

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**RESPOSTA IMUNE NA MEDULA ÓSSEA E PERFIL  
HEMATOLÓGICO DE CÃES COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Claudia Momo**

Médica Veterinária

**2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTA IMUNE NA MEDULA ÓSSEA E PERFIL  
HEMATOLÓGICO DE CÃES COM  
LEISHMANIOSE VISCERAL**

**Claudia Momo**

**Orientadora: Profa. Dra. Rosemeri Oliveira Vasconcelos**

**Coorientadora: Profa. Dra. Suely Mogami Bomfim**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Animal)

**2013**

M733r Momo, C.  
Resposta imune e perfil hematológico em cães com leishmaniose visceral /  
Claudia Momo. -- Jaboticabal, 2013  
**iv, 76 p. ; il. ; 28 cm**

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Rosemeri de Oliveira Vasconcelos

Banca examinadora: Bárbara Cristina Mazzucatto. Hélio José Montassier,  
Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Maria Cecília Rui Luvizotto

#### Bibliografia

1. Relação M:E. 2. Hematopoiese. 3. Citocinas. 4. Mieloide. 5. Eritroide.  
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.993.161:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Claudia Momo – nascida em 29 de julho de 1975, em Lençóis Paulista – SP, filha de Edemir Renato Momo e Maria Helena Gasparini Momo, é Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, em dezembro de 2001. Participou do Programa de Aprimoramento Profissional do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, desta Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP/Jaboticabal, na área de Patologia Veterinária, durante os anos de 2003 e 2004. Em 2007 defendeu a dissertação intitulada “Aspectos anatomopatológicos de perdizes (*Rhynchotus rufescens*) criadas em cativeiro”, sob orientação da Profa. Dra. Karin Werther, na área de Patologia Animal, do curso de pós-graduação da FCAV/UNESP/Jaboticabal. Entre 2006 e 2012 atuou como docente na Universidade de Franca (UNIFRAN), ministrando aulas nas disciplinas de Patologia Geral, Patologia Especial e Animais Silvestres, além de ser responsável pelo Setor de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da UNIFRAN. Entre 2006 e 2009 foi docente na Universidade Camilo Castelo Branco (UNICASTELO – Fernandópolis/SP), ministrando aulas nas disciplinas de Patologia Geral, Patologia Especial, Citologia Geral, Histologia Veterinária, Ornitopatologia e Animais Silvestres. Ingressou no curso de doutorado em Medicina Veterinária, na Área de Patologia Animal, em março de 2010, sob orientação da Profa. Dra. Rosemeri Oliveira Vasconcelos.

“O sacrifício é a melhor coisa que pode acontecer a uma pessoa,  
porque a faz lutar para conseguir o que quer,  
e dar valor àquilo que conseguiu”

Profa. Dominguita Lühers Graça

À minha mãe Maria Helena, e meu pai Renato,

por sua bondade e generosidade infinitas...

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Renato e Maria Helena pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida. Não imagino quantos sonhos deixaram de realizar, para que eu pudesse realizar os meus... Agradeço por serem o grande exemplo de honestidade, bondade e generosidade.

Às minhas irmãs, Leila Momo e Cristiane Momo de Andrade e sobrinhos, Emily Momo de Oliveira e Caio Momo de Andrade, por me darem a oportunidade sem igual de ser tia!!

Aos meus avós, Zulmira Paccola Gasparini (*in memoriam*), Evaristo Momo (*in memoriam*), Abílio Gasparini (*in memoriam*) e Anunciata Purgano Momo, por tudo o que me ensinaram e por tudo o que sempre fizeram por mim, cada um à sua maneira...

À minha orientadora, profa. Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, por ser um exemplo de pessoa correta, de professora e profissional dedicada. Agradeço imensamente pelos conhecimentos compartilhados, pela confiança depositada em mim e por toda a dedicação à minha formação profissional e pessoal, desde a graduação.

À minha coorientadora, profa. Dra. Suely Regina Mogami Bomfim, pelos conhecimentos compartilhados com tamanha generosidade.

Aos professores Dra. Gisele Fabrino Machado, Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Dr. Marcos Rogério André, Dr. Jair Rodini Engrácia Filho, pelas valiosas contribuições durante a qualificação deste trabalho.

Aos funcionários do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, pela gentileza em cederem os animais para esse estudo.

Aos pós-graduandos Luis Gustavo Narciso e Renata Furlan, pela grande ajuda no processamento de parte do material utilizado neste trabalho.

À prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto, exemplo de trabalho e dedicação ao ensino.  
Por ser uma amiga sempre presente, pelos bons conselhos e incentivo constante!

Aos grandes amigos que fiz em Jaboticabal, Thalita Regina Petrillo, Juliana Evangelista Bezerril, Ana Paula Prudente Jacintho, André Escobar, Paulo Fernandes Marcusso, Tiago Ibirapina, Ronny Barbosa, Gustavo Claudiano e prof. Carlos Valadão.

À minha grande amiga Tatiana Malagoli Taguchi, por estar sempre presente nos momentos importantes. Aos amigos Josiane Maria Starling Duarte, Gabriel Fernando Müller Santos e Jaqueline Cristina de Souza, pela amizade sincera.

Aos amigos Mario da Silva Marques (Marão), Edivaldo Antônio de Souza, Márcio Donizete Alves Ribeiro (Marcinho), por serem pessoas absolutamente incríveis e por me permitirem fazer parte de suas vidas!

Aos amigos do Laboratório, Thais Larissa Castanheira, Mayara Rosolen e Eduardo Garrido, pelas boas risadas e os essenciais momentos de descontração. Agradeço imensamente ao Eduardo, pela enorme ajuda na análise dos dados.

Aos funcionários do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV, especialmente os amigos Narciso Batista Tel, Edigard Homem, Moema Ogasawara, Maria Cristina dos Santos, Maria de Fátima Polia, Maria Inês Yamasaki de Campos pelos vários anos de convivência e amizade.

À técnica do Laboratório de Histopatologia da FCAV, Francisca de Assis Ardisson, pela confecção das lâminas utilizadas neste trabalho e pela amizade.

A todos os meus alunos, que me ensinaram tanto! Agradeço por me mostrarem que não preciso viver “carregando pedras nos bolsos”...

Ao Programa de Pós Graduação da FCAV, pela oportunidade concedida.

## SUMÁRIO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A leishmaniose visceral.....	3
2.2 A resposta imune na medula óssea.....	6
2.3 Interação entre o parasito e as células do sistema imune.....	13
3. OBJETIVOS.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Animais.....	22
4.2 Perfil hematológico do sangue periférico.....	23
4.3 Análise citológica da medula óssea.....	24
4.4 Análise histopatológica da medula óssea.....	24
4.5 Análise imuno-histoquímica da medula óssea.....	25
4.6 Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS.....	29
5.1 Análise macroscópica da medula óssea.....	29
5.2 Análise citológica da medula óssea.....	29
5.3 Análise histopatológica da medula óssea.....	32
5.4 Análise imuno-histoquímica da medula óssea.....	33
5.5 Análise do hemograma.....	40
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÕES.....	57
8. INFERÊNCIAS.....	58
9. REFERÊNCIAS.....	59
10. ANEXOS.....	73
Anexo A- Hemograma dos animais avaliados.....	74



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 027229/12 do trabalho de pesquisa intitulado "**Imunodeteção de citocinas na medula óssea de cães com leishmaniose visceral**", sob a responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rosemeri de Oliveira Vasconcelos está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2012.

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2012.

**Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi**  
Coordenador - CEUA

## RESPOSTA IMUNE NA MEDULA ÓSSEA E PERFIL HEMATOLÓGICO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

**RESUMO-** A avaliação da medula óssea e das células do sangue em cães com leishmaniose visceral (LV) pode proporcionar valiosas informações, tanto quantitativas quanto qualitativas, relativas à hematopoiese. Os objetivos deste estudo foram avaliar a medula óssea de cães com LV, por meio de exame citológico, histopatológico e imuno-histoquímico (IHC), avaliando-se a carga parasitária, a quantidade de linfócitos e macrófagos, além de células expressando MHC de classe II, IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , bem como sua repercussão nas células do sangue. Para tanto, foram utilizados 60 cães, sendo 54 infectados e seis animais não infectados. Os cães infectados apresentaram anemia normocítica normocrômica, porém sem alterações na linhagem eritroide da medula óssea, além de displasia granulocítica, megacariocítica e granulomas na medula óssea. A linfocitose observada na medula óssea se refletiu no sangue. No exame citológico, observou-se grande infiltração de macrófagos, linfócitos e plasmócitos nos animais infectados. Quanto à IHC, os cães infectados apresentaram grande quantidade de células imunomarcadas para TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e macrófagos.

Palavras-chave: eritroide, mieloide, relação M:E, citocinas, hematopoiese

## IMMUNE RESPONSE IN BONE MARROW AND PROFILE HEMATOLOGIC DOGS WITH VISCERAL LEISHMANIASIS

**ABSTRACT-** The evaluation of the bone marrow and blood cells in dogs with visceral leishmaniasis (VL) can provide valuable information, both quantitative and qualitative, on the hematopoiesis. The objectives of this study were to evaluate the bone marrow of dogs with VL through cytological, histopathological and immunohistochemical (IHC) examination, evaluating the parasitic load, the amount of lymphocytes and macrophages and by cells expressing MHC class II, IFN- $\gamma$ , IL-10, TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ , as well as its effect on blood cells. To this end, 60 dogs, 54 infected and six uninfected animals were used. Infected dogs showed normochromic normocytic anemia, but without any changes in the erythroid lineage bone marrow, and dysplasia granulocytic, megakaryocytic and granulomas in the bone marrow. The lymphocytosis in the bone marrow was reflected in the blood. On cytological examination, there was extensive infiltration of macrophages, lymphocytes and plasma cells in infected animals. As for IHC, infected dogs showed large amount of immunostained cells to TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, IFN- $\gamma$  and macrophages.

Keywords: erythroid, myeloid, M: E ratio, cytokines, hematopoiesis.

## 1. INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Leishmania* sp. infectam fagócitos de mamíferos, incluindo o homem e o cão. O cão é o maior reservatório da leishmaniose visceral (LV) nas Américas, a mais relevante dentre as doenças emergentes no mundo. A doença apresenta característica endêmica em 88 países, sendo que o Brasil é responsável por 90% das notificações de LV que ocorrem no continente americano.

A LV é transmitida pela picada do inseto vetor do gênero *Lutzomyia* que, ao sugar o sangue de mamíferos infectados, ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. Ao sugar o sangue de outro animal, o vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas do parasita, que passaram a forma infectante no intestino do mosquito. Estas formas são fagocitadas por macrófagos na pele do hospedeiro vertebrado, que transportam os parasitos para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço, pele e medula óssea.

A medula óssea é considerada um dos principais sítios de localização do protozoário. Sua infecção pode interferir na capacidade regenerativa da maioria dos tecidos linfoides periféricos que dependem das células progenitoras pluripotentes da medula óssea. O parasito consegue modular a resposta inflamatória, estimulando ou inibindo a produção de citocinas e proliferação de celular, interferindo assim com a hematopoiese. Isso se reflete em alterações na celularidade do sangue, provocando anemia, leucopenia e trombocitopenia.

Considerando que os cães com diagnóstico positivo para LV são submetidos à eutanásia, torna-se difícil avaliar a evolução da doença. Trabalhos recentes descrevem um padrão de resposta compartimentalizada para LV canina, mostrando

que alguns órgãos são susceptíveis à proliferação do parasito, como o baço e outros são mais resistentes, como o fígado. Entender a dinâmica das citocinas presentes na medula óssea dos cães com leishmaniose visceral trará importantes contribuições na compreensão da complexa patogenia da doença no cão.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A leishmaniose visceral

As leishmanioses são um grupo de enfermidades parasitárias de distribuição mundial, transmitidas ao homem e aos animais por meio da picada de espécies de flebótomos infectados por protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose visceral, também conhecida como Calazar, é a forma mais severa da doença, muitas vezes fatal (LASHLEY; DURHAM, 2007; WHO, 2007).

A leishmaniose visceral (LV) é uma das zoonoses mais importantes no mundo, provocando severa doença em cães (BRASIL, 2006). Pode também acometer humanos, felinos, equídeos (MÜLLER et al., 2009; GINN et al., 2007; MARTIN-SANCHEZ et al., 2007) e outros mamíferos, tais como o gambá (SANTIAGO et al., 2007), sendo considerada uma das doenças parasitárias emergentes mais importantes (TESH, 2002). Nos últimos dez anos, os métodos de diagnóstico da doença evoluíram consideravelmente, ao mesmo tempo em que houve um aumento significativo da notificação dos casos (ANTINORI et al., 2012).

O agente etiológico é um protozoário da família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, que apresenta uma forma flagelada (promastigota) encontrada no sistema digestório do vetor e outra forma, amastigota (com flagelo interiorizado), encontrada nos tecidos dos vertebrados (BRASIL, 2006).

As espécies que provocam a LV são os protozoários do complexo *Leishmania donovani*, composto por *Leishmania (Leishmania) donovani*, *Leishmania*

(*Leishmania*) *infantum* e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, sendo esta última a responsável pela doença no continente americano (BRASIL, 2006). Os autores Dantas-Torres (2006) e Shaw (2006) propuseram a utilização do nome *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi*, considerando que a *L. infantum* e a *L. chagasi* compreendem a mesma espécie.

Os principais vetores da doença no Brasil são insetos do gênero *Lutzomyia*, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2006). Outros vetores, como o carrapato do complexo *Rhipicephalus sanguineus*, e a pulga *Ctenocephalides felis*, também foram considerados possíveis transmissores, porém seu papel na epidemiologia da doença ainda não foi comprovado (DANTAS-TORRES, 2011; FERREIRA et al., 2009; GINN et al., 2007).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. Ao sugar o sangue de outro animal, o vetor inocula promastigotas metacíclicas. Estes são fagocitados por macrófagos, que transportam os parasitos para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço, pele e medula óssea. A proliferação histiocítica nesses órgãos produz seu aumento de volume, além de atrofia do tecido normal (FALCOW, 2004; BRASIL, 2006).

Em cães, a medula óssea, o baço e a pele são os tecidos que apresentam maior densidade do parasito (MOREIRA et al., 2013; REIS et al., 2009; SARIDOMICHELAKIS, 2005), além dos linfonodos (BOGDAN e RÖLLINGHOFF, 1999) e fígado (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010, GIUNCHETTI et al., 2008). Apesar de Manzillo et al. (2006) considerarem a medula óssea como um dos

principais sítios de localização do protozoário, Toplu e Aydogan (2011) referem que a *Leishmania* sp nem sempre é encontrada no exame citológico ou histopatológico desse órgão, indicando a técnica de imuno-histoquímica para identificá-lo.

