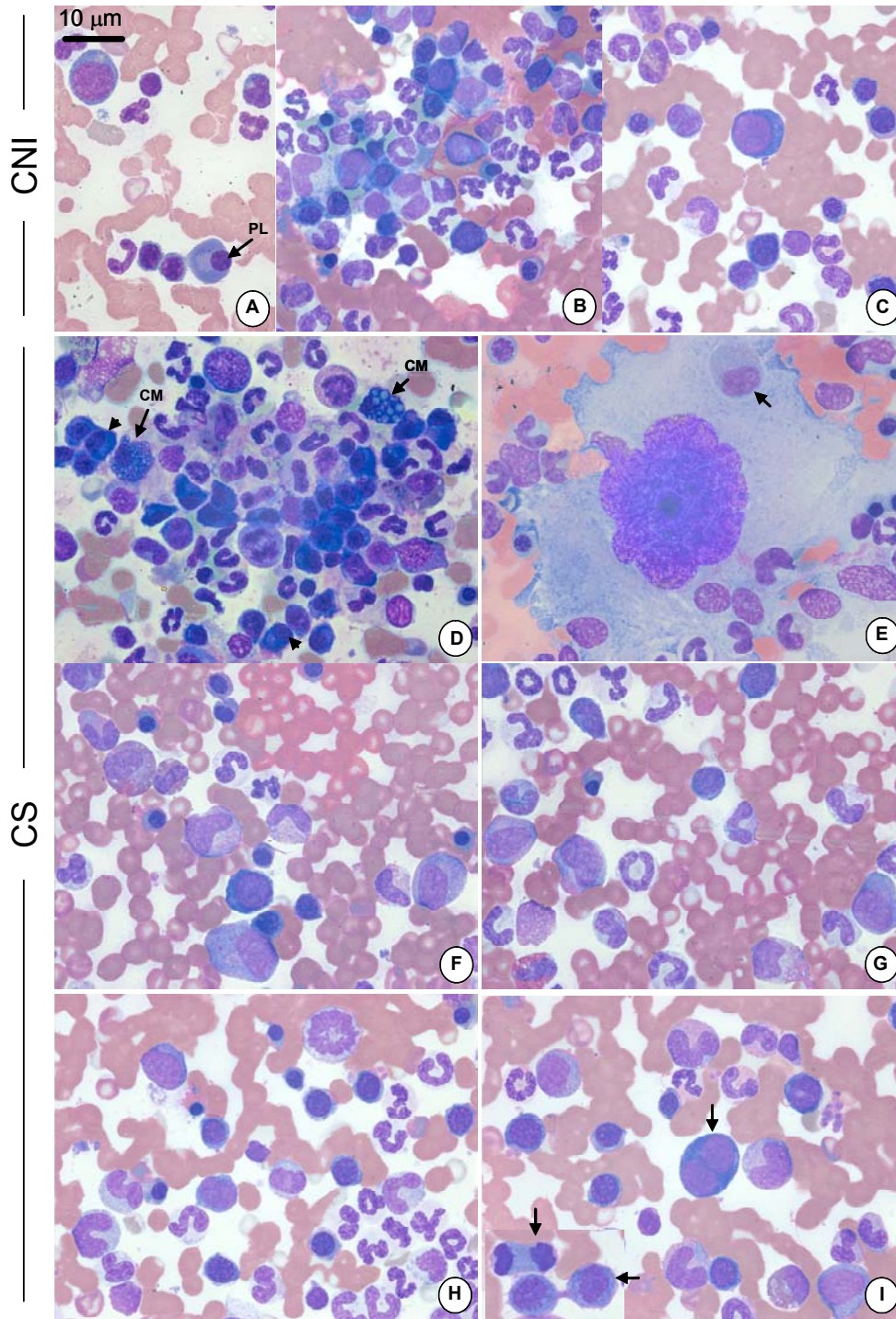


Figura 3: Contagem celular da série agranulocítica nos diferentes grupos clínicos e no grupo de cães não-infectados. Cães Não-Infectados (CNI; ■), Cães Assintomáticos (CA; ■), Cães Oligossintomáticos (CO; ■), Cães Sintomáticos (CS; ■). Os estágios da série agranulocítica estão representados pelos números 1, 2, 3 respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pelas letras **a** e **b** relacionadas ao grupo CNI.



Prancha 2: Fotomicrografias das alterações celulares observadas nos filmes de medula óssea no grupo sintomático (CS) comparado ao grupo de cães não-infectados (CNI). O grupo de cães sintomáticos apresentou intensa plasmocitose (cabeça de seta) e células de Mott (D) em relação ao grupo de cães não-infectados (A) (CM = Célula de Mott; PL = Plasmócito). Megacariócito contendo em seu citoplasma célula hematopoética (seta), fenômeno denominado emperipolese observado apenas no grupo de cães sintomáticos (E). Aumento de células precursoras leucopoéticas (F) e diminuição da linhagem eritropoética como um todo (G) observado em CS comparado ao grupo de cães não-infectados (B). Cães sintomáticos apresentaram aumento de células da linhagem neutrofílica (H) e células da série eritropoética em maior divisão mitótica (I) (seta) em comparação ao grupo de cães não-infectados (C). Coloração: *Giemsa*, Barra=10µm.

6.1.3 - Avaliação das taxas de maturação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* apresentando diferentes formas clínicas

A razão mielóide: eritróide (M:E), o índice de maturação eritróide (EMI) e o índice de maturação mielóide (MMI) foram calculados objetivando a avaliação da reatividade medular em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* nos diferentes grupos clínicos bem como no grupo de cães não infectados.

A razão M:E apresentou significativo aumento ($p<0,05$) nos diferentes grupos clínicos quando comparados com o grupo de cães não infectados. De forma interessante, as razões e taxas de maturação relacionadas com a linhagem leucopoética e granulocítica mostraram um aumento ($p<0,05$) das razões I:M em cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos em relação ao grupo de cães não infectados, da mesma forma em I:Mg em cães de todos os grupos clínicos comparados com o grupo de cães não infectados. Entretanto, o índice de maturação mielóide (MMI index), que é calculado como o inverso da razão I:Mg mostrou-se, como esperado, diminuído ($p<0,05$) em cães assintomáticos, cães oligossintomáticos, cães sintomáticos comparado com o grupo de cães não infectados. Com relação à razão I:Me e o índice de maturação eritróide (EMI index) foi observado um aumento ($p<0,05$) significativo na razão I:Me nos diferentes grupos clínicos quando comparados com o grupo de cães não infectados. Por outro lado, uma comparação entre os grupos acusou uma significativa diminuição ($p<0,05$) do EMI index em cães assintomáticos, oligossintomáticos, e sintomáticos em relação ao grupo de cães não infectados (Tabela 4).

Tabela 4: Avaliação das taxas de maturação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* apresentando diferentes formas clínicas

TAXAS DE MATURAÇÃO (Razão)	GRUPO CLÍNICO			
	CNI	CA	CO	CS
Razão M:E	1,40 ± 0,60	2,20 ± 1,30 ^a	2,10 ± 1,30 ^a	2,00 ± 1,10 ^a
Razão I:M	0,06 ± 0,02	0,09 ± 0,06 ^a	0,08 ± 0,04 ^a	0,08 ± 0,03 ^a
Razão I:Mg	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,06 ^a	0,08 ± 0,04 ^a	0,07 ± 0,03 ^a
MMI (1/razão I:Mg)	22,40 ± 12,10	16,90 ± 10,20 ^a	16,30 ± 8,50 ^a	16,30 ± 7,30 ^a
Razão I:Me	0,20 ± 0,08	0,30 ± 0,10 ^a	0,30 ± 0,10 ^a	0,30 ± 0,10 ^a
EMI (1/razão I:Me)	4,90 ± 2,10	3,50 ± 1,50 ^a	3,60 ± 1,30 ^a	3,70 ± 1,50 ^a

As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra **a** relacionadas ao grupo CNI. M:E = mielóide: eritróide; I:M = imaturo: maduro; I:Mg = imaturo: maduro (granulopose); I:Me = imaturo: maduro (eritropose); MMI = índice de maturação mielóide; EMI: índice de maturação eritróide.

6.2 - Avaliação da carga parasitária na medula óssea de cães infectados por *L.chagasi*

Padrões distintos de densidade parasitária (LDU) na medula óssea foram observados em cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. O parasitismo medular foi inicialmente classificado como baixo (BP), médio (MP) ou alto (AP) parasitismo baseado nos valores de LDU específicos categorizados estatisticamente em tercís, como segue: BP: 1-3; MP: 4-14; AP: 15-660 amastigotas/1.000 células nucleadas da série leucopoética, como demonstrado na prancha 3. Segundo este critério, foram incluídos 51 animais no grupo BP, 51 animais no grupo MP e 48 animais no grupo AP. Na Tabela 5 estão demonstrados os padrões de densidades parasitárias na medula óssea de cães infectados por *L. chagasi* apresentando diferentes formas clínicas.

Tabela 5: Padrões de densidades parasitárias na medula óssea de cães infectados por *L. chagasi* apresentando diferentes formas clínicas

DENSIDADE PARASITÁRIA	NÚMERO DE ANIMAIS (%)		
	GRUPO CLÍNICO		
	CA	CO	CS
Baixo Parasitismo	21 (44,7%)	15 (35,7%)	15 (24,6%)
Médio Parasitismo	15 (31,9%)	13 (30,9%)	23 (37,7%)
Alto Parasitismo	11 (23,4%)	14 (33,4%)	23 (37,7%)
Total	47	42	61

Os resultados estão expressos em número de cães com determinada densidade parasitária por grupo clínico e entre parênteses como percentagem.

Como demonstrado na Figura 4, o grupo de cães sintomáticos mostrou maiores índices de LDU ($p < 0,05$) quando comparados aos cães assintomáticos (CA: $14,4 \pm 38,0$; CS: $63,7 \pm 132,3$). Além disso, os valores de LDU mostraram-se significativamente aumentados ($p < 0,05$) nos cães com alto parasitismo (AP) em relação ao grupo de cães com baixo parasitismo (BP) e médio parasitismo (MP) respectivamente (BP: $1,9 \pm 0,7$; MP: $7,3 \pm 2,7$; AP: $166,9 \pm 162,0$). Os dados demonstraram também uma correlação positiva entre *status* clínico (cães assintomáticos, cães oligossintomáticos, cães sintomáticos) e densidade parasitária (BP, MP, AP) ($p < 0,0001 / r = 0,3565$).

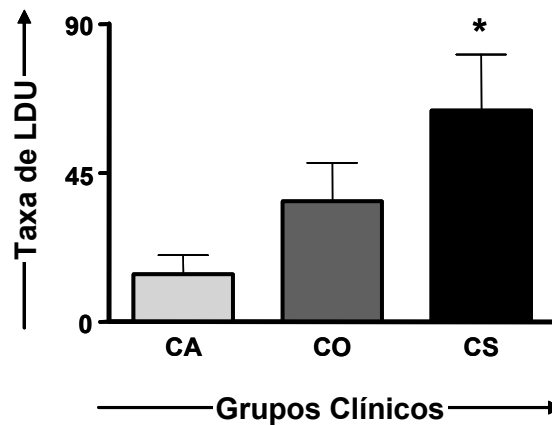
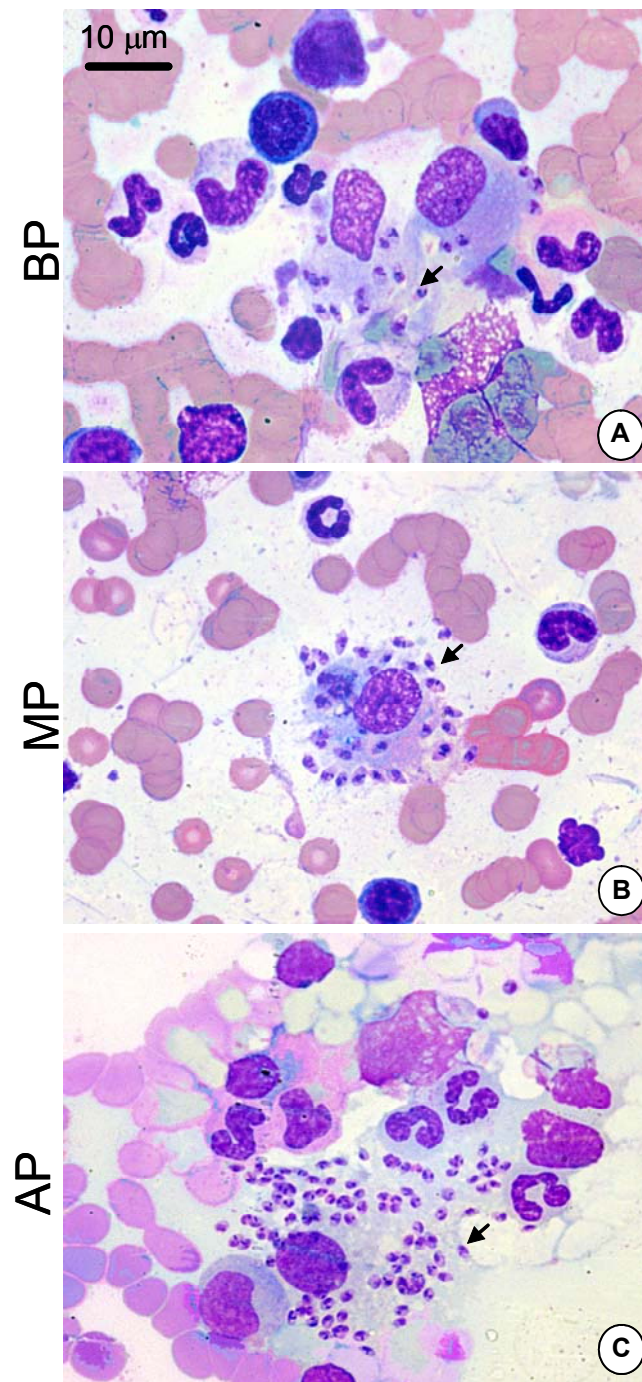


Figura 4: Densidade parasitária (LDU) na medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*, com classificação baseada no *status* clínico. Cães Assintomáticos (CA; □), Cães Oligossintomáticos (CO; ■) e Cães Sintomáticos (CS; ■). Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram identificadas através de “*” destacando o grupo CS como a mais relevante forma clínica de alta densidade parasitária quando comparado aos grupos CA e CO.



Prancha 3: Fotomicrografias da densidade parasitária observada nos filmes de medula óssea, com formas amastigotas de *L. chagasi* apresentadas em tercis. (A) BP = Baixo parasitismo. (B) MP = Médio parasitismo. (C) AP = Alto parasitismo. Coloração: *Giemsa*, Barra=10µm.

6.3 - Alterações na celularidade da medula óssea de cães infectados por *L.chagasi* nas diferentes densidades parasitárias

6.3.1 - Alterações eritropoéticas

A figura 5 mostra a influência do parasitismo na linhagem eritropoética medular de cães infectados por *L. chagasi* categorizados em baixo, médio e alto parasitismo a partir dos índices de LDU. Cães com baixo parasitismo (BP) apresentaram diminuição ($p<0,05$) no número de proeritroblastos em relação aos cães não infectados (CNI: $10,2 \pm 4,7$; BP: $6,9 \pm 3,4$) (Figura 5-1). Não foram observadas diferenças significativas em eritroblastos basófilos e eritroblastos policromáticos, ressaltando diminuição significativa ($p<0,05$) de eritroblastos ortocromáticos em cães com baixo e alto parasitismo quando comparado a cães não infectados (CNI: $101,2 \pm 32,3$; BP: $80,3 \pm 28,0$; AP: $79,6 \pm 25,7$) (Figura 5-4).