Do exame da medula óssea, provêm informações quantitativas e qualitativas a respeito da morfologia celular de cada linhagem. Seu exame tem uma importância significativa no diagnóstico e tratamento de doenças que provocam alterações no sangue circulante. A avaliação da morfologia do aspirado de medula óssea e de sua biopsia tem sido suplementadas recentemente com técnicas mais sofisticadas, como imuno-histoquímica, análise citogenética, citometria de fluxo e ensaios moleculares (RASKIN e MESSICK, 2012; VALDEZ, et al., 2012; RILEY et al., 2009; ELMORE, 2006).

Os cães são os mais importantes reservatórios domésticos de *Leishmania* sp, incriminados como principal fonte de infecção para o vetor (GAVGANI et al., 2002). Estes animais podem ser assintomáticos ou apresentarem uma variedade de sinais clínicos, que se caracterizam por ulcerações e descamação cutânea, alopecia, emagrecimento progressivo, onicogribose, hepato e esplenomegalia e alterações hematológicas, como anemia, leucopenia e trombocitopenia (FEITOSA et al., 2000).

Manzillo et al. (2006) referem que a severidade dos sinais clínicos observados em cães com LV depende da resposta imunológica do hospedeiro e do estágio da doença, e incluem ainda como sinais clínicos a linfadenomegalia, lesões oculares e sinais de falência renal. O espectro de sinais clínico-patológicos parece ser causado pela intrincada dinâmica da resposta imune celular (FALCOW, 2004). Os animais considerados susceptíveis à infecção são os que apresentam maior densidade de

parasitos nos órgãos e, em consequência, lesões mais graves (GINN, MENSETT, RAKICH, 2007).

Tal como o *Trypanosoma cruzi*, a *Leishmania* sp tem a capacidade de escapar do sistema imune, pois apresenta resistência às hidrolases ácidas dos lisossomos (VIRELLA, 2001). Como resultado de sua persistência, os parasitos estimulam uma inflamação crônica, caracterizada inicialmente pela presença de granulócitos, seguida pela proliferação de macrófagos, linfócitos e células *natural killer* (NK) que, em conjunto formam granulomas (VALLI, 2007a; ORAZI et al., 2006; VALLI, 2002; VIRELLA; BIERER, 2001).

## **2.2 A resposta imune na medula óssea**

A capacidade regenerativa da maioria dos tecidos linfoides periféricos depende das células progenitoras pluripotentes da medula óssea (VALDEZ et al., 2012; ELMORE, 2006). Precusores e células maduras de linfócitos B são produzidos neste órgão, depois quando atingem o estágio maduro, migram para tecidos linfoides secundários, como linfonodos, baço e tecido linfoide associado às mucosas (REGH et al., 2012).

A sobrevivência, auto-renovação, proliferação e diferenciação das células-tronco na medula óssea requerem um microambiente que contenha citocinas hematopoiéticas apropriadas, provenientes das células do estroma, da matriz extracelular, de macrófagos e outras células. Portanto, uma mudança no perfil de citocinas presentes na medula óssea pode interferir com a produção celular local, provocando displasia e refletindo diretamente nos demais órgãos linfoides (VALDEZ

et al., 2012; CAR, 2010; VALLI, 2007b; MANZILLO et al., 2006, VALLI, 2002; LINCH, 1998).

De acordo com Valli (2007b), dentre as citocinas responsáveis por uma adequada produção de células hematopoiéticas, estão o fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas 1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-11 e IL-12.

Car (2010) e Elmore (2006) recomendam que a medula óssea seja coletada para biopsia ou exame citológico, de locais como o esterno ou o fêmur. Quando utilizado o método citológico, o material deve ser corado por técnicas do tipo Romanowsky, para se obter maior qualidade dos detalhes citológicos relacionados à morfologia celular e seu grau de maturação.

O protozoário *Leishmania* sp nem sempre é encontrado no exame citológico ou histopatológico da medula óssea (TOPLU; AYDOGAN, 2011), sendo a sensibilidade destes exames ainda controversa, e relativamente menor em animais assintomáticos do que nos sintomáticos (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005). Reis et al. (2001) e Reis et al. (2006a) referem um alto parasitismo na medula óssea de animais sintomáticos e baixo parasitismo em animais assintomáticos.

Para se traçar um perfil celular da medula óssea, deve-se realizar a contagem diferencial de células nucleadas, com o objetivo de se determinar qual linhagem celular está alterada. Para a série mieloide, as fases proliferativas são os mieloblastos, os promielócitos e os mielócitos; por outro lado, as células em maturação são os metamielócitos e bastonetes, que são diferenciados em neutrófilos segmentados, basófilos e eosinófilos, que fazem parte do compartimento de estoque. Para a série eritroide, as células do compartimento proliferativo são os

proeritroblastos, os eritroblastos basofílicos e eritroblastos policromáticos, enquanto que os eritroblastos ortocromáticos e os reticulócitos pertencem à fase de maturação (ELMORE, 2006).

Neste contexto, a determinação da proporção mielóide:eritroide (M:E) quantifica a relação entre as duas linhagens celulares. A relação M:E é uma importante medida semi-quantitativa do desenvolvimento de células vermelhas e brancas. É obtida dividindo-se a quantidade de células da série granulocítica pela quantidade de células nucleadas da linhagem eritroide (RASKIN e MESSICK, 2012; VALDEZ et al., 2012; CAR, 2010; ELMORE, 2006).

A relação M:E pode ser considerada um fator indicativo da eficácia da hematopoiese. Em cães normais, a relação M:E varia de 0,75 a 2,5 (WEISS; TVEDTEN, 2004). Na medula óssea normal, os neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos, representam, coletivamente, de 5% a 10% do total de células mielomonocíticas (RASKIN; MESSICK, 2012).

Os estágios finais de maturação da série mielóide (bastonetes, neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e eritroide (eritroblastos ortocromáticos e reticulócitos) devem representar entre 75 a 85% da celularidade, em relação aos estágios imaturos. Linfócitos, plasmócitos e macrófagos estão comumente presentes em baixo número, espalhados por toda a medula e coletivamente perfazem menos do que 10% de todas as células nucleadas (RASKIN; MESSICK, 2012; VALLI, 2007a).

Uma relação M:E aumentada pode estar associada à hiperplasia mielóide, resultante do aumento das linhagens de granulócitos, enquanto que uma redução da razão M:E é atribuída à hiperplasia eritroide, resultante do aumento da série eritroide (REIS et al., 2006b). Os mesmos autores descreveram aumento na relação

M:E, indicativo de hiperplasia mieloide, provavelmente relacionada a um aumento dos precursores de neutrófilos. Já os eosinófilos não seriam responsáveis por esse aumento da relação M:E (ABREU et al., 2011).

Segundo Weiss (2010), a presença da *Leishmania* sp na medula óssea pode provocar um quadro conhecido como dismielopoiese secundária, caracterizada pela inefetiva produção de células sanguíneas, com displasia em uma ou mais linhagens na medula óssea, refletindo-se em citopenia e displasia das células do sangue periférico. A dismielopoiese é secundária à exposição da medula óssea a infecções, drogas ou toxinas. Essa alteração já foi classificada síndrome mielodisplásica (SMD) (VALLI, 2007b; WEISS; SMITH 2000). No entanto, Weiss (2005) refere que a SMD é uma mutação adquirida nas células tronco da medula óssea.

A dismielopoiese é caracterizada por anemia e/ou leucopenia e trombocitopenia, associadas com únicas ou múltiplas mudanças displásicas na medula óssea. (VALLI, 2007a; VALLI, 2007b; WEISS, 2005; WEISS; AIRD, 2001). A megacariopoiese pode estar aumentada, normal ou diminuída e é comum a presença de megacariócitos predominantemente displásicos ou de tamanho pequeno e é denominada dismegacariopoiese (ORAZI et al., 2006).

O diagnóstico da dismielopoiese requer avaliação morfológica do sangue periférico, punção biopsia aspirativa (PBA) e biopsia da medula óssea, bem como adequada informação clínica do paciente. A medula óssea pode estar hipercelular na maioria dos casos, mas também pode se apresentar normocelular e até hipocelular (ORAZI et al., 2006), existindo evidência morfológica de displasia em uma ou mais linhas celulares (RASKIN, 1996).

A infecção da medula óssea pela *Leishmania* sp pode ocasionar uma disfunção na produção de eritrócitos, granulócitos, monócitos, linfócitos e plaquetas. Ainda há pouca informação na literatura sobre as alterações que ocorrem na medula óssea de cães naturalmente infectados pelos protozoários do gênero *Leishmania* (ABREU et al., 2011). Manzillo et al. (2006) referem que a displasia da medula óssea é provocada pela grande concentração de citocinas produzidas pela infiltração de macrófagos. Quanto à série eritroide, estes mesmos autores descreveram hipoplasia e displasia eritróide, eritrofagocitose, emperipolesi de megacariócitos e mitoses atípicas como achados frequentes em cães sintomáticos portadores de LV. Alterações estas que se refletem clinicamente em anemia.

Abreu et al. (2011) demonstraram que a hipoplasia eritroide em cães sintomáticos com LV foi ocasionada pela diminuição da quantidade de eritroblastos ortocromáticos.

Cotterell et al. (2000a) descreveram hiperplasia mieloide, observada em toda a série granulocítica, mas principalmente em mieloblastos de cães oligossintomáticos. Um aumento da quantidade de mielócitos neutrofílicos foi observado em cães infectados com *L. chagasi*, e uma alta quantidade de metamielócitos neutrofílicos foi encontrada nos cães infectados. Esse fenômeno pode estar relacionado à proliferação de precursores de neutrófilos, eosinófilos e basófilos, necessários para atender à alta demanda de granulócitos. De acordo com a evolução clínica da doença, a proliferação de neutrófilos é explicada como uma tentativa do organismo de controlar a densidade de parasitos na medula óssea, já que essas células tem papel importante no início da infecção, destruindo formas promastigotas, por meio de mecanismos oxidativos (COTTERELL et al., 2000a).

Kopterides et al. (2003) descreveram hipogranulação dos precursores granulocíticos e elevada quantidade de megacariócitos com núcleo desorganizado em um caso humano de leishmaniose visceral. A displasia megacariocítica (núcleos hiperlobulados ou hipolobulados, fragmentados e com cromatina desorganizada), pode explicar a trombocitopenia (MANZILLO, 2006). É possível que a trombocitopenia em cães com displasia megacariocítica possa ser causada pela baixa produção ou aumento da destruição de plaquetas no baço (SARIDOMICHELAKIS, 2005).

Pinelli et al. (1994) realizaram estudo no qual constataram que os cães com dismegacariopoiiose possuíam sinais clínicos de leishmaniose e títulos altos de anticorpos circulantes (superiores a 1:160). Acredita-se que essa condição esteja associada à resposta imune predominantemente do tipo T helper 2 (Th2), com aumento da produção de IL-4 e IL-10. Em contraste, cães sem sinais clínicos usualmente apresentaram resposta imune do tipo T helper 1 (Th1), caracterizada por altos níveis de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-2. Em relação aos leucócitos dos cães sintomáticos, observaram-se linfopenia, eosinopenia e monocitopenia (REIS et al., 2006a).

No exame histopatológico, Toplu e Aydogan (2011) observaram o parasito no citoplasma de macrófagos em 45,4% dos cortes de medula óssea corados com Hematoxilina e Eosina, contra 63,6% nos linfonodos e 50% no baço. Quando realizada a técnica de imuno-histoquímica (IHC), houve marcação para o protozoário na medula óssea em 90,9% dos casos, enquanto que linfonodos e baço apresentaram 100% de marcação. O parasito nem sempre é encontrado no exame citológico ou histopatológico da medula óssea, portanto torna-se necessária a

utilização de outros métodos para confirmar o diagnóstico, tais como a imunohistoquímica.

As alterações que ocorrem na medula óssea se refletem diretamente no sangue (BRANDONISIO et al., 1990). Desta forma, a comparação das mudanças celulares observadas na medula óssea deve, sempre que possível, ser feita concomitantemente com a contagem de células sanguíneas (CAR, 2010; ELMORE, 2006; GRINDEM et al., 2002), já que a liberação de citocinas na medula óssea durante a infecção está diretamente envolvida na patogenia das alterações hematológicas (KOPTERIDES et al., 2003), as quais possuem importância no prognóstico da doença (IKEDA et al., 2002).

A anemia apresentada pelos animais com LV pode ser ocasionada por diversos fatores, tais como diminuição da eritropoiese, displasia eritroide, hemólise e perda de sangue por epistaxe (BRANDONISIO et al., 1990). Essas alterações podem provocar mobilização das células progenitoras eritroides para o sangue periférico (COTTERELL et al., 2000a).

A hiperplasia eritroide, mieloide e de megacariócitos é uma resposta esperada da medula óssea pela destruição destas células maduras na circulação periférica, principalmente de animais sintomáticos. Se a medula óssea consegue suprir esta demanda, verifica-se no sangue periférico aumento das formas eritroides imaturas, com reticulocitose e aumento do hematócrito (RASKIN e MESSICK, 2012).

Por outro lado, Freitas et al (2012) e Coura-Vital et al. (2011) referiram diminuição de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina no grupo sintomático, quando comparado ao grupo controle. Já Medeiros et al. (2008) descreveram diminuição apenas de eritrócitos e hematócrito, mas não de hemoglobina nos cães

sintomáticos, e Silva (2007) descreve apenas queda na quantidade de hemácias nos animais sintomáticos.

Diversos autores, incluindo Reis et al. (2006a) e Ikeda et al. (2002) referem, em cães sintomáticos, anemia normocítica e normocrômica, com significativa diminuição do número de hemácias, hemoglobina e do hematócrito, em relação aos animais controle, aos assintomáticos e aos oligossintomáticos. Esse tipo de anemia foi explicado por Abreu et al. (2011), como consequência da diminuição de proeritroblastos e eritroblastos policromáticos. Anisocitose pode ser encontrada nas células do sangue, em função da eritropoiese inefetiva (VALLI, 2007a).

Com relação aos leucócitos, Coura-Vital et al. (2011) descreveram eosinofilia, contrariamente a Reis et al. (2006a), que descreveram eosinopenia. Monocitopenia foi descrita por Coura-Vital et al. (2011) e Reis et al. (2006a). Ainda relatou-se aumento de proteínas totais e trombocitopenia observada em 50% dos animais sintomáticos (FREITAS et al., 2012, REIS et al., 2006a). Reis et al. (2006a) mostraram uma diminuição significativa nos valores absolutos de monócitos do grupo sintomático em relação ao grupo controle.

### **2.3 Interação entre os parasitos do gênero *Leishmania* sp e as células do sistema imune**

Infecções naturais e experimentais por *Leishmania* sp tem sido associadas à diminuição da imunidade celular contra esse protozoário. A diminuição na quantidade de linfócitos no sangue periférico sugere que o agente infeccioso possa

induzir uma disfunção imune (GINN, MENSETT, RAKICH, 2007; BARBIÉRI, 2006; PINELLI et al., 1994).