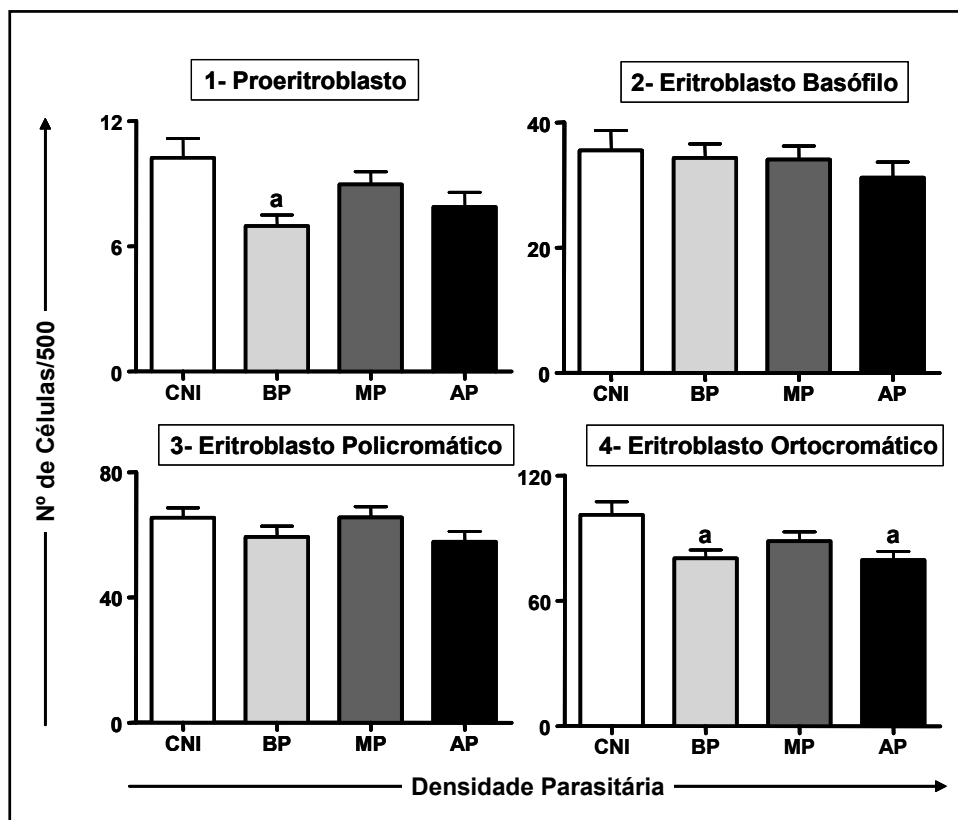


Figura 5: Contagem celular da série eritoblástica nas diferentes densidades parasitárias. Cães Não-Infectados (CNI; □), Baixo parasitismo (BP; ◻), Médio Parasitismo (MP; ◼) e Alto Parasitismo (AP; ◼). Os estágios da série eritoblástica estão representados pelos números 1, 2, 3, 4 respectivamente. As diferenças significativas ($p<0,05$) estão indicadas pela letra a relacionadas ao grupo CNI.

6.3.2 - Alterações leucopoéticas

A análise da linhagem granulocítica revelou que os diferentes graus de parasitismo medular não influenciaram no número de mieloblastos e promielócitos, uma vez que, não houve diferenças significativas entre os grupos (Figura 6a-1, 2).

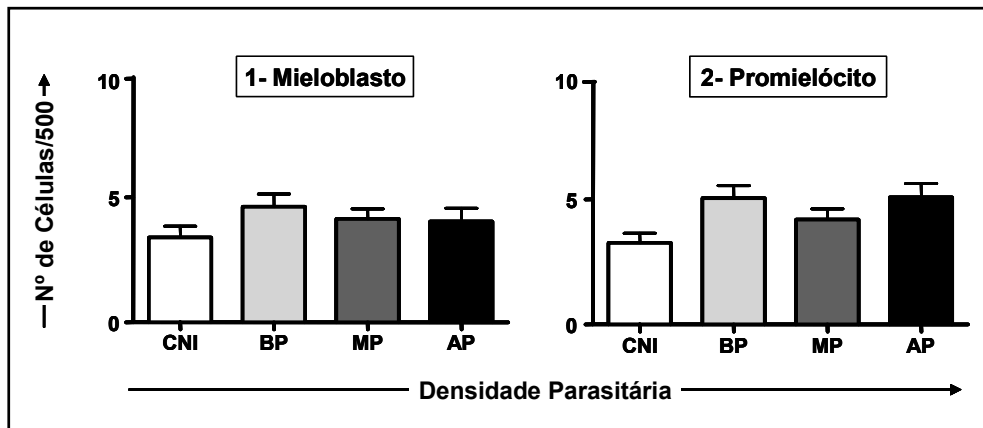


Figura 6: a) Contagem celular da série granulocítica nas diferentes densidades parasitárias. Cães Não-Infectados (CNI; □), Baixo parasitismo (BP; □), Médio Parasitismo (MP; ■) e Alto Parasitismo (AP; ■). Os estágios da série granulocítica estão representados pelos números 1 e 2 respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos.

Os resultados relacionados à linhagem neutrofílica mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) de mielócito neutrófilo em todos os grupos parasitados em relação ao grupo de cães não infectados (CNI: $3,6 \pm 2,2$; BP: $6,2 \pm 4,0$; MP: $6,5 \pm 3,8$; AP: $9,1 \pm 5,7$) (Figura 6b-1). Entretanto, apenas no grupo de cães com alto parasitismo foi observado aumento ($p < 0,05$) de metamielócitos (CNI: $7,9 \pm 5,7$; AP: $13,6 \pm 5,4$) e bastonetes neutrófilos (CNI: $41,0 \pm 17,0$; AP: $56,4 \pm 22,1$) em relação ao grupo de cães não infectados (Figura 6b-2, 3). Não foram observadas diferenças significativas no número de neutrófilos segmentados entre os grupos (Figura 6b-4).

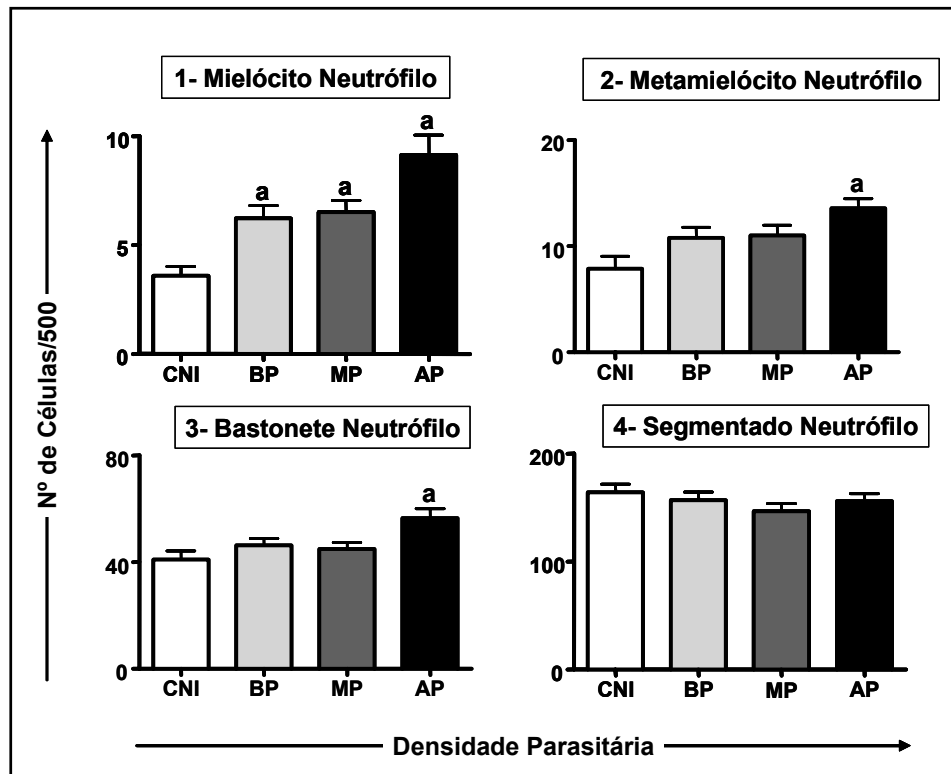


Figura 6: b) Contagem celular da série granulocítica neutrofílica nas diferentes densidades parasitárias. Cães Não-Infectados (CNI; □), Baixo parasitismo (BP; ◻), Médio Parasitismo (MP; ◼) e Alto Parasitismo (AP; ◼). Os estágios da série granulocítica neutrofílica estão representados pelos números 1, 2, 3, 4 respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra **a** relacionadas ao grupo CNI.

De forma muito interessante, ao comparar os resultados da contagem celular da linhagem eosinofílica nos diferentes grupos clínicos e nas diferentes densidades parasitárias pode-se observar algumas semelhanças entre os mesmos, demonstrando que o parasitismo medular influencia os eosinófilos e seus precursores. A análise estatística comprovou que há diminuição ($p < 0,05$) de mielócitos eosinófilos (CNI: $4,5 \pm 3,7$; AP: $2,3 \pm 2,0$), metamielócitos eosinófilos (CNI: $3,2 \pm 2,4$; AP: $1,6 \pm 1,2$) e segmentados eosinófilos (CNI: $22,2 \pm 16,0$; AP: $12,1 \pm 9,8$) no grupo alto parasitismo em relação ao grupo de cães não infectados (Figura 6c-1, 2, 4). Além disso, bastonetes eosinófilos também se encontram diminuídos ($p < 0,05$) nos grupos médio e alto parasitismo quando comparados ao grupo de cães não infectados (CNI: $7,3 \pm 3,7$; MP: $3,9 \pm 3,3$; AP: $3,1 \pm 2,5$) (Figura 6c-3).

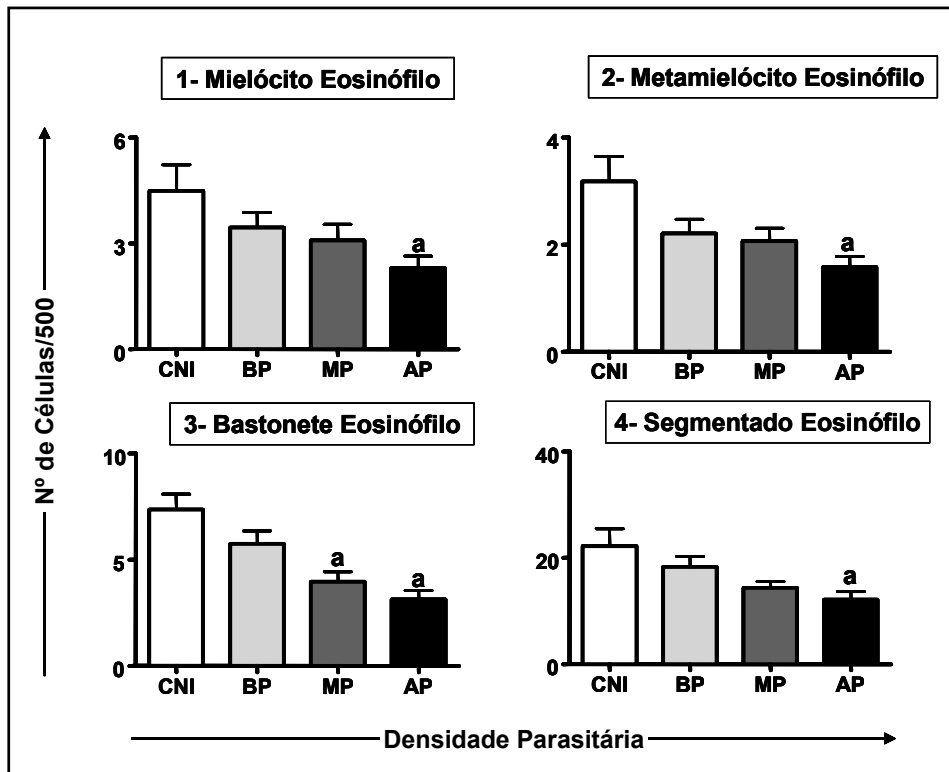


Figura 6: c) Contagem celular da série granulocítica eosinofílica nas diferentes densidades parasitárias. Cães Não-Infectados (CNI; □), Baixo parasitismo (BP; □), Médio Parasitismo (MP; ■) e Alto Parasitismo (AP; ■). Os estágios da série granulocítica eosinofílica estão representados pelos números 1, 2, 3, 4 respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra **a** relacionadas ao grupo CNI.

A figura 7 mostra os resultados obtidos com as células da linhagem agranulocítica onde não houve diferenças significativas no número de monócitos entre os grupos (Figura 7-2). Entretanto, o número de linfócitos foi significativamente maior ($p < 0,05$) em cães com baixo, médio e alto parasitismo em relação ao grupo de cães não infectados (CNI: $27,8 \pm 17,1$; BP: $43,4 \pm 24,8$; MP: $46,2 \pm 27,3$; AP: $45,4 \pm 25,9$) (Figura 7-1). Para plasmócitos, resultados similares aos obtidos nos diferentes grupos clínicos foram encontrados, mostrando uma tendência a um aumento gradual dessas células de acordo com o parasitismo medular, com aumento significativo ($p < 0,05$) desta em cães do grupo alto parasitismo quando comparado ao grupo de cães não infectados (CNI: $2,3 \pm 1,8$; AP: $4,6 \pm 3,8$) (Figura 7-3).

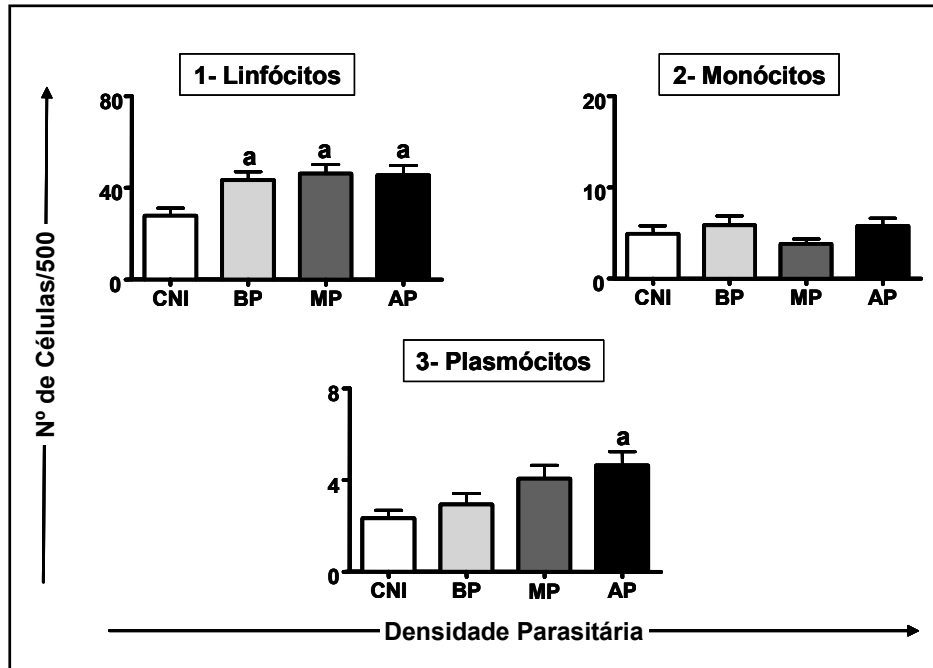


Figura 7: Contagem celular da série agranulocítica nas diferentes densidades parasitárias. Cães Não-Infectados (CNI; □), Baixo parasitismo (BP; □), Médio Parasitismo (MP; ■) e Alto Parasitismo (AP; ■). Os estágios da série agranulocítica estão representados pelos números 1, 2, 3 respectivamente. As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra **a** relacionadas ao grupo CNI.

6.3.3 - Avaliação das taxas de maturação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* apresentando diferentes graus de parasitismo medular

A razão mielóide: eritróide (M:E), o índice de maturação eritróide (EMI) e o índice de maturação mielóide (MMI) foram calculados objetivando a avaliação da reatividade medular em cães naturalmente infectados por *L. chagasi* nos diferentes graus de parasitismo bem como no grupo de cães não infectados.

A razão M:E apresentou significativo aumento ($p < 0,05$) nas diferentes densidades parasitárias quando comparadas com o grupo de cães não infectados. De forma interessante, as razões e taxas de maturação relacionadas com a linhagem leucopoética e granulocítica mostraram um aumento ($p < 0,05$) das razões I:M nos grupos de cães com baixo, médio e alto parasitismo em relação ao grupo de cães não infectados, da mesma forma em I:Mg nos cães com diferentes densidades parasitárias

comparados com o grupo de cães não infectados. Entretanto, o índice de maturação mielóide (MMI index), que é calculado como o inverso da razão I:Mg mostrou-se, como esperado, diminuído ($p < 0,05$) nos grupos de cães com baixo, médio e alto parasitismo comparado com o grupo de cães não infectados. Com relação à razão I:Me e o índice de maturação eritróide (EMI index) foi observado um aumento ($p < 0,05$) significativo na razão I:Me nas diferentes densidades parasitárias quando comparadas com o grupo de cães não infectados. Por outro lado, uma comparação entre os grupos acusou uma significativa diminuição ($p < 0,05$) do EMI index nos grupos de cães com baixo, médio e alto parasitismo em relação ao grupo de cães não infectados (Tabela 6).

Tabela 6: Avaliação das taxas de maturação da celularidade da medula óssea de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* apresentando diferentes graus de parasitismo

TAXAS DE MATURAÇÃO (Razão)	GRAU DE PARASITISMO			
	CNI	BP	MP	AP
Razão M:E	1,40 ± 0,60	2,20 ± 1,40 ^a	2,00 ± 0,90 ^a	2,20 ± 1,30 ^a
Razão I:M	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,04 ^a	0,08 ± 0,04 ^a	1,00 ± 0,06 ^a
Razão I:Mg	0,05 ± 0,03	0,08 ± 0,04 ^a	0,08 ± 0,04 ^a	0,09 ± 0,05 ^a
MMI (1/razão I:Mg)	23,00 ± 11,90	16,00 ± 6,40 ^a	14,90 ± 9,30 ^a	15,00 ± 9,60 ^a
Razão I:Me	0,20 ± 0,08	0,30 ± 0,10 ^a	0,30 ± 0,10 ^a	0,30 ± 0,10 ^a
EMI (1/razão I:Me)	4,90 ± 2,10	3,60 ± 1,60 ^a	3,60 ± 1,40 ^a	3,60 ± 1,30 ^a

As diferenças significativas ($p < 0,05$) estão representadas pela letra **a** relacionadas ao grupo CNI. M:E = mielóide: eritróide; I:M = imaturo: maduro; I:Mg = imaturo: maduro (granulopose); I:Me = imaturo: maduro (eritropose); MMI = índice de maturação mielóide; EMI = índice de maturação eritróide.