De acordo com relatos de Gavvani et al. (2002), a leishmaniose visceral está associada a uma anergia de linfócitos T, além da indução de uma resposta humoral não protetora, que permite a disseminação e multiplicação do agente em diferentes tecidos. Durante a infecção, ocorre uma intrincada estimulação e/ou supressão da produção de citocinas, da expressão de moléculas e da ativação de células do sistema imune, eventos estes que permitem que o parasito viva por longos períodos dentro de macrófagos. Os diversos eventos diretos e indiretos, provocados pelo protozoário em diferentes tipos celulares, ocasionam uma distorção na resposta imune normal, favorecendo a sobrevivência do parasito (OLIVIER et al., 2005).

Trinchieri (2003) afirma que a relação entre o parasito e o sistema imune do hospedeiro pode desencadear uma resposta do tipo Th1 ineficiente no controle do protozoário. Diferentemente, Ginn, Mensett e Rakich (2007) sugerem que haja predomínio de uma resposta do tipo Th2 e Barbiéri (2006) relata evidências de uma resposta mista, tanto Th1 quanto Th2.

As respostas Th1 e Th2 possuem mecanismos imunológicos opostos, proporcionando a resistência e a susceptibilidade ao parasito, respectivamente (TRINCHIERI, 2003). As células do tipo Th1 produzem citocinas como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 e IL-12, enquanto que as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 são produzidas pelas células tipo Th2. Ademais, o tipo de resposta ao parasito depende de uma série de fatores, como a genética do hospedeiro, o microambiente de citocinas e a natureza dos antígenos parasitários (BARBIÉRI, 2006; SQUIRES, 2004). Há ainda a hipótese de que o parasito libere substâncias imunossupressoras (VIRELLA; BIERER, 2001).

Squires (2004) refere que o tipo de resposta (Th1 ou Th2) pode ocorrer de acordo com o tipo predominante de citocinas no local, especialmente a IL-4 secretada por linfócitos Th2 e a IL-12, secretada por macrófagos.

Para o estabelecimento de uma resposta imune protetora, é necessário que as células da resposta imune inata (principalmente macrófagos e células dendríticas) apresentem antígenos parasitários aos linfócitos T (KAYE et al., 1994) e, para isso, é necessária a interação entre os macrófagos e os linfócitos T, via MHC (complexo principal de histocompatibilidade) presente no macrófago (TIZARD, 2009). Os macrófagos infectados podem clivar os componentes protéicos do parasito em peptídeos, que são apresentados por moléculas de MHC de classe II aos receptores presentes na membrana dos linfócitos T (PLORDE, 2004; FALCOW, 2004). Esses receptores, denominados receptores de união ao antígeno (TCR), estão vinculados a um complexo de proteínas, chamado de grupo de diferenciação 3 (CD3), responsável pela transdução do sinal de ativação do linfócito. Além disso, o TCR também está associado a um co-receptor, sendo neste caso o CD4, que se liga às moléculas de MHC de classe II presentes nas células apresentadoras de antígeno (APC). O CD4 aumenta em aproximadamente 100 vezes a transdução de sinal de ativação do linfócito T, quando se une às moléculas de MHC das células apresentadoras de antígeno (TIZARD, 2009).

No entanto, a união do TCR ao complexo de MHC não é suficiente para desencadear a ativação de linfócitos Thelper, sendo ainda necessários sinais de estimulação adicionais (sinais de coestimulação), pertencentes a três tipos: No primeiro, os ligantes, como CD40 da APC, se unem aos seus receptores no linfócito T. Segundo, os linfócitos T são estimulados por citocinas secretadas pelas APC's,

determinando o modo como o linfócito T responde ao antígeno. E finalmente, para conseguir um efeito máximo, as moléculas de adesão se unem firmemente os linfócitos T e às APC's, durante um tempo prolongado, estabelecendo uma forte comunicação entre as células (TIZARD, 2009). Portanto, a capacidade de apresentação de antígenos pelo macrófago, é potencializada pela união com os linfócitos (DIAZ et al., 2012).

Alexandre-Pires et al. (2010) avaliaram, por meio de citometria de fluxo, a quantidade de linfócitos T CD3 no sangue e medula óssea de cães sintomáticos com LV e notaram uma diminuição da quantidade dessas células no sangue periférico, porém não houve alteração significativa na medula óssea. Os linfócitos presentes no sangue e medula óssea de cães sintomáticos mostraram-se ativados. Isto mostra a importância da molécula CD3 em participar do controle das infecções latentes e sua possível função na dinâmica da leishmaniose visceral canina.

A imunomarcagem de MHC pode ser utilizada para se medir o estado de ativação celular (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010). Os estudos de Diaz et al. (2012) demonstraram, por meio de citometria de fluxo, a super-regulação de moléculas de MHC de classe II na superfície de monócitos, na presença de linfócitos, durante a infecção de cães assintomáticos por *L. infantum*. Além disso, a falta da expressão ou redução de moléculas co-estimulatórias em linfócitos e macrófagos e produção reduzida do óxido nítrico (NO) pelos macrófagos foi observada, sugerindo uma perda da função da célula T e, conseqüentemente, uma inativação da produção de NO em macrófagos que, por sua vez, favorece a sobrevivência de *Leishmania*.

O TGF- é produzido por linfócitos T e B e por macrófagos ativados (BARRAL-NETTO et al., 1992). Os autores Olivier et al. (2005) apontam o TGF- $\beta$  e a IL-10,

como responsáveis pela supressão da produção de NO pelos macrófagos. Omer et al. (2000) referem que, em pequenas quantidades, o TGF- $\beta$  possui ação pró-inflamatória e em grandes quantidades, sua ação é anti-inflamatória.

A resposta inflamatória contra a *Leishmania* sp tem início quando os parasitos são fagocitados por macrófagos, mas não são destruídos. Eles se dividem no interior dos fagolisossomos, sendo sua resistência à destruição intracelular o resultado de múltiplos mecanismos. Como exemplo de um desses mecanismos, a parede de polissacarídeos do parasito atrasa a maturação do fagossomo, prevenindo a produção de NO e inibindo muitas das respostas dos macrófagos às citocinas (NATHAN; SHILOH, 2000), (Figura 1).

Após a ligação com o macrófago, os linfócitos Th1 passam a secretar citocinas, como o interéferon gama (IFN- $\gamma$ ), que induz o macrófago a produzir TNF- $\alpha$  e NO, que podem destruir os amastigotas intracelulares (BARBIÉRI, 2006; PLORDE, 2004; FALCOW, 2004, PINELLI, 2000).

O IFN- $\gamma$  possui outras funções na defesa contra agentes patogênicos, estimulando a expressão MHC-II e o processamento antigênico (ST LOUIS et al, 1993), além de promover a ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T (SPERLING; BLUESTONE, 1996). Belosevic et al. (1989) descrevem o IFN- $\gamma$  como a citocina mais potente para a indução da atividade contra a *Leishmania* sp.

Parasitos com habilidade de comprometer a produção ou função de IFN- $\gamma$  são favorecidos, beneficiando a parasitemia e persistindo no hospedeiro. Considerando que os macrófagos possuem papel central no início da resposta contra o parasito, a infecção dessas células pode prejudicar sua habilidade de suprir citocinas

regulatórias para aumentar a produção de IFN- $\gamma$  (WOLFE et al., 1991). Pinelli et al. (1999), destacaram que, durante a infecção, os macrófagos apresentam redução da habilidade de interagirem com linfócitos T e, conseqüentemente, de induzirem a produção de IFN- $\gamma$  e conseqüente destruição do parasito. Spät et al. (2009) verificaram uma falha do hospedeiro em induzir resposta protetora por IFN- $\gamma$ .