No diagrama 2 estão representados os principais resultados obtidos pela análise da celularidade da medula óssea observados no grupo de 187 cães (grupo 1). Dessa forma, no mielograma foi observada queda da celularidade eritropoética principalmente nos grupos de cães assintomáticos e baixo parasitismo. Com relação à mieloblastos e promielócitos, foram relatadas alterações como diminuição de mieloblastos em cães sintomáticos, bem como diminuição de promielócitos em cães sintomáticos e oligossintomáticos e aumento de promielócitos em cães assintomáticos.

A avaliação celular do quadro neutrofílico revelou aumento de células desta linhagem, como em mielócitos nos diferentes grupos clínicos e densidades parasitárias,

metamielócitos em cães assintomáticos, sintomáticos e com alto parasitismo, bastonetes em cães oligossintomáticos e com alto parasitismo.

De forma inversa, a avaliação do quadro eosinofílico mostrou diminuição de células desta linhagem, como em mielócitos em cães oligossintomáticos e com alto parasitismo, metamielócitos, bastonetes e segmentados em todos os grupos clínicos e cães com alto parasitismo.

Além disso, foi relatado aumento de linfócitos em cães oligossintomáticos e sintomáticos e em todos os graus de parasitismo. Cães oligossintomáticos apresentaram aumento de monócitos enquanto os cães sintomáticos e com alto parasitismo apresentaram plasmocitose.

MIELOGRAMA	CA	CO	CS	BP	MP	AP
Proeritroblastos	↓			↓		
Eritroblastos Basófilos						
Eritroblastos Policromáticos	↓					
Eritroblastos Ortocromáticos	↓	↓	↓	↓		↓
Mieloblastos			↓			
Promielócitos	↑	↓	↓			
Mielócitos Neutrófilos	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Metamielócitos Neutrófilos	↑		↑			↑
Neutrófilos Bastonetes		↑				↑
Neutrófilos Segmentados						
Mielócitos Eosinófilos		↓				↓
Metamielócitos Eosinófilos	↓	↓	↓			↓
Eosinófilos Bastonetes	↓	↓	↓		↓	↓
Eosinófilos Segmentados	↓	↓	↓			↓
Linfócitos		↑	↑	↑	↑	↑
Monócitos		↑				
Plasmócitos			↑			↑

Diagrama 2: Principais resultados observados na medula óssea de cães nos diferentes grupos clínicos e densidades parasitárias.

6.4 - Avaliação do mielograma x hemograma de cães naturalmente infectados por *L.chagasi* portadores de diferentes formas clínicas (grupo 2)

6.4.1 - Alterações nos parâmetros hematológicos

A avaliação dos parâmetros hematológicos demonstrou anemia severa nos animais sintomáticos, com uma diminuição significativa ($p<0,05$) no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito quando comparado aos grupos de cães não infectados, assintomático e oligossintomático. O número de plaquetas entre os grupos apresentou pequenas oscilações não significativas. Em relação às células brancas do sangue, houve diferenças significativas entre os grupos clínicos na série leucocitária. Entretanto, nenhuma diferença significativa nos valores absolutos de granulócitos e neutrófilos segmentados foi observada entre os grupos de cães estudados, apesar de ter sido demonstrado um aumento ($p<0,05$) de neutrófilos bastonetes em cães sintomáticos quando comparado com os cães não infectados. Análises estatísticas revelaram que cães sintomáticos mostraram uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos valores absolutos de leucócitos (leucopenia) quando comparado ao grupo assintomático. A análise dos dados também demonstrou uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos valores absolutos de granulócitos eosinófilos em cães oligossintomáticos e sintomáticos quando comparado aos animais não infectados. Foi observada no grupo sintomático uma significativa diminuição ($p<0,05$) nos valores absolutos de linfócitos quando comparado ao grupo assintomático, que por sua vez, mostrou maior número de linfócitos ($p<0,05$) em relação ao grupo de cães não infectados. Além disso, foi demonstrada também uma diminuição significativa ($p<0,05$) nos valores absolutos de monócitos para os cães sintomáticos quando comparado aos animais não infectados (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação dos parâmetros hematológicos de cães naturalmente infectados e não-infectados

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	GRUPO CLÍNICO			
	CNI	CA	CO	CS
Eritrócitos – $10^6/\text{mm}^3$	$6,90 \pm 0,80$	$6,10 \pm 0,50$	$5,50 \pm 0,80^a$	$4,00 \pm 1,30^{a,b,c}$
Hemoglobina – g%	$15,60 \pm 2,20$	$14,80 \pm 1,80$	$14,30 \pm 2,60$	$9,50 \pm 3,10^{a,b,c}$
Hematócrito – %	$47,00 \pm 5,80$	$42,70 \pm 6,20$	$40,10 \pm 6,20$	$27,60 \pm 8,70^{a,b,c}$
Leucócitos – $10^3/\text{mm}^3$	$13,00 \pm 3,00$	$15,00 \pm 4,80$	$13,60 \pm 3,50$	$9,40 \pm 2,90^b$
Granulócitos	$9,10 \pm 3,40$	$7,40 \pm 3,60$	$8,40 \pm 3,00$	$8,60 \pm 3,00$
Neutrófilos Bastonetes	$0,70 \pm 0,50$	$0,70 \pm 0,40$	$1,00 \pm 0,70$	$1,30 \pm 0,60^a$
Neutrófilos Segmentados	$6,50 \pm 3,10$	$5,40 \pm 2,70$	$6,50 \pm 2,40$	$6,60 \pm 2,50$
Eosinófilos	$1,90 \pm 0,80$	$1,40 \pm 1,10$	$0,90 \pm 0,50^a$	$0,70 \pm 1,00^a$
Linfócitos	$2,80 \pm 1,60$	$5,60 \pm 3,60^a$	$4,30 \pm 3,50$	$1,50 \pm 0,90^b$
Monócitos	$1,10 \pm 0,50$	$1,00 \pm 0,50$	$0,80 \pm 0,40$	$0,50 \pm 0,30^a$
Plaquetas – $10^5/\text{mm}^3$	$2,20 \pm 0,90$	$1,70 \pm 0,60$	$2,00 \pm 0,30$	$2,00 \pm 1,10$

Os resultados são mostrados como os valores da média \pm desvio-padrão. As letras **a**, **b** e **c** representam diferenças significativas para os cães não infectados, assintomático e oligossintomático, respectivamente. As diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. A distribuição é expressa em porcentagem baseada na contagem diferencial de 100 células.

6.4.2 - Alterações nos parâmetros medulares

A avaliação dos parâmetros medulares relacionados à série vermelha demonstrou uma marcada diminuição ($p < 0,05$) de proeritroblastos e eritroblastos basófilos em cães sintomáticos quando comparado ao grupo de cães não infectados. Nos estágios tardios da linhagem eritropoética, também foi observada diminuição ($p < 0,05$) de eritroblastos policromáticos em relação aos cães não infectados e oligossintomáticos e eritroblastos ortocromáticos em relação aos demais grupos clínicos e ao grupo de cães não infectados.

Não foram observadas diferenças significativas nas células dos estágios iniciais da série branca: mieloblastos e promielócitos. Entretanto, todas as células da linhagem granulocítica neutrofilica de animais sintomáticos mostraram-se significativamente aumentadas ($p < 0,05$): em mielócitos quando comparado ao grupo de cães não infectados e assintomático, em metamielócitos quando comparado ao grupo de cães não infectados, em bastonetes quando comparado aos outros grupos e, em segmentados,

quando comparado ao grupo de cães não infectados e oligossintomático. Apesar de não haver diferenças significativas em mielócitos e metamielócitos eosinófilos, foi demonstrada uma diminuição ($p < 0,05$) de bastonetes e segmentados eosinófilos em cães sintomáticos em relação aos cães não infectados.

Cães infectados por *L. chagasi* independente do grupo clínico apresentaram aumento ($p < 0,05$) do número de linfócitos em relação aos cães não infectados, enquanto cães sintomáticos mostraram diminuição ($p < 0,05$) de plasmócitos em relação aos cães oligossintomáticos. Não houve diferenças significativas no número de monócitos (Tabela 8).

Tabela 8: Avaliação dos parâmetros medulares de cães naturalmente infectados e não-infectados

PARÂMETROS MEDULARES	GRUPO CLÍNICO			
	CNI	CA	CO	CS
Proeritroblastos	12,50 ± 6,00	7,70 ± 3,80	9,50 ± 5,10	6,30 ± 3,30 ^a
Eritroblastos Basófilos	32,60 ± 15,50	21,10 ± 10,80	23,70 ± 14,80	14,20 ± 5,60 ^a
Eritroblastos Policromáticos	65,90 ± 18,50	56,20 ± 15,70	64,50 ± 15,70	41,50 ± 15,60 ^{a,c}
Eritroblastos Ortocromáticos	113,40 ± 29,40	105,60 ± 28,40	108,40 ± 24,80	61,40 ± 27,90 ^{a,b,c}
Mieloblastos	3,50 ± 2,10	2,60 ± 2,70	3,20 ± 1,80	2,70 ± 2,10
Promielócitos	2,90 ± 1,90	3,00 ± 2,40	4,30 ± 3,10	3,10 ± 2,20
Mielócitos Neutrófilos	3,70 ± 2,10	4,30 ± 1,80	5,40 ± 4,20	9,50 ± 6,30 ^{a,b}
Metamielócitos Neutrófilos	7,40 ± 5,10	10,70 ± 3,20	12,30 ± 6,70	13,70 ± 5,20 ^a
Neutrófilos Bastonetes	38,90 ± 16,80	43,80 ± 11,70	46,00 ± 14,90	68,00 ± 18,80 ^{a,b,c}
Neutrófilos Segmentados	169,60 ± 39,30	183,80 ± 48,30	165,10 ± 53,70	226,30 ± 60,00 ^{a,c}
Mielócitos Eosinófilos	3,30 ± 2,50	1,80 ± 1,80	2,00 ± 1,20	2,50 ± 2,50
Metamielócitos Eosinófilos	2,70 ± 2,20	2,60 ± 2,50	2,20 ± 1,60	1,00 ± 1,00
Eosinófilos Bastonetes	5,20 ± 2,00	4,80 ± 2,60	3,40 ± 1,90	2,50 ± 2,40 ^a
Eosinófilos Segmentados	12,20 ± 7,80	9,70 ± 3,50	7,50 ± 3,40	4,00 ± 3,20 ^a
Linfócitos	18,00 ± 9,20	33,00 ± 13,00 ^a	32,40 ± 10,30 ^a	30,90 ± 10,80 ^a
Monócitos	2,70 ± 2,40	2,90 ± 1,90	2,90 ± 2,10	3,00 ± 2,10
Plasmócitos	2,50 ± 1,90	1,80 ± 1,70	4,30 ± 3,90	1,10 ± 0,90 ^c

Os resultados são mostrados como os valores da média ± desvio-padrão. As letras **a**, **b** e **c** representam diferenças significativas para os cães não infectados, assintomático e oligossintomático, respectivamente. As diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. A distribuição é expressa em porcentagem baseada na contagem diferencial de 500 células.

6.4.3 - Análises de correlação do mielograma *versus* hemograma

6.4.3.1 - Alterações na série vermelha

Buscando investigar se há associação entre as células da medula óssea da linhagem eritropoética e os valores obtidos no eritrograma do sangue periférico de cães infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas, foram realizadas análises de correlação envolvendo o número de proeritroblastos, eritroblastos basófilos, eritroblastos policromáticos e eritroblastos ortocromáticos obtidos no mielograma e os parâmetros hematológicos: eritrócitos (RBC), hemoglobina (Hb) e hematócrito (Ht) obtidos no eritrograma. Assim, não foram observadas diferenças significativas entre proeritroblastos e os parâmetros hematológicos tanto nas análises de correlação envolvendo todos os cães infectados como nas análises considerando os grupos clínicos de cães separadamente. Entretanto, ao avaliarmos as demais células da linhagem eritropoética foi observada correlação significativamente positiva entre eritroblastos basófilos, policromáticos e ortocromáticos e RBC, Hb e Ht em todos os grupos de cães infectados (Figura 8).

Também foram realizadas análises de correlação considerando os grupos clínicos CA, CO e CS, sendo observadas correlações positivas apenas no grupo de cães sintomáticos entre eritroblasto basófilo e RBC ($p = 0,0398/ r = 0,5985$), eritroblasto policromático e RBC ($p = 0,0246/ r = 0,6413$), eritroblasto basófilo e Hb ($p = 0,0358/ r = 0,6085$), eritroblasto policromático e Hb ($p = 0,0349/ r = 0,6108$), eritroblasto basófilo e Ht ($p = 0,0153/ r = 0,6785$), eritroblasto policromático e Ht ($p = 0,0160/ r = 0,6753$).

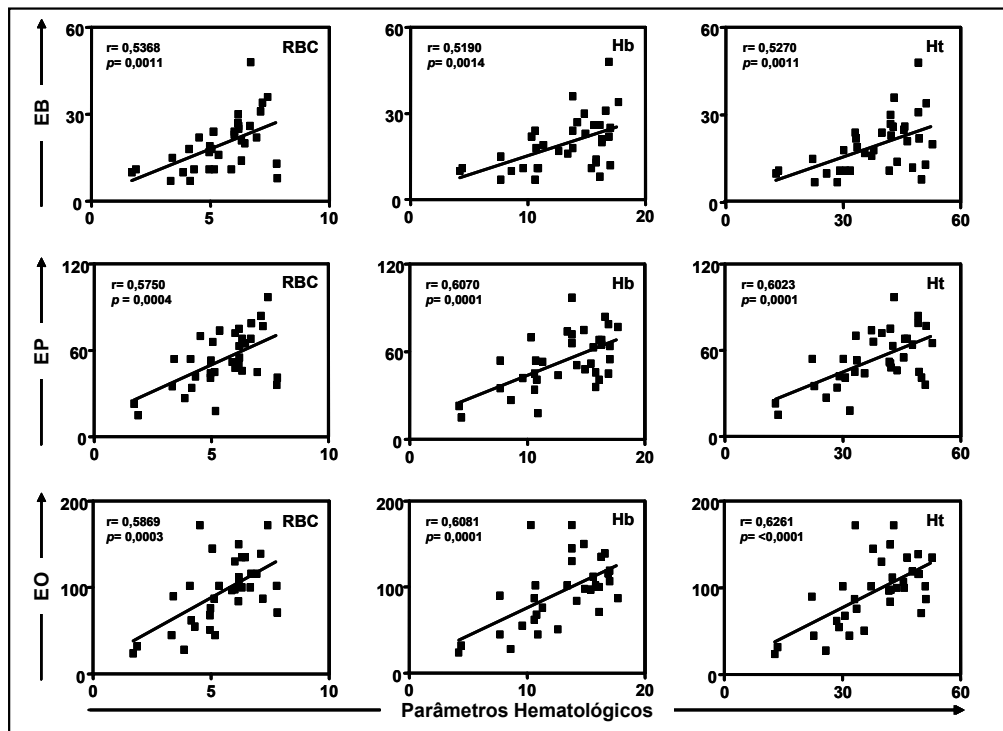


Figura 8: Correlação entre os valores obtidos no eritrograma e os valores obtidos no mielograma da linhagem eritopoética considerando todos os grupos clínicos. O eixo x representa os parâmetros hematológicos avaliados: RBC = Eritrócitos, Hb = Hemoglobina e Ht = Hematócrito, enquanto o eixo y ilustra os valores do número de células na medula óssea: EB = Eritroblasto Basófilo, EP = Eritroblasto Policromático e EO = Eritroblasto Ortocromático. As diferenças estatísticas significativas estão representadas pelas correlações de Pearson (r) em $p < 0,05$.

6.4.3.2 - Alterações na série branca

No intuito de dar continuidade às investigações referentes à associação entre as células da medula óssea da linhagem leucopoética e as células do sangue periférico de cães infectados por *L. chagasi* portadores de diferentes formas clínicas, foram realizadas análises de correlação envolvendo o número de mieloblastos, promielócitos, mielócitos neutrófilos e eosinófilos, metamielócitos neutrófilos e eosinófilos bastonetes neutrófilos e eosinófilos, segmentados neutrófilos e eosinófilos, linfócitos, monócitos e plasmócitos obtidos no mielograma e os parâmetros hematológicos: global de leucócitos e os valores absolutos de granulócitos, neutrófilos bastonetes e segmentados, eosinófilos, linfócitos e monócitos obtidos no leucograma. Assim, não foram observadas diferenças

significativas entre as células da medula óssea e os parâmetros hematológicos nas análises de correlação envolvendo todos os cães infectados, porém foram observadas diferenças significativas nas análises considerando os grupos clínicos de cães separadamente.