Quinnell et al. (2001) descreveram que cães com LV, tanto sintomáticos como assintomáticos, apresentaram níveis parecidos de IFN- $\gamma$  na medula óssea. Lage et al. (2007) descreveram o mesmo achado no baço, demonstrando o predomínio da resposta do tipo Th1.

Riley et al. (2009) afirmam que o TNF- $\alpha$  é produzido por macrófagos, monócitos e linfócitos do tipo Th1, além de células endoteliais. É uma citocina multifuncional, com ação pró-inflamatória.

Além das citocinas mencionadas, a IL-2 também confere resistência à leishmaniose visceral (BARBIÉRI, 2006). Os cães apresentam uma expressão reduzida de receptores para IL-2, que pode ser interpretada como resultado de uma diminuição de células Th1 e de citocinas.

Por outro lado, enquanto o papel das citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-10, em animais sintomáticos é ainda controverso, há cada vez mais evidências para a correlação dessas citocinas com a forma progressiva da LV (BARBIÉRI, 2006). Uma alta expressão de IL-10 foi detectada em cães sintomáticos (PINELLI et al., 1999).

A IL-10 é uma citocina produzida por linfócitos Th2, que inibe a síntese de citocinas do tipo Th1 (FIORENTINO et al., 1989). De acordo com D'Andrea et al. (1993), a IL-10 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12. A IL-10 desempenha um papel fundamental na

inibição da ativação macrófaga, e contribui para o crescimento do parasito nas lesões (CARRERA, 1996).

A diferenciação de linfócitos Th0 em populações Th1 também é estimulada pela IL-12. Os maiores produtores de IL-12 durante uma infecção são as APC's (TRINCHIERI, 2003; TRINCHIERI, 1994). A IL-12 também induz a síntese de IFN- $\gamma$  por essas células (JAYAKUMAR et al., 2008; WOLFE et al., 1991). Durante a exposição ao parasito, ocorre uma forte ativação de sinais, que resultam em efeitos, como a completa inibição da liberação de IL-12 por macrófagos (JAYAKUMAR et al., 2008; CARRERA et al.; 1996; MELBY, 1991).

Manna et al. (2006) avaliaram a quantidade de citocinas no sangue de cães com LV. Cães sintomáticos mostraram baixos níveis de IFN- $\gamma$ , e grande quantidade de IL-12. Isto sugere que altos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-2, sem a presença de sinais clínicos pode propiciar ao paciente uma resistência frente ao progresso da doença.

Na infecção pela *Leishmania* sp, há um aumento na concentração de IL-4, secretada por células Th2 secretam (TRINCHIERI, 2003). A IL-4 que diminui a expressão dos receptores para IL-12 nas células Th1, suprimindo assim a produção de IFN- $\gamma$ , o que leva ao desenvolvimento da resposta Th2 (CARRERA, 1996). Cães com altos níveis de IL-4 apresentam sinais clínicos mais pronunciados (QUINNELL, 2001).

Conforme relatado no II Fórum de Discussão sobre o Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (2009), a doença, considerada um grave problema de saúde pública, ainda requer estudos quanto à sua patogenia. A compreensão da dinâmica de reprodução do protozoário na medula óssea, um dos principais sítios de



### 3. OBJETIVOS

#### - Geral:

Avaliar a medula óssea de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, provenientes de área endêmica para leishmaniose visceral canina, no que diz respeito à celularidade e expressão dos receptores celulares, alterações citológicas e histopatológicas, perfil de citocinas.

#### - Específicos:

- Comparar os valores obtidos do sangue periférico de cães com LV com a celularidade da medula óssea;

- Avaliar as alterações cito e histopatológicas da medula óssea de cães com LV;

- Relacionar as alterações macro e microscópicas da medula óssea de cães com LV com a imunomarcação de células inflamatórias, receptores celulares e citocinas;

- Correlacionar a carga parasitária para *Leishmania* sp e a quantidade de macrófagos, de linfócitos T e de células expressando as citocinas TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, MHC-II, entre si, na medula óssea de cães com LV, nos diferentes grupos experimentais.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram avaliados 60 cães, sendo 54 animais naturalmente infectados (GI), submetidos à eutanásia no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Araçatuba/SP, com diagnóstico positivo para LV, confirmado pelo teste ELISA (Ensaio Imunoenzimático). Dentre os animais avaliados, não houve predileção por raça, sexo ou idade. Para o grupo controle, foram utilizados seis animais não infectados (NI), provenientes de área não endêmica para LV, com teste ELISA negativo para a doença.

A eutanásia de cães com LV é feita em cumprimento ao Decreto nº 51.838 do Ministério da Saúde do Brasil, de 14 de março de 1963, o qual estabelece que animais domésticos portadores de leishmaniose devam ser eutanasiados. O método de eutanásia empregado segue as recomendações da Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, com indução anestésica com barbitúrico (Tiopental, Cristália Itapira/SP), seguida da administração de cloreto de potássio 19,1%, por via intravenosa<sup>1</sup>.

A necropsia dos cães foi realizada imediatamente após o óbito. No exame externo dos cadáveres, foram avaliadas as alterações macroscópicas e todos os animais do GI apresentaram pelo menos uma lesão, como úlceras e descamação

---

<sup>1</sup> O delineamento experimental deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal (Protocolo nº 027229/12).

de pele, onicogribose, linfadenomegalia, ceratoconjuntivite, hiperqueratose e caquexia. Os cães não infectados não apresentavam lesões.

Todos os animais tiveram a medula óssea colhida, tanto para realização do mielograma e observação de alterações morfológicas das células, quanto para o exame histopatológico e imuno-histoquímico. Além disso, 20 cães do GI e os seis cães do GC tiveram uma amostra de sangue coletada para realização do hemograma.

#### **4.2 Perfil hematológico do sangue periférico**

Dos animais que foram submetidos ao hemograma, uma amostra de 10 mL de sangue foi colhida por punção venosa antes da eutanásia, e acondicionada em frasco contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), na concentração final de 1mg/ml. Essas amostras foram processadas no contador automático de células (ABCvet®, ABX, France), para obtenção do hemograma.

No momento da colheita de sangue, uma gota deste foi disposta em uma lâmina e, com o auxílio de outra lâmina, fez-se o esfregaço. Com este material, corado pelo método de Giemsa e observado em microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse E200), foram realizadas a contagem diferencial de leucócitos e a descrição das características morfológicas das células sanguíneas. Os valores de referência foram obtidos de Rizzi et al. (2010).

### 4.3 Análise citológica da medula óssea

Foi realizada punção biopsia aspirativa (PBA) da medula óssea do fêmur dos animais, logo após a eutanásia. Para tanto, utilizou-se agulha 40x12 acoplada a uma seringa contendo EDTA. Após a colheita, o material foi espalhado em uma lâmina de vidro e, com o auxílio de outra lâmina, fez-se a técnica de *squash*, de acordo com Meinkoth et al. (2009).

As lâminas, depois de secas, foram coradas pelo método de Giemsa e então realizou-se a contagem diferencial de células nucleadas em microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse E200), em aumento de 1000 vezes. Foram contadas 500 células, diferenciando-se seu tipo, de acordo com o anexo A. A porcentagem de cada tipo de célula foi então calculada em relação às 500 células contadas.