Dessa forma, o grupo de cães assintomáticos apresentou correlações significativamente positivas entre mielócitos eosinófilos, metamielócitos eosinófilos e bastonetes eosinófilos e os valores absolutos de eosinófilos, bem como entre linfócitos e os valores absolutos de linfócitos. Por outro lado, os valores absolutos de monócitos do grupo assintomático apresentaram correlação negativa com o número de monócitos da medula óssea (Figura 9).

No grupo de cães oligossintomáticos apenas uma análise de correlação foi considerada significativamente positiva entre segmentados eosinófilos e os valores absolutos de eosinófilos (Figura 10).

Adicionalmente, o grupo clínico sintomático apresentou correlações positivas entre bastonetes eosinófilos e segmentados eosinófilos e os valores absolutos de linfócitos, assim como entre bastonetes eosinófilos e os valores absolutos de eosinófilos. Análises dos dados evidenciaram correlações negativas entre segmentados neutrófilos e os valores globais de leucócitos bem com entre linfócitos e os valores absolutos de linfócitos (Figura 10).

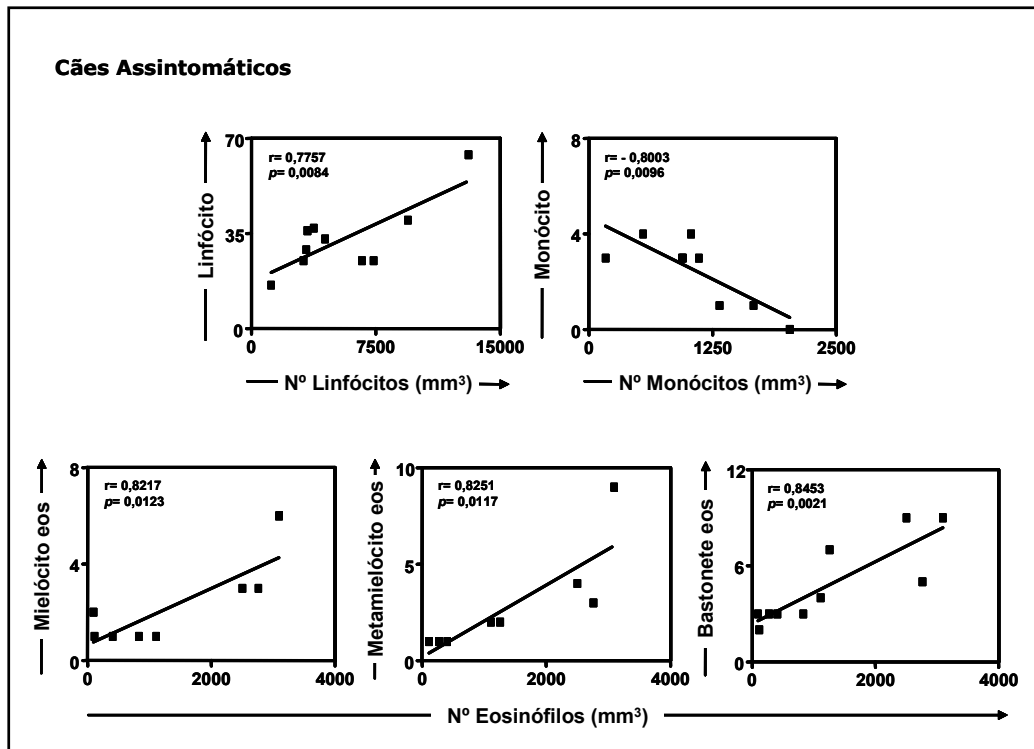


Figura 9: Correlação entre os valores obtidos no leucograma e os valores obtidos no mielograma da linhagem leucopoética considerando o grupo de cães assintomáticos. O eixo x representa os parâmetros hematológicos avaliados, enquanto o eixo y ilustra os valores do número de células na medula óssea. As diferenças estatísticas significativas estão representadas pelas correlações de Pearson (r) em $p < 0,05$.

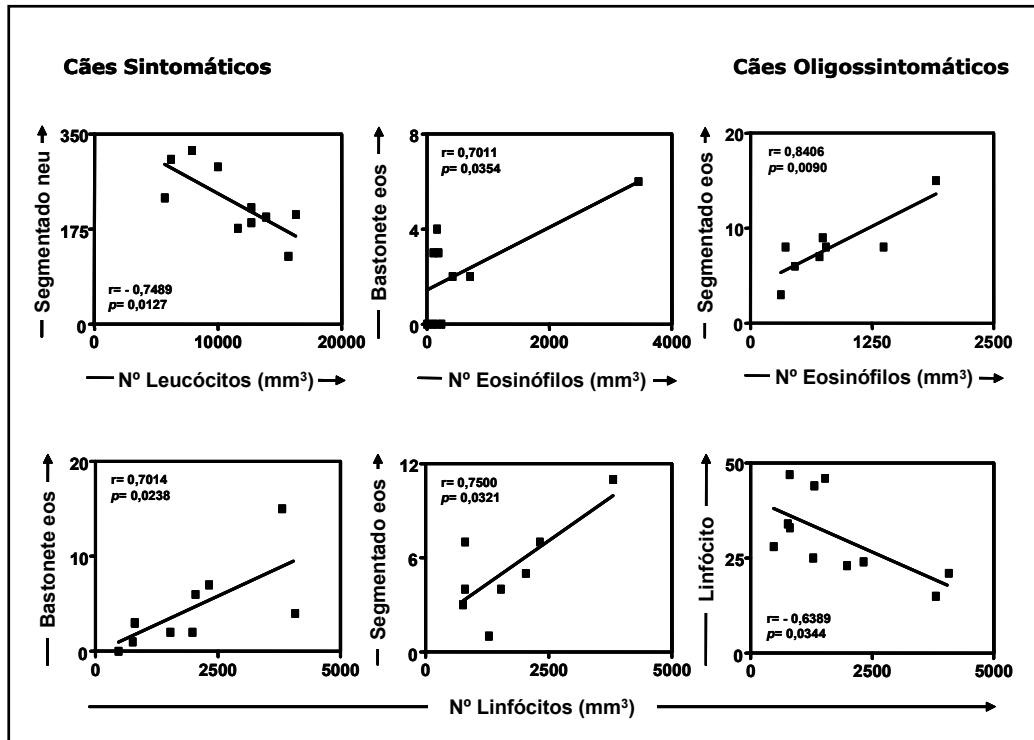


Figura 10: Correlação entre os valores obtidos no leucograma e os valores obtidos no mielograma da linhagem leucopoética considerando o grupo de cães oligossintomáticos e sintomáticos. O eixo x representa os parâmetros hematológicos avaliados, enquanto o eixo y ilustra os valores do número de células na medula óssea. As diferenças estatísticas significativas estão representadas pelas correlações de Pearson (r) em $p < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

O cão além de exercer importante papel como principal reservatório doméstico para Leishmaniose Visceral Humana tem sido considerado um modelo experimental relevante para infecção por *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, uma vez que muitos aspectos assemelham-se àqueles observados na doença humana (Keenan *et al.*, 1984b; Hommel *et al.*, 1995; Alvar *et al.*, 2004). A análise das características clínicas e patológicas na LVC revelou três principais formas clínicas em animais naturalmente infectados, geralmente nomeados assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos, tanto na infecção natural quanto experimental (Mancianti *et al.*, 1988; Pinelli *et al.*, 1994; Keenan *et al.*, 1984b; Abranches *et al.*, 1991a; Cordeiro-da-Silva *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2006a; Reis *et al.*, 2008).

Os principais sinais clínicos apresentados pelos cães sintomáticos avaliados neste estudo foram pelagem opaca (50,8%), onicogrifose (64,6%), alopecia localizada (52,3%) e emagrecimento moderado (30,8%). Esses dados diferem dos relatos recentes da literatura, onde lesões de pele e linfadenopatia foram identificados como os sinais clínicos mais freqüentes na LVC (Ciaramella *et al.*, 1997; Amusategui *et al.*, 2003; Solano-Gallego *et al.*, 2004).

Alterações na hematopoese são comumente associadas à infecção por vírus, bactérias e protozoários. Por exemplo, a hematopoese é suprimida durante infecção experimental com Cytomegalovírus murino (Busch *et al.*, 1991; Gibbons *et al.*, 1995) e *Salmonella typhimurium* (Peterson *et al.*, 1992). Por outro lado, aumento na hematopoese tem sido observado na malária experimental (Weiss *et al.*, 1989; Asami *et al.*, 1992), esquistossomose (Clark *et al.*, 1988; Dutra *et al.*, 1997) e leishmanioses (Mirkovich *et al.*, 1986).

Entretanto, poucos estudos têm sido direcionados com objetivo de avaliar os mecanismos de mudanças básicas na função hematopoética, na expressão de quimiocinas e citocinas ou avaliação do impacto direto dos agentes infecciosos nas células que regulam esses processos. Na LV experimental, causada por *Leishmania donovani* os parasitos persistem no baço e medula óssea e sua expansão nesses lugares é associada com aumento na atividade hematopoética local. Estudos realizados por Cotterell *et al.* (2000a) mostraram que *L. donovani* tem como alvo macrófagos estromais da medula óssea *in vivo* e podem infectar e multiplicar nas linhagens de células estromais de macrófagos, mas não em outras linhagens *in vitro*. A infecção de

macrófagos estromais aumenta a capacidade destes de suportar mielopoese *in vitro*, um efeito mediado principalmente através da indução de GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) e TNF- α .

Apesar das alterações hematológicas já relatadas na Leishmaniose visceral humana e canina, e considerando a medula óssea como um importante órgão alvo da *L. chagasi*, poucos trabalhos relatam as alterações no compartimento hematopoético provocada por estes parasitos. Com o intuito de contribuir na investigação da conseqüência da infecção por *L. chagasi* na hematopoese, esse estudo propôs avaliar, as alterações eritropoéticas e leucopoéticas em relação à progressão clínica da doença em cães e o impacto da carga parasitária sob a medula óssea.

Em uma abordagem clínica, um grande grupo de cães naturalmente infectados pertencentes à área endêmica, foi clinicamente classificado em três subgrupos: assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos. Grande parte dos resultados aqui apresentados são achados pioneiros no estudo da patogênese da LVC no que tange os aspectos da eritropoese e leucopoese. As alterações da série vermelha na medula óssea referentes à diminuição de proeritroblastos e eritroblastos policromáticos em cães assintomáticos em relação a cães não infectados estão de acordo com as alterações no sangue já relatadas na literatura de anemia normocítica e normocrômica. No presente estudo, cães infectados por *L. chagasi* apresentaram diminuição do número de eritroblastos ortocromáticos caracterizando hipoplasia eritróide na LVC independente da forma clínica. A contagem diferencial indicou uma eritropoese com morfologia e seqüência de maturação normais como relatos prévios (Tryphonas *et al.*, 1977). A emperipolese observada em cães sintomáticos tem sido relatada em humanos (Cashell & Buss, 1992) e ratos (Lee, 1989) em condições de perda de sangue crônica, carcinomas, distúrbios mieloproliferativos e trombocitose reativa. Foglia *et al.* (2006) relataram emperipolese em cães com graves sinais clínicos de leishmaniose. Dessa forma, é possível que em cães com LVC esse fenômeno possa ser um sinal de anormalidade na medula óssea.

A razão I:Me mostrou aumento nos grupos clínicos revelando a prevalência da proliferação de proeritroblastos e eritroblastos basófilos diante da diminuição de eritroblastos policromáticos e ortocromáticos na LVC. A taxa de maturação eritróide (EMI), por sua vez esteve diminuída devido à hipoplasia eritróide presente na LVC na

maioria das células da linhagem eritróide. Na LVC experimental, Keenan *et al.* (1984a) também relataram anemia normocítica e normocrômica em todos os cães infectados. Por outro lado, não observaram mudanças nos precursores eritróides em filmes de medula óssea desses cães. Saeed *et al.* (1998) relataram que a anemia na LV humana é causada por fatores como formação de colônias prejudicada, utilização de ferro através de progenitores eritróides e hemólise aumentada em associação com resposta inflamatória à infecção. Deficiência de eritropoetina não parece ser o principal fator patogênico no desenvolvimento de anemia em leishmanioses, embora pudesse contribuir para isso. Na LVC não tem sido relatado se a deficiência de eritropoetina é um fator importante no desenvolvimento da anemia ou se há alterações nos valores de eritropoetina na anemia pela LVC, embora haja alterações descritas nos rins de cães infectados relacionadas com a função renal tais como, azotemia, hematúria, proteinúria bem como a deposição de imunocomplexos e glomerulonefrite (Nieto *et al.*, 1992).

Hiperplasia mielóide na LVC tem sido relatada em alguns trabalhos (Tryphonas *et al.*, 1977; Foglia *et al.*, 2006). Neste estudo a hiperplasia mielóide foi observada nas células precursoras da linhagem granulocítica, como mieloblastos em cães oligossintomáticos, promielócitos em cães assintomáticos, mielócitos neutrófilos em todos os grupos clínicos e metamielócitos neutrófilos em cães assintomáticos e cães sintomáticos. Porém nas formas maduras da linhagem neutrofílica esse aumento não foi significativo. Este fenômeno parece estar relacionado com a proliferação dos precursores celulares na tentativa de fornecer ao organismo elementos celulares como neutrófilos, eosinófilos e basófilos, importantes nos eventos inflamatórios em diferentes sítios alvos do parasito, devido a uma alta demanda de células granulocíticas. Além disso, estudos realizados por Cotterell *et al.* (2000b) mostra que infecção experimental em BALB/c por *L.donovani* induz ao aumento de mielopoese e mobilização rápida, porém transiente de células progenitoras para a circulação, associado com elevados níveis de GM-CSF, CFU-GM demonstrando de fato o aumento da atividade proliferativa de granulócitos e monócitos induzidos por este parasito.

O papel dos neutrófilos durante os processos agudos da inflamação já é bem conhecido. Além disso, essas células têm atividade microbicida, respondem a estímulos diversos, contribuindo através de mecanismos efetores mediados pela atividade fagocítica ou pela liberação de intermediários reativos de oxigênio. A participação de

neutrófilos em mecanismos efetores da resposta imune, sendo estas células potencialmente produtoras de citocinas durante a infecção por diversos patógenos intracelulares, inclusive *Leishmania* tem sido relatada (Denkers & Marchall, 1998). Estudos sugerem que neutrófilos podem controlar a infecção por *L. donovani* experimental através da produção de reativos intermediários do oxigênio, exercendo um importante papel na destruição inicial do parasito e no recrutamento de fagócitos mononucleares (Murray & Nathan, 1999). Dessa forma, os neutrófilos poderiam ter um papel fundamental no controle inicial da infecção por *Leishmania*, sendo capazes de destruir formas promastigotas através da ativação de mecanismos oxidativos, além de contribuir para o recrutamento adicional de células mononucleares. A habilidade de polimorfonucleares em eliminar o parasito em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, foi inicialmente demonstrada por Brandonisio *et al.* (1996), confirmando a produção de superóxidos nos mecanismos microbicidas de polimorfonucleares.

A razão M:E consiste em uma comparação das proporções relativas das células granulocíticas e eritrocíticas, seu valor de referência em cães clinicamente normais está entre 1 e 2 (Hoff *et al.*, 1985; Jain, 1986). A razão M:E aumentada está relacionada à hiperplasia mielóide resultante do aumento de células da linhagem granulocítica. Por outro lado, uma diminuição da razão M:E está relacionada à hiperplasia eritróide resultante do aumento de células da linhagem eritropoética. Nesse sentido, o aumento da razão M:E reflete bem o resultado acima, caracterizando numericamente a hiperplasia mielóide. Pode-se concluir também que essa hiperplasia está relacionada ao aumento de células precursoras da linhagem neutrofílica demonstrada pelo aumento da razão I:Mg nos grupos clínicos. Além disso, como esperado, resultado inverso foi demonstrado na taxa de maturação mielóide (MMI), diminuída nos grupos clínicos demonstrando uma deficiência no sincronismo de maturação nas células da linhagem neutrofílica na doença canina. Os resultados da razão M:E observada no presente estudo estão em concordância com de Hoff *et al.* (1985) que também encontraram aumento da razão M:E e diminuição de células eritróides na medula óssea de cães com anemia pobremente responsiva. Portanto, os cães deste estudo provavelmente são portadores de anemia não-regenerativa periférica conforme já relatado na LVC por diversos autores (Abranches *et al.*, 1991b; Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Ikeda *et al.*, 2002; Reis *et al.*, 2006a).

Os eosinófilos e seus precursores não foram os responsáveis pelo aumento das razões M:E e I:M, pois uma hipoplasia eosinofílica foi observada nas diferentes formas clínicas indicando uma disfunção medular e podendo estar relacionada ao perfil de citocinas inflamatórias presentes nesta fase da infecção, contribuindo de forma determinante para os achados hematológicos da eosinopenia periférica já relatadas nas formas graves da LVC (Tryphonas *et al.*, 1977; Reis *et al.*, 2006a). É importante ressaltar que IL-5 estimula a produção de eosinófilos na medula óssea atuando na CFU-Eo (Travlos, 2006b) e na LVC esta citocina tem sido associada ao padrão de resposta tipo 2 (Th2). Segundo Strauss- Ayali *et al.* (2007) em cães oligossintomáticos foi observado aumento da expressão de IL-4 e IL-5, entretanto mais estudos são necessários para determinar se a expressão ou ausência de IL-5 na LVC influencia na proliferação de eosinófilos na medula óssea. Tryphonas *et al.* (1977) também relataram redução dos precursores eosinofílicos na medula óssea no estágio final da LVC. Entretanto, Amusatogui *et al.* (2003) relataram eosinofilia periférica principalmente em cães com sinais cutâneos.

É importante ressaltar que estudos realizados por Pearson *et al.* (1987) e Oliveira *et al.* (1997) demonstraram que os eosinófilos apresentam capacidade microbicida frente a parasitos de *L. donovani* e *L. major*, respectivamente. Nesses estudos, tem sido mostrado que ativação dos eosinófilos, em um microambiente contendo IFN- γ levaria à estimulação da produção de vários mediadores inflamatórios, inclusive a liberação de óxido nítrico. Adicionalmente, a expressão de receptores, tais como receptores tipo Toll-4, 7 e 8 na superfície celular dos eosinófilos ativados por IFN- γ parece representar uma importante via de interação eosinófilo-*Leishmania* que resultaria na morte do parasito por essas células (Nagase *et al.*, 2003). Dessa forma, a eosinopenia medular observada em cães infectados nas diferentes formas clínicas pode estar relacionada à migração preferencial de eosinófilos para os tecidos e envolvimento dos mesmos em um mecanismo leishmanicida adicional.

A linfocitose medular em cães oligossintomáticos e cães sintomáticos pode ser resultante de uma resposta compensatória com objetivo de fornecer linfócitos a órgãos alvos do parasito refletindo então na linfopenia periférica observada nos estágios avançados da LVC, que pode ser atribuída à natureza imunossupressiva da LV (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 2006b). Apesar de não haver diferença

significativa, a queda de linfócitos observada em cães assintomáticos pode estar intimamente relacionada com a linfocitose periférica observada nesta fase da doença (Reis *et al.* 2006a) indicando uma migração preferencial desta população para o sangue nas fases iniciais da LVC. Esta migração parece estar intimamente associada com o aumento de linfócitos T circulantes ($CD4^+$) e ($CD8^+$) que estão relacionados com a manutenção da morbidade clínica em cães assintomáticos e influenciam na relação parasito/hospedeiro (Reis *et al.*, 2006c). A plasmocitose observada em cães sintomáticos contribui para entender a gênese da ativação policlonal de células B na LVC que irá resultar na intensa produção de anticorpos durante a evolução clínica da doença. Considerando o recente relato na literatura que mostra queda de células B circulantes (Reis *et al.* 2006c), que poderia estar relacionada à migração seletiva desta população celular para os órgãos linfóides, podemos inferir que estas células estão sendo produzidas com objetivo de suprir diferentes órgãos linfóides do organismo. De fato, o que se observa atualmente em diferentes tecidos linfóides como o baço, fígado e linfonodos é um acentuado número de células B envolvidas em infiltrados inflamatórios e nas diversas alterações histopatológicas nestes locais (Reis, 2001; Giunchetti *et al.*, 2008a,b).

Células de Mott foram observadas em cães sintomáticos associada à plasmocitose na medula óssea e são caracterizados por plasmócitos hiperativados que contêm em seu citoplasma grânulos de imunoglobulina (Jain, 1986; Travlos, 2006a). Foi relatada elevação no número de plasmócitos e células de Mott na LVC indicando uma estimulação antigênica associada à infecção no compartimento medular (Anosa & Idowu, 1983; Yamaguchi *et al.*, 1983).

Análises de órgãos linfóides de cães naturalmente infectados por *Leishmania* revelaram áreas aumentadas de células B, principalmente plasmócitos, os quais estão associados com aumento da produção de anticorpos anti-*Leishmania*, determinado através dos testes sorológicos (Martinez - Moreno *et al.*, 1993; Giunchetti *et al.*, 2008a,b). Esses achados sugerem que a migração de células B para tecidos linfóides poderia estar ocorrendo durante a LVC ativa, com ativação e diferenciação dessas células em plasmócitos e conseqüente atividade policlonal levando a alta produção de anticorpos anti-*Leishmania*.

O aumento de monócitos observado em cães oligossintomáticos parece estar relacionado com a proliferação destas células na tentativa de conter o intenso parasitismo na medula óssea levando a destruição desta população celular, refletindo monocitopenia periférica principalmente em cães sintomáticos (Reis *et al.* 2006a). A migração de monócitos do sangue para granulomas hepáticos causados por *L.donovani* é relatado na literatura (Cervia *et al.*, 1993) e GM-CSF seria o responsável pela mobilização desses monócitos e atividade leishmanicida através da ativação de macrófagos (Murray *et al.*, 1995). Giunchetti *et al.* (2008b) relataram a presença de macrófagos nos infiltrados inflamatórios hepáticos na LVC.

Neste estudo foi também avaliado o impacto do parasitismo da medula óssea nos diferentes grupos clínicos da LVC através da LDU (“*Leishman Donovan Units*”), segundo Stauber (1955). Os resultados demonstraram que a medula óssea de cães sintomáticos apresentou maiores densidades parasitárias em comparação a cães oligossintomáticos e assintomáticos. Entretanto, de acordo com Tafuri *et al.* (2004) as manifestações clínicas da LVC não necessariamente se correlacionam com a carga parasitária. Outras investigações têm relatado uma boa correlação entre a carga parasitária no baço e linfonodo e as manifestações clínicas da LVC (Barrouin-Melo *et al.*, 2004; Sanchez *et al.*, 2004).

Reis *et al.* (2006b) demonstraram a densidade parasitária da medula óssea como um marcador parasitológico mais confiável para decifrar o status clínico da LVC, pois foi o órgão que apresentou melhor correlação com as formas clínicas comparado ao baço, linfonodo, pele e fígado. Apesar da sensibilidade relativamente baixa em cães assintomáticos (Saridomichelakis *et al.*, 2005), a citologia de medula óssea é um método altamente sensível e específico para o diagnóstico da LVC patente, sendo o grupo de cães sintomáticos a forma clínica mais relevante com alta densidade parasitária quando comparado a cães assintomáticos e oligossintomáticos (Reis *et al.* 2006b). Dessa forma, nós propomos que o filme de medula óssea seja estabelecido como a técnica de escolha para o diagnóstico parasitológico da LV em cães e humanos, pois é um método mais seguro, porém menos sensível quando comparado aos aspirados esplênicos. Entretanto, o filme de medula óssea pode alcançar uma sensibilidade similar a do aspirado esplênico se o exame da pesquisa do parasito for feito minuciosamente (Da Silva *et al.*, 2005).

Com o objetivo de avaliar o impacto do parasitismo na hematopoese, os mesmos animais foram reagrupados levando-se em conta a carga parasitária da medula óssea. O grupo de cães com alto parasitismo foi o grupo mais relevante, demonstrando que a intensidade parasitária alta na medula óssea é associada com alterações na eritropoese e leucopoese, tais como, diminuição de eritroblastos ortocromáticos, aumentada proliferação neutrofilica frente à proliferação eosinofílica diminuída, linfocitose e plasmocitose. Esses resultados complementam o trabalho de Reis *et al.* (2006c) que relataram alterações no hemograma como diminuição nos valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, bem como no número de leucócitos circulantes (eosinófilos, linfócitos e monócitos) em cães que apresentaram alta densidade parasitária na medula óssea.

Segundo Elmore (2006) e Jain (1986) as alterações celulares observadas no mielograma deveriam sempre ser acompanhadas da avaliação do hemograma. No presente estudo, foi proposto avaliar um grupo de cães naturalmente infectados por *L. chagasi* nos quais foram realizados mielograma e hemograma completo com intuito de conduzir as análises de correlação entre a celularidade na medula óssea e no sangue periférico. Nossos resultados evidenciaram anemia, leucopenia (eosinopenia, linfopenia e monocitopenia) bem como desvio à esquerda no hemograma de cães sintomáticos.

De forma interessante, observou-se uma importante relação entre a celularidade na medula óssea e no sangue periférico principalmente em cães sintomáticos, como a queda de todas as células da linhagem eritropoética da medula óssea bem como de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito no hemograma. De fato, análises estatísticas mostraram correlações positivas entre células da linhagem eritropoética e eritrograma considerando todos os cães infectados. Amusatogui *et al.* (2003) relataram que cães assintomáticos mostraram maiores valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito quando comparado a cães oligossintomáticos e sintomáticos.

Estes resultados permitem especular que na LVC sintomática há uma depressão na eritropoese que pode ser devido a um mecanismo multifatorial, no qual disfunção medular com eritropoese diminuída, afetada pelo intenso parasitismo na medula óssea são os principais fatores.

Trombocitopenia ocasional na LVC experimental foi relatada por Keenan *et al.* (1984a). No presente trabalho, os valores médios da contagem de plaquetas se

mantiveram dentro dos limites de normalidade descritos por Jain (1993) em todos os grupos clínicos, não havendo diferença significativa entre os grupos discordando dos relatos de Slappendel & Ferrer (1998) que verificaram a ocorrência de trombocitopenia em 50% dos animais estudados.

Análises adicionais neste grupo demonstraram aumento de todas as células da linhagem neutrofilica da medula óssea assim como de neutrófilos bastonetes no hemograma em cães sintomáticos. Este resultado parece indicar que cães sintomáticos apresentam uma grande demanda de células neutrofilicas caracterizado pelo desvio à esquerda no hemograma, uma vez que como comentado anteriormente, neutrófilos têm atividade leishmanicida no controle inicial da infecção. Amusatogui *et al.* (2003) relataram que cães assintomáticos mostraram baixos valores de neutrófilos no sangue periférico, portanto os neutrófilos poderiam estar migrando para os tecidos logo no início da infecção.

Foram observadas análises de correlação negativa entre os neutrófilos segmentados da medula óssea e leucócitos do sangue periférico de cães sintomáticos, comprovando dessa forma a migração de neutrófilos segmentados para os órgãos alvo. O aumento de neutrófilos no baço de cães com LVC comparado com sangue periférico tem sido relatado (Barrouin-Melo *et al.*, 2006). Por outro lado, eosinopenia do sangue periférico de cães sintomáticos foi relacionada com diminuição de eosinófilos bastonetes e segmentados na medula óssea. Este fato foi comprovado através de análises de correlação positivas entre eosinófilos do sangue periférico e segmentados e bastonetes eosinófilos da medula óssea em cães oligossintomáticos e sintomáticos, respectivamente. Podemos inferir com esses resultados que eosinófilos estariam migrando para os tecidos devido ao seu mecanismo microbicida já relatado, portanto a eosinopenia observada na medula óssea é devido a uma grande demanda de células eosinofílicas na LVC sintomática. Além disso, cães assintomáticos apresentaram correlação positiva entre mielócitos, metamielócitos e bastonetes eosinófilos na medula óssea e os valores de eosinófilos do sangue periférico.

Os resultados obtidos de aumento de linfócitos na medula óssea deste grupo 2 foram similares aos resultados do grupo 1. O aumento da demanda de linfócitos é sustentado pelos eventos de caráter imunológicos já descritos (Cabral *et al.*, 1992; Pinelli *et al.*, 1994) que são ativados na infecção por *L. chagasi* devido a alta atividade da

resposta imune do hospedeiro para ser eficiente em remover o parasito. De forma interessante, os resultados de linfócitos obtidos no hemograma que mostram uma linfocitose em cães assintomáticos e linfopenia em cães sintomáticos corroboram com os resultados de Reis *et al.* (2006a). As análises de correlação comprovam esses resultados, uma vez que em cães assintomáticos foi relatada correlação positiva entre linfócitos da medula óssea e do sangue periférico, entretanto em cães sintomáticos foi relatada correlação negativa entre linfócitos da medula óssea e do sangue periférico.

Linfopenia no sangue periférico de cães sintomáticos foi positivamente correlacionada com bastonetes e segmentados eosinófilos da medula óssea. Mais estudos são necessários para determinar a natureza e o significado dessas correlações.

Uma diminuição dos valores absolutos de monócitos circulantes foi observada no hemograma de cães sintomáticos. Resultados semelhantes foram obtidos por Reis *et al.* (2006a) que observaram monocitopenia em cães sintomáticos. Esses dados poderiam sugerir durante a LVC ativa, há o recrutamento intenso de monócitos para os tecidos linfóides, onde estes poderiam desempenhar importantes papéis imunológicos através da apresentação de antígenos e eliminação do parasito. Entretanto não é exatamente isto que ocorre, uma vez que se observa alta carga parasitária em tecidos linfóides como o baço, fígado, linfonodo além de medula óssea e pele (Reis *et al.*, 2006b). Por outro lado o aumento de macrófagos no baço de cães com LVC já tem sido documentado, onde estas células estariam atuando na formação do processo inflamatório tecidual (Barrouin-Melo *et al.*, 2006). Análise de correlação negativa entre monócitos da medula óssea e do hemograma foi relatada em cães assintomáticos sugerindo que uma migração de monócitos para os tecidos e conseqüente monocitopenia periférica implicaria em uma maior proliferação de monócitos na medula óssea.

Após a infecção, a partir do local de inoculação do parasito na pele do cão, o parasito dissemina transportado através de histiócitos e células de Langerhans para os linfonodos, medula óssea, baço, fígado, pulmões e trato gastrointestinal, sendo raramente detectado na corrente sanguínea (Cardoso & Cabral, 1998). Tem sido relatado o processo de migração celular de células do sangue periférico para esses órgãos-alvo na LVC (Barrouin-Melo *et al.*, 2006; Giunchetti *et al.*, 2006). Além disso, quimiocinas induzidas em resposta a *Leishmania* são conhecidas por recrutar monócitos/macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (Matte & Olivier, 2002; Teixeira *et al.*,

2006). Esse evento poderia explicar a leucopenia associada à eosinopenia, monocitopenia e linfopenia no sangue periférico de cães sintomáticos.

O conjunto de resultados apresentados neste trabalho aponta a medula óssea como um importante órgão no estudo da LVC e representa uma ferramenta de diagnóstico adicional tanto na pesquisa de parasitos quanto no âmbito das alterações celulares, nesse caso associando mielograma ao hemograma. Além disso, moléculas na superfície de células hematopoéticas desempenham um importante papel no seu desenvolvimento e função, servindo como objetos de crescentes avanços no conhecimento do sistema imune.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a realização do mielograma deve ser considerada no diagnóstico e prognóstico da LVC, pois, como foi demonstrado, parasitos de *L. chagasi* induzem alterações na celularidade, tanto na linhagem eritropoética quanto leucopoética da medula óssea. Essas alterações são influenciadas pela forma clínica e pela densidade parasitária destacando-se que cães sintomáticos e com alto parasitismo apresentaram maiores alterações. Além disto, as alterações das células no mielograma estão intimamente relacionadas às variações nos valores absolutos das células no hemograma e ambos os exames devem ser realizados. Pode-se concluir que o padrão hematológico medular para o diagnóstico da LVC incluiu uma eritropoese diminuída, aumento da proliferação de precursores neutrofilicos, diminuição da proliferação de precursores eosinofílicos e linfocitose associada à plasmocitose. Além disso, o hemograma é uma ferramenta de diagnóstico laboratorial complementar na LVC ativa com um quadro hematológico de anemia e leucopenia devido à eosinopenia, linfopenia e monocitopenia.

9. PERSPECTIVAS

Futuros estudos devem ser realizados envolvendo imunofenotipagem de células da medula óssea através da citometria de fluxo. Estes estudos terão como objetivo o estabelecimento de um painel de anticorpos capazes de caracterizar os aspectos imunofenotípicos do processo da mielopoese. Através do uso de anticorpos monoclonais para caracterização de subpopulações celulares, identificação dos estágios de diferenciação e análise de aspectos da migração e imunorregulação, respectivamente.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANCHES, P.; SANTOS-GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L.F.; JAFFE, C.L. (1991a). An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v.13, p.537-550.
- ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M.C.D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.M.; SANTOS-GOMES, G.M.; JANZ, J.G. (1991b). Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. *J. Parasitol.*, v. 77, p.557-561.
- ACEDO-SÁNCHEZ, C.; MARTIN SÁNCHEZ, J.; VÉLEZ-BERNAL, I.D.; SANCHIS MARIN, M.C.; LOUASSINI, M.; MALDONADO, J.A.; MORILLAS MÁRQUEZ, F. (1996). Leishmaniasis eco-epidemiology in the Alpujarra region (Granada Province, southern Spain). *Int. J. Parasitol.*, v.26, p.303-310.
- ADLER, S.; THEODOR, O. (1932). Investigations on Mediterranean Kala-Azar. VI Canine Visceral Leishmaniasis. *Proc. Royal Soc.*, v.110, p. 402-412.
- AGARWAL, S.; NARAYAN, S.; SHARMA, S.; KAHKASHAN, E.; PATWARI, A.K. (2006). Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis. *Indian. J. Pediatr.*, v. 73, p.445-446.
- ALENCAR, J.E. (1959). Calazar canino, contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil, 1959, 342 p. (Tese, Doutorado) - Imprensa Oficial, Fortaleza.
- ALENCAR, J.E.; CUNHA, R.V. (1963). Inquérito sobre calazar no Ceará. *Rev. Bras. Malariol. Doen. Trop.*, v.15, p.391-403.
- ALENCAR, J.E.; NEVES, J. (1982). Leishmaniose visceral (Calazar). In: *Veronesi, R.* ed. Doenças infecciosas e parasitárias. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.724-738.
- ALEXANDROV, A. F. (1930). Die Morphologie des Sternumpunktates von Hunden. *Folia Haematol.*, v.41, p. 428-434.
- ALVAR, J.; MOLINA, R.; ANDRÉS, M.S.; TESOURO, M.; NIETO, J.; VITUTIA, M.; GONZÁLEZ, F.; ANDRÉS, M.D.S.; BOGGIO, J.; RODRIGUEZ, F.; SÁINZ, A.; ESCACENA, C. (1994). Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 88, p. 371-378.
- ALVAR, J.; CANÃVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. (2004). Canine Leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v.57, p.1-88.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M.A. (2003). Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *Eur. J. Epidemiol.*, v.18, p.147-156.