A partir dessa contagem, obteve-se a relação mieloide:eritroide (relação M:E), dividindo-se a quantidade de células da série granulocítica pela quantidade de células nucleadas da linhagem eritroide (JAIN, 1993). Os valores de referencia foram baseados em estudo de Mischke e Busse (2002). Foi também avaliada a presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp, de maneira qualitativa (positivo ou negativo).

### 4.4 Análise histopatológica da medula óssea

Os fragmentos de medula óssea colhidos na necropsia foram fixados em solução de formol a 10% tamponado com fosfatos, pH 7,2. Após 24 horas de fixação, essas amostras foram desidratadas em soluções de concentração

decrecente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm e corados com Hematoxilina e Eosina para avaliação em microscopia de luz (Nikon Eclipse E200). Foram avaliadas as alterações morfológicas e celulares, tais como emperipolesi e displasia.

#### **4.5 Análise imuno-histoquímica da medula óssea**

A determinação da carga parasitária foi feita em cortes incluídos em parafina, por meio da técnica de imuno-histoquímica, conforme protocolo descrito por Tafuri et al. (2004), com modificações (MOREIRA et al., 2013). Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 1.

O protocolo de imuno-histoquímica utilizado seguiu, resumidamente, os seguintes passos:

- 1) desparafinização dos cortes de medula óssea em estufa a 60°C por 1 hora;
- 2) hidratação dos cortes em soluções decrescentes de xilol e álcool e banho em água destilada;
- 3) recuperação antigênica (tabela 1), em solução tampão de citrato de sódio 10 mM (pH 6,0);
- 4) bloqueio da peroxidase endógena utilizando uma solução a 8% (92 mL de álcool metílico e 8 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes) por 20 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura;
- 5) bloqueio das reações inespecíficas (Protein Block, Dakocytomation, cód. X0909) por 30 minutos, à temperatura ambiente;

6) os cortes foram incubados com anticorpos primários, em diluições específicas (tabela 1), tempo de incubação de 18 horas a 4°C;

7) os cortes foram incubados com o anticorpo secundário e substrato por 1 h, à temperatura ambiente (tabela 1);

8) O cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina – Dakocytomation (cód. K3468-1) foi utilizado para revelar a reação;

Entre cada um dos passos descritos anteriormente realizaram-se lavagens em solução tampão Tris HCl, pH 7,9;

9) A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merck, cód. HX888585).

Como controle negativo, foi excluído o anticorpo primário da reação, utilizando-se apenas o diluente de anticorpo (Dakocytomation, cód. S302283-2). Já para o controle positivo, foram utilizados tecidos animais de acordo com a orientação do fabricante de cada anticorpo.

Para quantificar a imunomarcção em cada corte, foram contadas as células marcadas em cinco campos aleatórios, no aumento de 400x (microscópio Nikon Eclipse E200). Cada campo possuía uma área de 0,19625 mm<sup>2</sup>, de acordo com o manual de instruções do fabricante. A partir dos valores obtidos nestes campos, calculou-se uma média do número de células imunomarcadas por lâmina, sendo essas médias avaliadas em cada grupo (GI e GNI).

Tabela 1. Anticorpos primários e respectivas diluições, anticorpos secundários, local de marcação celular e formas de recuperação antigênica utilizados na reação imuno-histoquímica de medula óssea de cães com leishmaniose visceral.

Anticorpo primário	Marcação celular	Recuperação antigênica	Diluição	Substrato	Origem/marca/código
Anti- <i>Leishmania</i> <sup>1</sup>	Formas amastigotas de <i>Leishmania</i>	Panela a vapor Philips Walita <sup>2</sup>	1:1000	LSAB <sup>4</sup>	Canino (soro hiperimune)
Anti-TNF- $\alpha$	Células expressando TNF- $\alpha$	Câmara de pressão Pascal (Dako) <sup>3</sup>	1:50	Advance <sup>5</sup>	Mouse monoclonal (Santa Cruz, cód. SC-80386)
Anti-TGF- $\beta$	Células expressando TGF- $\beta$	Câmara de pressão Pascal (Dako) <sup>3</sup>	1:1000	Advance <sup>5</sup>	Rabbit polyclonal (Santa Cruz, cód. SC-146)
Anti-CD3	Linfócito T	Panela a vapor Philips Walita <sup>2</sup>	1:500	LSAB <sup>4</sup>	Mouse monoclonal (Dako, cód. M7254)
Anti-HLA-DR, cadeia $\alpha$	MHC-II na membrana celular	Panela a vapor Philips Walita <sup>2</sup>	1:600	LSAB <sup>4</sup>	Mouse monoclonal (Dako, cód. M0746)
Anti-IFN- $\gamma$	Linfócitos T ativados	Câmara de pressão Pascal (Dako) <sup>3</sup>	1:700	LSAB <sup>4</sup>	Rabbit polyclonal (Abcam, cód ab25101)
Anti-IL-10	Células expressando IL-10	Câmara de pressão Pascal (Dako) <sup>3</sup>	1:300	LSAB <sup>4</sup>	Rabbit polyclonal (Biorbyt, cód orb100193)
Anti-macrófago	Macrófagos	Câmara de pressão Pascal (Dako) <sup>3</sup>	1:4000	LSAB <sup>4</sup>	mouse anti-human monoclonal MAC387, (Abcam, cód ab22506)

1- Soro de cão positivo para *Leishmania chagasi* (protocolo modificado de TAFURI et al., 2004); 2- Solução de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0, por 40 minutos; 3- Solução de citrato sódio 10 mM, pH 6,0 por 12 minutos; 4- Complexo Estreptavidina Peroxidase (kit LSAB – Dakocytomation, cód. K0690-1); 5- Kit Advance HRP® (Dako Cytomation, código K406889-2).

#### 4.6 Análise estatística

A contagem de células imunomarcadas foi submetida à análise de variância (ANOVA) pelo método dos quadrados mínimos, assim como os parâmetros avaliados pelo hemograma e pela citologia da medula óssea, com o auxílio do programa computacional SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Para a realização da Anova, suas pressuposições foram satisfeitas e, para isso, todos os parâmetros foram submetidos ao teste de Brown-Forsythe (BF) para determinar a homogeneidade das variâncias e ao teste de Cramer-von-Mises (CM), para determinar a normalidade dos resíduos. Quando estes testes foram significativos, ou seja, não houve a satisfação das pressuposições, os dados foram transformados, quando possível, segundo Bartlett (1947) e dados *outliers* foram retirados. Quando as transformações ainda não propiciaram a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias, os dados foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW). Como testes de comparações múltiplas, utilizou-se o teste de Student-Newman-Keuls (SNK) e o de comparação múltipla pelo valor de z, para os casos onde a Anova e o KW foram significativos, respectivamente. O teste de KW e o teste de comparação múltipla pelo valor de z foram realizados pelo programa Statística 7.0 (StatSoft, Inc. 1984-2004). Foi realizada a determinação do coeficiente de correlação de postos de Spearman entre a contagem de células imunomarcadas para carga parasitária, citocinas, células, parâmetros avaliados pelo hemograma e pela citologia da medula óssea, por grupo, com o auxílio do programa Statística 7.0 (StatSoft, Inc. 1984-2004).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise macroscópica da medula óssea

Na avaliação macroscópica da medula óssea, 65% (35/54) dos cães do G1 a apresentava de coloração mais clara ou com pontos brancos (figura 2), enquanto que os animais não infectados possuíam a medula óssea de coloração vermelha-escura uniforme.