- ANOSA, V.O.; IDOWU, A.L. (1983). The clinico-haematological features and pathology of leishmaniasis in a dog in Nigeria. *Zentralbl Veterinarmed B.*, v. 30, p.600-608.
- ASAMI, M.; OWHASHI, M.; ABE, T.; NAWA, Y. (1992). A comparative study of the kinetic changes of hematopoietic stem-cells in mice infected with lethal and nonlethal malaria. *Int. J. Parasitol.*, v. 22, p.43-47.
- ASHFORD, D.A.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; DAVID, J.; BADARÓ, R. (1992). Características clínicas e demográficas da leishmaniose visceral canina em Jacobina – Bahia – 1989-1991. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA TROPICAL, Belém. Anais...Belém: s.n., p. 82.
- ASHFORD, D.A.; BOZZA, M.; FREIRE, M.; MIRANDA, J.C.; SHERLOCK, I.; EULÁLIO, C.; LOPES, U.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W.; BARKER Jr, R.H.; BADARÓ, R.; DAVID, J.R. (1995). Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Tropic. Med. Hyg.*, v. 53, p. 251-255.
- BARROUIN-MELO, S.M.; LARANJEIRA, D.F.; TRIGO, J.; AGUIAR, P.H.; DOS-SANTOS, W.L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. (2004). Comparison between splenic and lymph node aspirations as sampling methods for the parasitological detection of *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, p.195–197.
- BARROUIN-MELO, S.M.; LARANGEIRA, D.F.; SANTOS, S.O.; CHAGAS-JÚNIOR, A.D.; PAIXÃO, M.; AGUIAR, P.H.; DOS-SANTOS, W.L.; PONTES-DE-CARVALHO, L. (2006). A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.111 , p.251-261.
- BASTIEN P.; BLAINEAU C.; PAGES M. (1992). Leishmania: sex, lies and karyotype. *Parasitol. Today*. v.8, p.174-177.
- BATTISTINI M.,G.& HERRER, A. (1945). Intradermo-reaccion en la Leishmaniosis Tegumentária en el Perú. III. La prueba intradérmica con “*Leishmania*” en el hombre. *Rev. Med. Exp.*, v.4, p.109-116.
- BINHAZIM, A.A.; CHAPMAN, W.L.; SHIN, S.S.; HANSON, W.L. (1993). Determination of virulence and pathogenesis of a canine strain of *Leishmania infantum* in hamsters and dogs. *Am. J.Vet. Res.*, v. 54, p.113–120.
- BISWAS, T.; JAYANTA, K. P.; KHUDIRAM, N.; GHOSH, D.K.;GHOSAL, J. (1995). Lipid peroxidation of erythrocytes during anemia of the hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry*,v.146, p.99–105.

- BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORÉ, J.L.; BOURDOISEAU, G. (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *Veterinary Journal*, v.162, p.108-120.
- BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; MAGNOL, J.P.; SAINT-ANDRE, I.; CHABANNE, L. (1997). Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 56, p.345–351.
- BRANDONISIO, O.; CARELLI, G.; CECI, L.; CONSENTI, B.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. (1992). Canine leishmaniasis in the Gargano Promontory (Apulia, South Italy).*Eur. J. Epidemiol.*, v.8, p.273-276.
- BRANDONISIO, O.; PANUNZIO, M.; FALIERO, S.M.; CECI, L.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. (1996). Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.53, p.95-103.
- BRENER, Z. (1957). Calazar canino em Minas Gerais. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG, 90p. (Tese ,Doutorado em Parasitologia).
- BRYCESON, A.D.M. (1996). Leishmaniasis. In: COOK, G.C., (ed.). *Manson's tropical diseases*. WB Saunders Company, London; p. 1213-1245.
- BUSCH, F.W.; MUTTER, W.; KOSZINOWSKI, U.H.; REDDEHASE, M.J. (1991). Rescue of myeloid lineage-committed preprogenitor cells from cytomegalovirus-infected bone-marrow stroma. *J. Virol.*, v.65, p.981-984.
- CABRAL, M.; GRADY, J.O.; ALEXANDER, J. (1992). Demonstration of *Leishmania* specific cell mediated and humoral immunity in asymptomatic dogs. *Parasite Immunology*, v.14, p.531–539.
- CAR, B. D. (2000). Erythropoiesis and erythrokinetics. In: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN N. C. Schalm's Veterinary Hematology, 5 ed., Philadelphia: Willians & Wilkins, , cap. 18, p. 105-109.
- CARDOSO, L.; CABRAL, M. (1998). *Leishmania* and canine Leishmaniosis. *Rev. Port. C. Vet.* , v. 93, p. 122-141.
- CARDOSO, L.; NETO, F.; SOUSA, J.C.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M. (1998). Use of a leishmanin test in the detection of canine *Leishmania* specific cellular immunity. *Vet. Parasitol.*, v. 79, p. 213–220.
- CARDOSO, L.; SCHALLIG, H.D.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CABRAL, M.; ALUNDA, J.M.; RODRIGUES, M. (2007). Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 117, p. 35-41.

- CARVALHO, E.M.; TEIXEIRA, R.S.; JOHNSON, W.D. (1981). Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect. Immun.*, v. 33, p. 498-500.
- CASHELL, A.W.; BUSS, D.H. (1992). The frequency and significance of megakaryocytic emperipolesis in myeloproliferative and reactive states. *Ann. Hematol.*, v.64, p.273-276.
- CAVALIERO, T.; ARNOLD, P.; MATHIS, A.; GLAUS, T.; HOFMANN-LEHMANN, R.; DEPLAZES, P. (1999). Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J. Vet. Intern. Med.*, v.13, p. 330-334.
- CERVIA, J.S.; ROSEN, H.; MURRAY, H.W. (1993). Effector role of blood monocytes in experimental visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.*, v.61, p.1330-1333.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, L.; GRADONI, R.; AMBROSIO, L.; CORTESE, A.; SCALONE, A.; PERSECHINO, A. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Record*, v. 141, p.539-543.
- CLARK, C.R.; CHEN, B.D.M.; BOROS, D.L. (1988). Macrophage progenitor-cell and colony-stimulating factor production during granulomatous *schistosomiasis mansoni* in mice. *Infect. Immun.*, v.56, p.2680-2685.
- CORDEIRO-DA-SILVA, A.; CARDOSO, L.; ARAÚJO, N.; CASTRO, H.; TOMAS, A.; RODRIGUES, M.; CABRAL, M.; VERGNES, B.; SERENO, D.; OUAISSI, A. (2003). Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein homologue during canine natural infections: pathological implications. *Immunol. Lett.*, v. 86, p.155-162.
- CORREDOR, A.; GALLEGU, J. F.; TESH, R. B.; MORALES, A.; DE CARRASQUILLA, C. F.; YOUNG, D. G.; KREUTZER, R. D.; BOSHELL, J.; PALAU, M. T.; CACERES, E.; PELAEZ, D. (1989). Epidemiology of visceral leishmaniasis in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.40, p.480-486.
- CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. (2004). PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 98, p.12-17.
- COSTA, C.A.; GENARO, O.; LANA, M.; MAGALHÃES, P.A.; DIAS, M.; MICHALICK, M.S.; MELO, M.N.; COSTA, R.T.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M.; MAYRINK, W. (1991). Canine visceral leishmaniasis: evaluation of the serologic method used in epidemiologic studies. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.24, p. 21-25.

- COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. (2000a). *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood*, v. 95, p.1642-1651.
- COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. (2000b). Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. *Infect. Immun.*, v.68, p.1840-1848.
- CUNHA, A.M.; CHAGAS, E. (1937). Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 32, p.329-337.
- DA COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. (2007). Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *The Veterinary Journal*, v.174, p.636-643.
- DANTAS-TORRES, F. (2006). *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.101, p.117-118.
- DASH, S.; AWASTHI, A.; MARWAHA, R.K. (2005). Haematological profile of childhood visceral leishmaniasis. *Indian. J. Pathol. Microbiol.*, v. 48, p.4-6.
- DA SILVA, V.O.; BORJA-CABRERA, G.P.; CORREIA PONTES, N.N.; DE SOUZA, E.P.; LUZ, K.G.; PALATNIK, M.; PALATNIK DE SOUSA, C.B. (2000). A phase III trial of efficacy of the FML-vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (São Gonçalo do Amaranto, RN), *Vaccine*, v. 19, p. 1082-1092.
- DA SILVA, M.R.; STEWART, J.M.; COSTA, C.H. (2005). Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 72, p. 811-814.
- DAVID, J.R.; STAMM, L.M.; BEZERRA, H.S.; SOUZA, R.N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J.W. (2001). Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.96, p. 839-847.
- DAY, M.J. (2007). Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet. Parasitol.*, v. 147, p.2-8.
- DE ANDRADE, H.M.; REIS, A.B.; DOS SANTOS, S.L.; VOLPINI, A.C.; MARQUES, M.J.; ROMANHA, A.J. (2006). Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 140, p.231-238.

- DEANE L.M. & DEANE M.P. (1954). Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. *O Hospital*, Rio de Janeiro, v.45, p.419-421.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. (1955a). Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. *O Hospital*, v.48, p.61-76.
- DEANE, L.M.; DEANE, M.P. (1955b). Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. *O Hospital*, v.47, p.75-87.
- DEANE, L. M. (1956). Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre Reservatórios e Transmissores no Estado do Ceará. Tese, (Fac. Med. Univ. São Paulo), Brasil, Ed. S.N.E.S., Rio de Janeiro, 162p.
- DEANE, L. M. & DEANE, M. P. (1962). Visceral leishmaniasis in Brazil: Geographical distribution and transmission. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo*, v.4, p.198-212.
- DE LUNA, R.; VUOTTO, M.L.; IELPO, M.T.L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; MOSCATIELLO, V.; CIARAMELLA, P.; SCALONE, A.; GRADONI, L.; MANCINO, D. (1999). Early suppression of lymphoproliferative response in dogs with natural infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 70, p.95-103.
- DE LUNA, R.; FERRANTE, M.; SEVERINO, L.; AMBROSIO, R.; PIANTEDOSI, D.; GRADONI, L.; LUCISANO, A.; PERSECHINO, A. (2000). Decreased lipid fluidity of the erythrocyte membrane in dogs with leishmaniasis-associated anaemia. *J. Comp. Pathol.*, v. 122, p.213-216.
- DENKERS, E.Y. & MARSHALL, A.J. (1998). Neutrophils as a source of immunoregulatory cytokines during microbial infection. *The Immunologist*, v.6 (3), p.116-120.
- DESJEUX, P. (1991). Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory.,WHO/LEIS/91.30. 47 p.
- DESJEUX, P. (1996). Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.*, v. 14, p.417-423.
- DETET, J. P. (1979). Les leishmanioses en Afrique du Nord. *Bull. Inst. Pasteur*, v. 77, p. 49-82.

- DIEBOLD, J.; MOLINA, T.; CAMILLERI-BROET, S.; LE TOURNEAU, A.; AUDOUIN, J. (2000). Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy review. *Histopathology*, v.37, p.199-211.
- DUTRA, H.S.; ROSSI, M.I.D.; AZEVEDO, S.P.; ELCHEIKH, M.C.; BOROJEVIC, R. (1997). Haematopoietic capacity of colony forming cells mobilized in hepatic inflammatory reactions as compared to that of normal bone marrow cells. *Res. Immunol.*, v.148, p.437-444.
- DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. (1993). Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. *Epidemiol. Infect.*, v.110, p.647-656.
- DYE, C. (1996). The logic of visceral leishmaniasis control. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, v.55, p.125-130.
- ELMORE, S.A. (2006). Enhanced histopathology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.*, v.34, p. 666-686.
- EL-SHOURA, S.M. (1994). Visceral leishmaniasis: III. Effect of parasitaemia level on the bone marrow ultrastructure. *Appl. Parasitol.*, v. 35, p.61-69.
- EVANS, T.G.; VASCONCELOS, I.A.; LIMA, J.W.; TEIXEIRA, J.M.; MCAULLIFE, I.T.; LOPES, U.G.; PEARSON, R.D.; VASCONCELOS, A.W. (1990). Canine visceral leishmaniasis in northeast Brazil: assessment of serodiagnostic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 42, p.118-123.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN N. C. (2000). Schalm's Veterinary Hematology, 5 ed., Philadelphia: Williams & Wilkins, p. 63-128.
- FERREIRA, E.C.; LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; SILVA, E.S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C.M. (2007). Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.*, v.146, p. 235-241.
- FERRER, L.; RABANAL, R.; FONDEVILA, D.; RAMOS, J.A.; DOMINGO, M. (1988). Skin lesions in canine leishmaniosis. *J. Small Anim. Pract.*, v.29, p.381-388.
- FERRER, L. (1992). Leishmaniasis In: KIRK, R.W.; BONAGURA, J.D. (Eds.) *Kirk's Current Veterinary Therapy* 11th ed.: Small Animal Practice. Philadelphia: W.B.Saunders Company, p.266-270.
- FERRER, L.M. (1999). Clinical aspects of canine leishmaniasis. Proceedings of the International Canine Leishmaniasis, Barcelona, Spain. *Canine Leishmaniasis: An Update*. Hoeschst Roussel Vet., Wiesbaden.

- FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; SIQUEIRA, A.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; COSTA, C.A.; MAYRINK, W.; VIEIRA, E.P.; COSTA, J.S.; GENARO, O.; NASCIMENTO, E. (2003). Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.111, p. 161-173.
- FOGLIA, M. V.; RESTUCCI, B.; PAGANO A.; GRADONI L.; OLIVA G. (2006). Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet Rec.*, v. 158, p.690-694.
- GASPER, P.W. (2000). The hemopoietic system. In: FELDMAN, B.F. et al. Schalm's veterinary hematology. Philadelphia: Williams & Wilkins, cap.11, p. 63-68.
- GENARO, O.; MAYRINK, W.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; COSTA, C. A. da; MELO M. N. (1988). Naturally occurring visceral leishmaniasis in dogs: clinical aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 43.
- GENARO, O.; COSTA, C.A.; BREYNER, E.T.; REIS, A.B.; SILVA, A.R.; TROPIA, M.J.; TAFURI, W.L.; DIAS, M. & MAYRINK, W. (1992a). The course of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.87, p.105.
- GENARO, O.; RASO, P.; DA COSTA, C.A.; CARVALHO, M.D.; AMARAL, F.; BOTELHO, A.C.C.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. (1992b). Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87, p.163–164.
- GENARO, O. (1993). Leishmaniose visceral canina experimental. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 202 p. (Tese, Doutorado em Parasitologia).
- GENARO, O.; COSTA, R.T.; FRANÇA-SILVA, J.C.; REIS, A.B.; SILVA, J.C.; VIEIRA, E.P.; ARIAS, J.R.; MONTEIRO, P.S.; REED, S.G.; MAYRINK, W.; COSTA, C.A.; NETTO, E.M.; BADARO, R. (1997). Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi*, in Brazil. *Acta Parasitologica Turcica*, v.21 , p.1.
- GIBBONS, A.E.; PRICE, P.; SHELLAM, G.R. (1995). Analysis of hematopoietic stem and progenitor-cell populations in cytomegalovirus-infected mice. *Blood*, v.86, p.473-481.
- GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CARNEIRO, C.M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. (2006). Relationship between canine visceral leishmaniosis and the *Leishmania (Leishmania) chagasi* burden in dermal inflammatory foci. *J Comp Pathol.*, v.135, p.100-107.

- GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B.M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R.D.; DE SOUZA, J.V.; DAS DORES MOREIRA N.; MALAQUIAS, L.C.; MOTA E CASTRO, L.L.; DE LANA, M.; REIS, A.B. (2007). Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine*, v. 25, p. 7674-7686.
- GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. (2008a). Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.121, p.23-33.
- GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. (2008b). Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Res. Vet. Sci.*, v.84, p. 269-277.
- GRADONI, L.; POZIO, E.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy). (III) The prevalence of canine leishmaniasis in two foci of Grosseto Province. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.74, p.421-422.
- GRADONI, L.; MAROLI, M.; GRAMICCIA, M.; MANCIANTI, F. (1987). *Leishmania infantum* infection rates in *Phlebotomus perniciosus* fed on naturally infected dogs under antimonial treatment. *Med. Vet. Entomol.*, v.1, p.339-342.
- GRIMALDI, JR., G.; TESH, R.B. (1993). Leishmanioses of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.6, p.230-250.
- GROULADE, P. (1983). L'électrophorèse des protéines sériques dans la leishmaniose canine. *Rev. Med. Vet.*, v. 134, p. 701-708.
- HAMMOND, W.P.; BOONE, T.C.; DONAHUE, R.E.; SOUZA, L.M.; DALE, D.C. (1990). A comparison of treatment of canine cyclic hematopoiesis with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), G-CSF, interleukin-3, and canine G-CSF. *Blood*, v.76, p.523-532.
- HANDMAN, E. (2001). Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.14, p.229-243.
- HARVEY, J.W. (2001). Atlas of Veterinary Hematology. Blood and Bone Marrow of Domestic Animals. WB Saunders, Philadelphia, 228 p.
- HASIBEDER, G.; DYE, C.; CARPENTER, J. (1992). Mathematical modelling and theory for estimating the basic reproduction number of canine leishmaniasis. *Parasitology*, v.105, p.43-53.

- HOFF, B.; LUMSDEN, J. H.; VALLI, V. E. O. (1985). An appraisal of bone marrow biopsy in assessment of sick dogs. *Can. J. Comp.Med.*, v. 49, p.34–42.
- HOMMEL, M. (1978). The genus *Leishmania*. Biology of the parasite and clinical aspects. *Bull. Inst. Pasteur, Paris*, v.75, p. 5-102.
- HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 86, p.55–73.
- IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. (2002). Perfil hematológico de cães infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: estudo retrospectivo de 191 casos. *Clínica Veterinária*, v. 47, p. 42–48.
- IKEDA-GARCIA, F.A.; LOPES, R.S.; MARQUES, F.J.; DE LIMA, V.M.; MORINISHI, C.K.; BONELLO, F.L.; ZANETTE, M.F.; PERRI, S.H.; FEITOSA, M.M. (2007). Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.*, v.143, p. 254-259.
- JAIN, N. C. (1986). Schalm's Veterinary Hematology, 4th edn. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 8-18.
- JAIN, N. C. (1993). Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 73-81, 133-158, 219.
- KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; WEBSTER, H.K.; JOHNSON, A.J. (1984a). Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog-I. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.*, v. 21, p.74–79.
- KEENAN, C. M.; HENDRICKS, L.D.; LIGHTNER, L.; JOHNSON, A.J. (1984b). Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd dog. II. Pathology. *Vet. Pathol.*, v.21, p.80-86.
- KILLICK-KENDRICK, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. *Med. Vet. Entomol.*, v. 4, p.1-24.
- KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M.P.; CADIERGUES, M.C. (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, v.11, p.105-111.
- KNIGHT, R.; WOODRUFF, A.W.; PETTITT, L.E. (1967). The mechanism of anaemia in kala-azar. A study of 2 patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.61, p.701–705.

- KOUTINAS, A.F.; SCOTT, D.W.; KONTOS, V.; LEKKAS, S. (1993). Skin lesions in canine leishmaniasis (Kala-Azar): a clinical and histopathological study on 22 spontaneous cases in Greece. *Vet. Dermatol.*, v.3, p.121-130.
- KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K.G. (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.35, p.376-383.
- KUMAR, P.V.; VASEI, M.; SADEGHIPOUR, A.; SADEGHI, E.; SOLEIMANPOUR, H.; MOUSAVI, A.; TABATABAEI, A.H.; RIZVI, M.M. (2007). Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, v. 29, p.77-80.
- LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; DEREURE, J.; LAMOTHE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. (2002). Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology*, v.125, p. 197-207.
- LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. (2007). Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 115, p.135-145.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J.; LINS, Z.C. (1969). Leishmaniasis in Brazil. IV – The Fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania donovani* in Para State, Brazil. *Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.63, p. 741-745.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. (1979). The role of animals in the epidemiology of South American Leishmaniasis. In: Lumsden WHR. Evans, D.A. (ed.). *Biology of the Kinetoplastida*. Vol. 2, Academic Press., London and New York, p. 1-116.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution In: PETERS & KILLICK-DENDRICK. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*; London, Academic Press, v.1, p.1-20.
- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem. Inst Oswaldo Cruz.*, v.100, p.811-827.
- LAMOTHE, J. (2001). Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.*, v. 42, p.170-175.
- LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; CROSSET, H.; VOLLHARDT, Y. (1975). Ecology of leishmaniasis in the south of France. VIII. Complement to the epidemiological application of the immunofluorescence technic: geometric and arithmetic mean titers in canine leishmaniasis. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, v. 50, p. 1-5.

- LANOTTE, G.; RIOUX, J.A.; PERIERES, J.; VOLLHARDT, Y. (1979). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 10. Les formes évolutives de la leishmaniose viscérale canine. Elaboration d'une typologie bio-clinique à finalité épidémiologique. *Ann. Parasit. Hum. Comp.*, v.54; p. 277-295.
- LAVÉLAN, A.; MESNIL, F. (1903). Sur un protozoaire nouveau (*Piroplasma donovani* Lav.; Mesn.). Parasite d'une fièvre de l'Inde. *Comp. R. Hébd. Séanc. Acad. Sci.*, v. 137, p.957-961.
- LAVÉLAN, A. (1917). Leishmanioses. Kala-Azar, Bouton d'orient, Leishmaniose Américaine. (Masson et Cie., ed), Paris, 521p.
- LAZARUS, A. E.; GANAPATHY, M. S. (1968). Marrow biopsy in canines-technique-cellular pattern in health and disease. *Indian Vet. J.*, v. 45, p.590–596.
- LEE, K.P. (1989). Emperipolesis of hematopoietic cells within megakaryocytes in bone marrow of the rat. *Vet. Pathol.*, v.26, p.473-478.
- LIEW, F.Y.; O'DONNELL, C.A. (1993). Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, v.32 p.161-259.
- MANCIANTI, F.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; PIERI, S.; MARCONCINI, A. (1986). Canine leishmaniasis in the Isle of Elba, Italy. *Trop. Med. Parasitol.*, v. 37, p.110-112 .
- 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. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.82, p.566-567.
- MARGARITO, J. M.; LUCENA, R.; LOPEZ, R.; MOLLEDA, J.M.; MARTIN, E.; GINEL,P.J. (1998). Levels of IgM and IgA circulating immune complexes in dogs with leishmaniasis. *Zent. Vet.*, v. 45 , p. 263–267.
- MAROLI, M.; MIZZON, V.; SIRAGUSA, C.; D'OORAZI, A.; GRADONI, L. (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.*, v.15, p.358-363.
- MARTÍNEZ-MORENO, A.; MARTÍNEZ-CRUZ, M.S.; BLANCO, A.; HERNÁNDEZ-RODRIGUEZ, S. (1993). Immunological and histological study of T- and B- lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.*, v.51, p.49–59.

- MARZOCHI, M.C.; COUTINHO, S.G.; SOUZA, W.J.; TOLEDO L.M.; GRIMALDI, Jr; MOMEN, H.; PACHECO, R.S.; SABROZA, P.C.; SOUZA, M.A.; RANGEL, Jr F.B. & TRAMONTANO, N. (1985). Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.80, p.349-357.
- MARZOCHI, M.C.A.; BARBOSA-SANTOS, E.G.O. (1988). Evaluation of a skin test on the canine mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 83, p.391-392.
- MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. (1994). Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, v. 10, p. 359-375.
- MATHUR, P.; SAMANTARAY, J.C.; SAMANTA, P. (2007). Fatal haemophagocytic syndrome and hepatitis associated with visceral leishmaniasis. *Indian. J. Med. Microbiol.*, v. 25, p. 416-418.
- MATTE, C. & OLIVIER, M. (2002). *Leishmania*-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J. Infect. Dis.*, v. 185, p.673-681.
- MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. (2000). The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitology Today*, v.16 , p.188-189.
- MIESCHER, P.A.; BELEHU, A. (1982). Leishmaniasis: hematologic aspects. *Semin. Hematol.*, v.19, p.93-99.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, (2003). Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília, Brasil (Apostila) 122 p.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, (2005). Nota técnica, Brasília. Site: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishimune_nota_tecnica.pdf. Acesso em 28/02/2008.
- MIRKOVICH, A.M.; GALELLI, A.; ALLISON, A.C.; MODABBER, F.Z. (1986). Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice-generation of safe targets, a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 64, p.1-7.
- MISCHKE R.; BUSSE, L. (2002). Reference values for the bone marrow aspirates in adult dogs. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.*, v. 49, p.499-502.

- MOLINA, R.; AMELA, C.; NIETO, J.; SAN-ANDRES, M.; GONZALEZ, F.; CASTILLO, J.A.; LUCIENTES, J.; ALVAR, J. (1994). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, p. 491-493.
- MONTEIRO, S.P.; LACERDA, M.M.; ARIAS, J.R. (1994). Controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 27, p. 67-72.
- MORENO, P.; LUCENA, R.; GINEL, P.J. (1998). Evaluation of primary haemostasis in canine leishmaniasis. *Veterinary Record*, v. 142, p. 81-83.
- MORENO, J.; NIETO, J.; CHAMIZO, C.; GONZÁLEZ, F.; BLANCO, F.; BARKER, D.C.; ALVA, J. (1999). The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 71, p.181-195.
- MORITZ, K.M.; GAIK, B. L.; WINTROUR, E. M. (1997). Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am. Physiol. Society*, v. 273, p. R1829-R1844.
- MORRISON, S. J.; UCHIDA, N.; WEISSMAN, I. L. (1995). The Biology of Hematopoietic Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 11, p. 35-71.
- MOTT, K.E.; NUTTALL I.; DESJEUX, P.; CATTAND, P. (1995). New geographical approaches to control of some parasitic zoonoses. *Bull World Health Organ.*, v.73, p.247-257.
- MURRAY, H.W.; CERVA, J.S.; HARIPRASHAD, J.; TAYLOR, A.P.; STOECKLE, M.Y.; HOCKMAN, H. (1995). Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in experimental visceral leishmaniasis. *J. Clin. Invest.*, v.95, p.1183-1192.
- MURRAY, H.W. & NATHAN, C.F. (1999). Macrophage microbial mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J. Exp. Med.*, v.189, p.741-746.
- NAGASE, H.; OKUGAWA, S.; OTA, Y.; YAMAGUCHI, M.; TOMIZAWA, H.; MATSUSHIMA, K.; OHTA, K.; YAMAMOTO, K.; HIRAI, K. (2003). Expression and function of toll-like receptors in eosinophilis: activation by toll-like receptors 7 ligant. *J. Immunol.*, v.171, p. 3977-3982.

- NASH, R.A.; SCHUENING, F.G.; SEIDEL, K.; APPELBAUM, F.R.; BOONE, T.; DEEG, H.J.; GRAHAM, T.C.; HACKMAN, R.; SULLIVAN, P.M.; STORB, R. (1994). Effect of recombinant canine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation. *Blood*, v.83, p.1963-1970.
- NICOLLE, C. (1908). Nouvelles acquisitions sur le Kala-azar: Cultures inoculations au chien, étiologi. C.R. Hebd. *Séances et l'Acad. Sci. Paris*, v.146, p.498-499.
- NICOLLE, C.; COMTE, C. (1908). Origine canine du Kala-azar. *Bull. Soc. Path. Exot.*, v.1, p. 299-301.
- NIETO, C.G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M.A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. (1992). Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.*, v.45, p.33-47.
- NOLI, C. (1999). Canine leishmaniasis. *Waltham Focus*, v. 9, p. 16-24.
- OLIVEIRA, S.H.; FONSECA, S.G.; ROMÃO, P.R.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. (1997). Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.92, p.233-235.
- PALACIO, J.; LISTE, F.; GASCON, M. (1995). Urinary protein/creatinine ratio in the evaluation of renal failure in canine leishmaniasis. *Vet. Rec.*, v. 137, p.567-568.
- PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. (2001). Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65, p.510-517.
- PASTORINO, A.C.; JACOB, C.M.; OSELKA, G.W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M, M. (2002). Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. *J. Pediatr.*, v. 78, p.120-127.
- PEARSON, R.D.; UYDESS, I.L.; CHAPMAN, S.W.; STEIGBIGEL, R.T. (1987). Interaction of human eosinophils with *Leishmania donovani*. *Ann. Trop. Méd. Parasitol.*, v.81, p.735-739.
- PEARSON, R.D. (1993). Pathology of leishmaniasis. In Warren, K.S. (ed). *Immunology and Molecular Biology of Parasite Infection*, 3th edn. Blackwell Scientific Publications, Boston, p. 71-86.
- PENNY, R. H. C.; CARLISLE, C. H. (1970). The bone marrow of the dog: a comparative study of biopsy material obtained from the iliac crest, rib and sternum. *J. Small Anim. Pract.*, v.11, p. 727-734.

- PENNY, R. H. C. (1974). The bone marrow of the dog and cat. *J. Small Anim. Pract.*, v.15, p. 553–562.
- PETERSON, V.M.; MADONNA, G.S.; VOGEL, S.N. (1992). Differential myelopoietic responsiveness of Balb/C (Itys) and C.D2 (Ityr) mice to lipopolysaccharide administration and salmonella-typhimurium infection. *Infect. Immun.*, v.60, p.1375-1384.
- PICKER, L. J.; SIEGELMAN, M. H. (1999). Lymphoid tissues and organs. In *Fundamental Immunology*, 4th edn. (Paul, W. E., ed.) p. 479–531. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNARDINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. (1994). Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.*, v.62, p. 229–235.
- PINELLI, E.; KAAIJ, S.Y.; SLAPPENDEL, R.; FRAGIO, C.; RUITENBERG, E.J.; BERNADINA, W.; RUTTEN, V.P. (1999). Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 69, p. 121–126.
- PINELLI, E.; GEBHARD, D.; MOMMAAS, A.M.; HOEIJ, M.; LANGERMANS, J.A.; RUITENBERG, E.J.; RUTTEN, V.P. (2000). Infection of a canine macrophage cell line with *Leishmania infantum*: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. *Vet. Parasitol.*, v. 92, p. 181–189.
- PINHEIRO, P.H.C.; DIAS, S.S.; EULÁLIO, K.D.; MENDONÇA, I.L.; KATZ, S.; BARBIERI, C.L. (2005). Recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* implicated in human and dog T-cell responses. *Infect. Immun.*, v. 73, p. 3787–3789.
- POZIO, E.; GRADONI, L.; BETTINI, S.; GRAMICCIA, M. (1981). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VI. Canine leishmaniasis in the focus of Monte Argentario (Grosseto). *Acta Trop.*, v. 38, p.383-393.
- PREFEITURA DE BELO HORIZONTE (2007).
Site: <http://www.pbh.gov.br/smsa/biblioteca/protocolos/leishmanioseteguvis.pdf>
Acesso em 20/01/2008.
- PROFETA DA LUZ, Z. M.; PIMENTA, D. N.; CABRAL, A.L.; FIÚZA, V.O.; RABELLO, A. (2001). Leishmaniasis urbanization and low diagnosis capacity in the Metropolitan Region of Belo Horizonte. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.34, p.249-254.

- QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; GARCEZ, L.; DYE C. (1997). The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology*, v.115, p.143-156.
- QUINNELL, R.J.; COURTENAY O.; SHAW, M.A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE C.; KAYE, P.M. (2001). Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, v. 183, p.:1421-1424.
- REAGAN, W. J. (1993). A Review of myelofibrosis in dogs. *Toxicol. Pathol.*, v. 21, p.164–169.
- REED, S.G. (1996). Diagnosis of leishmaniasis. *Clin. Dermatol.*, v.14, p.471-478.
- REIS, A.B. (2001). Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 180 p. (Tese, Doutorado em Ciências).
- REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. (2006a). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.*, v.81, p. 68-75.
- REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA L.L.; ANDRADE, R.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO O.A. (2006b). Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.*, v.112, p.102-116.
- REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; GUERRA L.L.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. (2006c). Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Clin. Exp. Immunol.*, v.146, p.303-311.
- REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. (2008). Systemic and Compartmentalized Immune Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol. In press.*
- REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. (2002). Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol.*, v.18, p.289-290.

- REITHINGER, R.; COLEMAN, P.G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E.P.; ASSIS, G.; DAVIES, C.R. (2004). Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int. J. Parasitol.*, v. 34, p. 55-62.
- REKERS, P. E.; COULTER, M. (1948). A hematological and histological study of the bone marrow and peripheral blood of the adult dog. *Am. J. Med. Sci.*, v. 216, p. 643–655.
- SACKS, D.L.; LAL, S.L.; SHRIVASTAVA, S.N.; BLACKWELL, J.; NEVA, F.A. (1987). An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *J. Immunol.*, v. 138, p.908-913.
- SACKS, D.L.; LOUIS, J.A.; WIRTH, D.F. (1993). Leishmaniasis. In: WARREN, K.S. *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*. 3rd ed. Boston: Blackwell Scientific Publications, p. 237-268.
- SAEED, A.M.; KHALIL, E.A.; ELHASSAN, A.M.; HASHIM, F.A.; ELHASSAN, A.M.; FANDREY, J.; JELKMANN, W. (1998). Serum erythropoietin concentration in anaemia of visceral leishmaniasis (kala-azar) before and during antimonial therapy. *Br. J. Haematol.*, v. 100, p.720-724.
- SANCHEZ, M.A.; DIAZ, N.L.; ZERPA, O.; NEGRON, E.; CONVIT, J.; TAPIA, F.J. (2004). Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.70, p.618–624.
- SANTOS, E.G.; MARZOCHI, M.C.; CONCEIÇÃO, N.F.; BRITO C.M.; PACHECO, R.S. (1998). Epidemiological survey on canine population with the use of immunoleish skin test in endemic areas of human American cutaneous leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 40, p.41-47.
- SANTOS-GOMES, G.M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. (2002). Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 88, p. 21–30.
- SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. (2005). Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.73, p. 82-86.

- SHAHRIAR, D.; REZA, M.P.; REZA, A.M.; FARAMARZ, S. (1999). Cytological clues of bone marrow findings in Kala-Azar. *Diagn. Cytopathol.*, v. 20, p. 208-211.
- SHAW, J.J. (2003). New World Leishmaniasis: the ecology of leishmaniasis and the diversity of leishmanial species in central and south America. In: FARRELL, J. *World class parasites: Leishmania*, 4nd ed. London: Kluwer Academic Publishers.
- SHEIKHA, A. (2004). Dyserythropoiesis in 105 patients with visceral leishmaniasis. *Lab. Hematol.*, v. 10, p. 206-211.
- SHERLOCK, I.A.; MIRANDA, J.C.; SADIGURSKY, M.; GRIMALDI G. (1984). Natural infection of the opossum *Didelphis albiventris* (*Marsupialia, Didelphidae*) with *Leishmania donovani*, in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v. 79, p. 511.
- SIDERIS, V.; KARAGOUNI, E.; PAPAPOPOULOU, G.; GARIFALLOU, A.; DOTSIKA, E. (1996). Canine visceral leishmaniasis in the great Athens area, Greece. *Parasite*, v. 3, p.125-130.
- SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIUZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. (2001). Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, p. 285-291.
- SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; PÓVOA, M.M. (1982). Leishmaniasis in Brazil: XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of Amazonian visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 76, p. 830-832.
- SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J. Postgrad. Med.*, v. 49, p.55-60.
- SINHA, R.; DATTA, U.; SEHGAL, S. (1993). Importance of bone marrow culture for diagnosis of Kala azar. *Scand. J. Infect. Dis.*, v. 25, p. 787-789.
- SLAPPENDEL, R. J. (1988). Canine leishmaniasis: a review based on 95 cases in the Netherlands. *The Vet. Quarterly* , v. 10, p.1-16.
- SLAPPENDEL, R.J.; GREENE, C.E. (1990). Leishmaniasis. In: MILLS, L.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. Philadelphia: W. B. Saunders co., p.769-777.
- SLAPPENDEL, R. J.; FERRER, L. (1998). Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the dog and cat*. 2º ed. Philadelphia: w.B. Saunders co., cap. 73, p. 450- 458.
- SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; MORELL, P.; FONDEVILA, D.; ALBEROLA, J.; RAMIS, A.; FERRER, L. (2004). Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. Comp. Pathol.*, v.130, p.7-12.

- STASNEY, J.; G. M. HIGGINS (1937). A quantitative cytologic study of the bone marrow of the adult dog. *Am. J. Med. Sci.*, v. 193, p. 462–471.
- STAUBER, L.A. (1955). Leishmaniasis in the hamster. In: Cole, W.H. (Ed.), *Some Physiological Aspects and Consequence of Parasitism*. Rutgers University Press, New Brunswick, NJ, p. 77–90.
- STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C.L. (2007). Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.*, v. 38, p.547-564.
- TAFURI, W.L.; MICHALICK, M.S.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V.R.; BARBOSA, A.J.A.; BAMBIRRA, E.A.; COSTA, C.A.da; MELO, M.N.; MAYRINK, W. (1989). Optical and electron microscopic study of the kidney of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 31, p.139-145.
- TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. (2004). An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods*, v. 292, p.17–23.
- TEIXEIRA, M.J.; TEIXEIRA, C.R.; ANDRADE, B.B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.*, v.22, p.32-40.
- TESH, R.B. (1995). Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.52, p. 287-292.
- TRAVI, B.L.; MONTOYA, J.; GALEGO, J.; JARAMILLO, C.; LLANO, R.; VELEZ, I.D. (1996). Bionomics of *Lutzomyia evansi* (Diptera, Psychodidae) vector of visceral leishmaniasis in northern Columbia. *Journal of Medical Entomology*, v. 33, p.278-285.
- TRAVLOS, G.S. (2006a). Histopathology of bone marrow. *Toxicol. Pathol.*, v.34, p.566-598.
- TRAVLOS, G. S. (2006b). Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol. Pathol.*, v. 34, p.548–565.
- TRYPHONAS, L.; ZAWIDZKA, Z.; BERNARD, M.A.; JANZEN, E.A. (1977). Visceral leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Can. J. Comp. Med.*, v. 41, p.1-12.
- VAN LOON, E. J.; CLARK, B. B. (1943). Hematology of the peripheral blood and bone marrow of the dog. *J. Lab. Clin. Med.*, v.28, p.1575–1579.

- VERCAMMEN, F.; DE DEKEN, R. (1995). Treatment of canine visceral leishmaniasis with allopurinol. *Vet Rec.*, v.137, p.252.
- VEXENAT, J.A.; DE CASTRO, J.A.; CAVALCANTE, R.; TAVARES, J.P.; DA SILVA, M.R.; BATISTA, W.H.; CAMPOS, J.H.; HOWARD, M.K.; FRAME, I.; MCNERNEY, R. (1994). Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*,v.89, p.131-135.
- VIÑUELAS, J.; GARCÍA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRÓN, C.; CARCELÉN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. (2001). Meningeal leishmaniosis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, v. 101, p.23-27.
- WEISS, L.; JOHNSON, J.; WEIDANZ W. (1989). Mechanisms of splenic control of murine malaria-tissue-culture studies of the erythropoietic interplay of spleen, bone-marrow, and blood in lethal (strain-17xl) *Plasmodium yoelii* malaria in Balb/C Mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 41, p.135-143.
- WEISS, D. J. (2000). Aplastic anemia. In Schalm's Veterinary Hematology, 5th edn (B. F. Feldman, J. G. Zinkl, and N. C. Jain, eds.), p. 212–215. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- WEISS, D.J.; AIRD, B. (2001). Cytologic evaluation of primary and secondary myelodysplastic syndromes in the dog. *Vet. Clin. Pathol.* v.30, p.67-75.
- WEISS, D.J. (2006). A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004). *J. Vet. Intern. Med.*, v.20, p.955-961.
- WICKRAMASINGHE, S.N.; ABDALLA, S.H.; KASILI, E.G. (1987). Ultrastructure of bone marrow in patients with visceral leishmaniasis. *J. Clin. Pathol.*, v. 40(3), p.267-275.
- WIJEYARATNE, P.M.; ARSENAULT, L.K.; MURPHY, C.J. (1994). Endemic disease and development: the leishmaniasis. *Acta Trop.*, v.56, p.:349-364.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (1990). Control of the Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series, Geneva, p.793.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (1991). Indian vector now said to resist DDT. TDR news. UNDP/WORLD BANK/WHO, v.37, p.1-2.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO (1995). Leishmaniasis. Important dates, Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO Leishmaniasis: disease.2002. Site: www.who.int/tdr/diseases/leish/direction.htm. Acesso em: 04/12/2007.

XAVIER, S.C.; ANDRADE, H.M.; MONTE, S.J.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. (2006). Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet. Res.*, v. 2, p.1-7.

YAMAGUCHI, R. A.; FRENCH, T.W.; SIMPSON, C.F.; HARVEY, J.W. (1983). *Leishmania donovani* in the synovial fluid of a dog with visceral leishmaniasis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v.19, p.723-726.

ZON, L. (1995). Developmental Biology of Hematopoiesis. *Blood*. v. 86, p. 2876-2981.

11. ANEXOS

11.1 - Características morfológicas e classificação de células em aspirado de medula óssea de cães (Penny, 1974; Jain, 1986; Harvey, 2001)

1 - Maturação de eritrócitos

1.1 - Proeritroblasto (rubriblasto, pronormoblasto): Célula arredondada, com aproximadamente 18 μm de diâmetro apresentando margem estreita de citoplasma basófilo. O núcleo ocupa a maior parte da célula, em geral de localização central, mas pode ser excêntrico com cromatina frouxa. Pode haver uma área perinuclear clara. Nucléolos estão presentes.

1.2 - Eritroblasto basófilo (rubricito basófilo, normoblasto): A célula é menor que o proeritroblasto possui cerca de 15 μm . Conserva margem estreita de citoplasma basófilo. A cromatina nuclear é condensada e separada através de listras claras dando a aparência de “roda de carroça”. Nucléolos não estão presentes.

1.3 - Eritroblasto policromático prematuro (rubricito policromático, normoblasto): Menor que o eritroblasto basófilo, porém com tamanho variado (12 μm). Possui núcleo redondo, sem nucléolo e citoplasma abundante. A síntese de hemoglobina está iniciando e esta produz uma mudança na coloração do citoplasma para azul claro ou cinza. Condensação de cromatina nuclear continua e a aparência é de gotas escuras separadas por listras claras.

1.4 - Eritroblasto ortocromático (rubricito ortocromático, normocrômico): Tem cerca de 10 μm de diâmetro. O núcleo permanece viável com cromatina bastante condensada, às vezes localizado no canto da célula para posterior extrusão. O citoplasma tem coloração similar ao eritrócito maduro.

1.5 - Reticulócito: Possui diâmetro um pouco maior do que o da hemácia (8 μm) e não tem núcleo, sendo formado por citoplasma acidófilo, no qual se pode ver um reticulado basófilo após a coloração pelo azul-de-cresil-brilhante. Estão presentes no sangue em torno de 1 a 1,5% do total das hemácias e correspondem a células recém-lançadas na circulação.

1.6 - Eritrócito: Célula definitiva com cerca de 7 μm de diâmetro e a forma de disco bicôncavo, possui borda mais corada e o centro bem mais claro. À medida que circula, perde porções da membrana citoplasmática, adquirindo a forma de esfera (esferócito).

2 - Maturação de granulócitos

2.1 - Mieloblasto: Célula grande com aproximadamente 20 µm de diâmetro, arredondada a irregular no formato. O núcleo é grande, violeta avermelhado com cromatina finamente pontilhada contendo um ou mais nucléolos. O citoplasma é azul (basofílico), mas geralmente mais claro na coloração que o proeritroblasto. O citoplasma de um típico mieloblasto não contém grânulos, mas menos que 15 grânulos avermelhados podem estar presentes em um mieloblasto tardio.

2.2 - Promielócito (progranulócito): Tamanho similar ao mieloblasto com citoplasma mais abundante. A cromatina nuclear é um pouco mais densa. Nucléolos estão presentes em menor número ou ausentes. O citoplasma é menos basofílico e comumente apresenta granulações primárias grosseiras e pode apresentar granulações secundárias ou específicas.

2.3 - Mielócito neutrófilo: Menor que o promielócito (18 µm), com início de condensação da cromatina nuclear, nucléolos não são visíveis. O citoplasma é azul claro (acidófilo) e contém granulações específicas. Esses grânulos, quando, adequadamente corados são cinza e rosa pálido.

- **Mielócito eosinófilo:** Esta célula é geralmente maior que o mielócito neutrófilo. O citoplasma é mais basofílico e os grânulos são laranja avermelhados.

- **Mielócito basófilo:** Não é uma célula comum nos filmes de medula óssea. Os grânulos são metacromáticos ou violeta avermelhados.

2.4 - Metamielócito neutrófilo, eosinófilo e basófilo: O núcleo é denteado e assume o formato de rim, a cromatina é mais condensada, sem nucléolos. Esta célula não é mais capaz de se dividir. O citoplasma pode conservar uma basofilia desprezível no neutrófilo, mas as outras duas formas conservam um citoplasma azulado como característica de célula madura da série. Os grânulos específicos identificam a célula como neutrofílica, eosinofílica ou basofílica.

2.5 - Neutrófilo bastonete: O núcleo varia a conformação do espaço dentro do citoplasma. Formato de ferradura ou “S” são comuns. A membrana nuclear é plana. Irregularidade de membrana nuclear ou início de denteação indica que a maturação foi alcançada, requerendo classificação como um segmentado e não bastonete. Granulação neutrofílica é fraca e pouco perceptível ao microscópio óptico.

2.6 - Neutrófilo segmentado (leucócito polimorfonuclear): O núcleo pode ser monolobulado, mas a membrana nuclear é irregular, vários lobos são separados através de filamentos.

2.7 - Eosinófilo: O citoplasma contém grânulos eosinofílicos que variam na intensidade de coloração avermelhada entre as espécies. Os grânulos variam no tamanho, formato e número entre as espécies.

2.8 - Basófilo: O citoplasma é basofílico com variação no número de grânulos metacromáticos, dependendo da espécie. Os grânulos são arredondados e cinza pálido ou rosa pálido no gato, embora alguns basófilos possam preservar poucos grânulos pequenos e de coloração mais escura.

3 - Maturação do megacariócito

3.1 - Megacarioblasto: A primeira célula identificável desta série é maior que as outras células blásticas da medula óssea. Possui um a quatro núcleos distintos avermelhados. O citoplasma é pequeno e resulta em coloração azul escuro. Pequenas vesículas são frequentemente encontradas na superfície da célula.

3.2 - Promegacariócito: A maturação leva à multiplicação dos núcleos através de divisão mitótica sem a divisão do citoplasma (endomitose). O número de núcleos pode ser oito ou mais. Nas maiores células, os núcleos são comumente fundidos em uma massa solitária irregular. O citoplasma cora de azul médio a escuro e é limitado relativamente em uma borda estreita ao redor da massa nuclear.

3.3 - Megacariócito: O citoplasma é azul pálido e apresenta grânulos azurófilos rosa pálido. O citoplasma é maior que o promegacariócito. A formação de grânulos começa na zona perinuclear e gradualmente se entende para periferia da célula. O tamanho celular é variável e depende do número de divisões nucleares. Em filmes de medula óssea alguns megacariócitos podem apresentar projeções tipo pseudópodes e uma massa nuclear sem citoplasma, ou citoplasma sem núcleo pode ser encontrado.

3.4 - Plaquetas (trombócitos): Plaquetas são fragmentos citoplasmáticos de megacariócitos, variando em tamanho e formato e contêm grânulos avermelhados em um campo azul claro. No sangue, estas frequentemente formam pequenos grupos.

4 - Outras células

4.1 - Osteoclasto: Células grandes, irregulares no formato e apresentando múltiplos núcleos ovais distintamente separados em um citoplasma rosa-pálido granular. Essas células não devem ser confundidas com megacariócitos.

4.2 - Linfócitos: Originam-se na medula óssea a partir dos linfoblastos e prolinfócitos, e possuem 7-10 µm de diâmetro. O núcleo é muito grande em relação ao tamanho da célula. Não são observados nucléolos nem granulações citoplasmáticas.

4.3 - Monócitos: Originam-se na medula óssea a partir dos monoblastos e promonócitos, possuem cerca de 20 µm, seu núcleo é irregular com cromatina delicada, chanfraduras marcadas e citoplasma abundante, levemente basófilo, com contorno irregular e podem ser vistos pequenos vacúolos.

4.4 - Macrófagos: Possuem morfologia ainda mais variável do que a do monócito, tem tamanho maior e são mais ativos que os monócitos dos quais derivam. Os núcleos são grandes, vesiculosos, não são vistos nucléolos e o citoplasma é rico em granulações, restos celulares, vacúolos e material fagocitado de natureza diversa.

4.5 - Plasmócitos: Originam-se na medula óssea a partir dos plasmoblastos e proplasmócitos. Células de formato irregular, mas geralmente arredondadas, com uma grande quantidade de citoplasma azul claro e núcleo arredondado de localização excêntrica. O núcleo é parecido com o núcleo do eritroblasto, mas com maior contraste entre a cromatina. Uma área pálida de citoplasma pode estar presente próximo ao núcleo.

4.6 - Núcleos de células reticuloendoteliais: Filmes de material de medula óssea contêm estruturas arredondadas e coradas de rosa-pálido apresentando um ou mais nucléolos. Estas são classificadas como núcleos livres de células reticuloendoteliais.

4.7 - Células sem classificação: Essas células podem estar presentes em medula óssea normal que não encaixa em nenhuma descrição dos muitos estágios de células hematopoéticas submetidas à maturação.

4.8 - Células degeneradas: Células fragmentadas, núcleos picnóticos ou estruturas irregulares arredondadas, rosa pálido sem nucléolos ou uma estrutura em rede rosa-pálido, comumente denominada de “célula em cesta”, são células degeneradas. Estas estão incluídas na contagem celular diferencial de medula óssea.