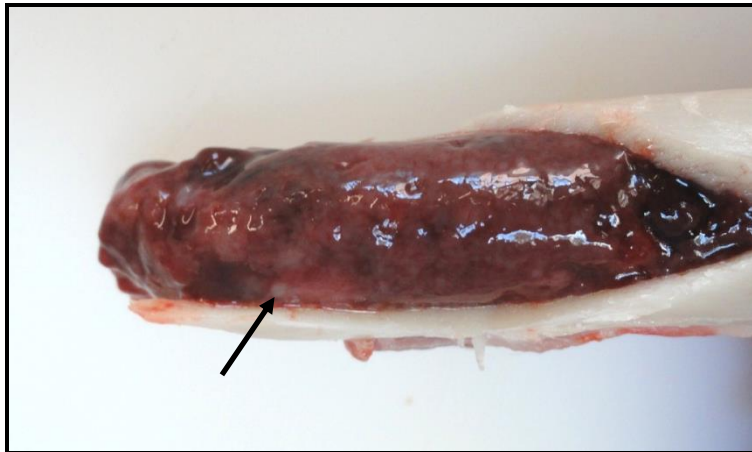


Figura 2- Aspecto macroscópico de fragmento da medula óssea de cão infectado, portador de Leishmaniose Visceral, apresentando áreas de coloração mais clara e pontos brancos (seta).

### 5.3 Análise citológica da medula óssea

Na avaliação citológica da medula óssea, foram observadas formas amastigotas do parasito no citoplasma de macrófagos ou livres no fundo do esfregaço em 40,7% (22/54) dos animais do grupo G1.

Na técnica de imuno-histoquímica, 74,1% (40/54) dos animais do GI apresentaram marcação positiva para formas amastigotas do parasito, dentro de macrófagos. Nos animais do GC, não foi observado o parasito no esfregaço de MO, tampouco na marcação pela técnica de imuno-histoquímica.

#### **- Avaliação da série eritroide**

Quanto à linhagem eritroide, não foi observada diferença significativa em relação à quantidade de proeritroblastos, eritroblastos basofílicos e policromáticos eritroblastos ortocromáticos e metaeritrócitos, quando se compararam os grupos infectado e não infectado.

No entanto, foi constatada correlação negativa entre a quantidade eritroblastos basofílicos e policromáticos e a relação M:E ( $p < 0,6593$ ) nos cães do GI. Quanto à morfologia das células da linhagem eritroide, não foram encontradas alterações patológicas, tais como displasia.

#### **- Avaliação na série mieloide**

As células precursoras da linhagem granulocítica não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos estudados. Porém, foi constatada correlação positiva entre a relação M:E e os promielócitos ( $p < 0,4806$ ), mielócitos ( $p < 0,7965$ ), metamielócitos ( $p < 0,7011$ ), bastonetes ( $p < 0,5190$ ) e neutrófilos segmentados ( $p < 0,6487$ ) nos cães infectados.

A média e desvio padrão da relação M:E dos cães infectados foi de  $1,43 \pm 1,38$ , variando de 0,6 a 8,22, nos animais do GNI foi de  $1,57 \pm 0,09$ , variando de 1,45 a 1,7.

Para esse parâmetro, foi observada diferença significativa entre o GI e o GNI ( $p < 0,012$  / Teste de SNK), como demonstrado na figura 3A.

Os linfócitos representaram uma média de 13,45% da quantidade de células da medula óssea dos cães do GI e 10,16% das células no GNI. Foi observada diferença significativa em relação à quantidade de linfócitos na medula óssea entre o GI e o GNI ( $p = 0,0042$  / Teste de SNK) (Figura 3B).

Foi constatada correlação entre a quantidade de linfócitos e a presença do parasito na medula óssea dos cães do GI ( $p < 0,6029$  / Coeficiente de Correlação de Spearman).

Os plasmócitos representaram uma média de 5,05% da quantidade de células da medula óssea dos cães do GI e 4,2% das células da medula óssea do GC, no entanto, a quantidade de plasmócitos não apresentou aumento significativo.

Os macrófagos representaram uma média de 4,36% da quantidade de células da medula óssea dos cães do GI e 2,4% dos cães do GNI. Quanto aos macrófagos da medula óssea, estes apresentaram correlação com a carga parasitária nos animais do GI ( $p = 0,4972$  / Coeficiente de Correlação de Spearman). No entanto, sua quantidade não diferiu estatisticamente entre os dois grupos estudados.

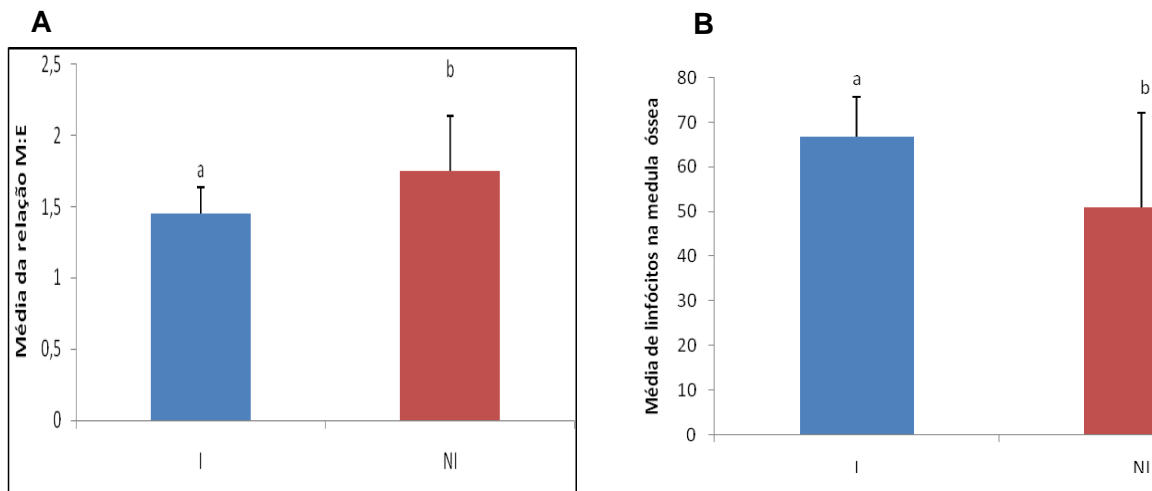


Figura 3– (A) Média da relação M:E calculada de acordo com o mielograma de cães com Leishmaniose Visceral. Notar a diferença significativa entre o grupo I em relação ao grupo NI ( $p < 0,012$ ). (B) Média da quantidade de linfócitos observados no mielograma cães com Leishmaniose Visceral. Notar a diferença significativa entre o grupo I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0042$ ). Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Teste de Student-Newman-Keuls. I: infectado; NI: não infectado.

#### 5.4 Análise histopatológica da medula óssea

Na análise histopatológica das amostras de medula óssea dos cães infectados, observaram-se granulomas multifocais a difusos em 36,5% (20/54) dos animais. Os granulomas possuíam uma disposição mais difusa, e não a formação nodular típica, sendo compostos por linfócitos, plasmócitos e macrófagos contendo, por vezes, formas amastigotas de *Leishmania* sp (figura 4A).

Em relação aos granulócitos, incluindo as células imaturas, foi observada displasia em 27,8% (15/54) dos animais do GI, caracterizada por núcleos irregulares ou duplos. Foi observada displasia megacariocítica em 41,8% dos cães do GI, caracterizada por fragmentação ou irregularidade nuclear. Ainda em relação aos megacariócitos, 37% (20/54) dos cães do GI apresentaram emperipolesi (figura 4B). Em dois cães do GI com alta carga parasitária, verificou-se a presença de formas

amastigotas imunomarcadas no citoplasma de megacariócitos. Os animais do GC não apresentaram essas alterações.

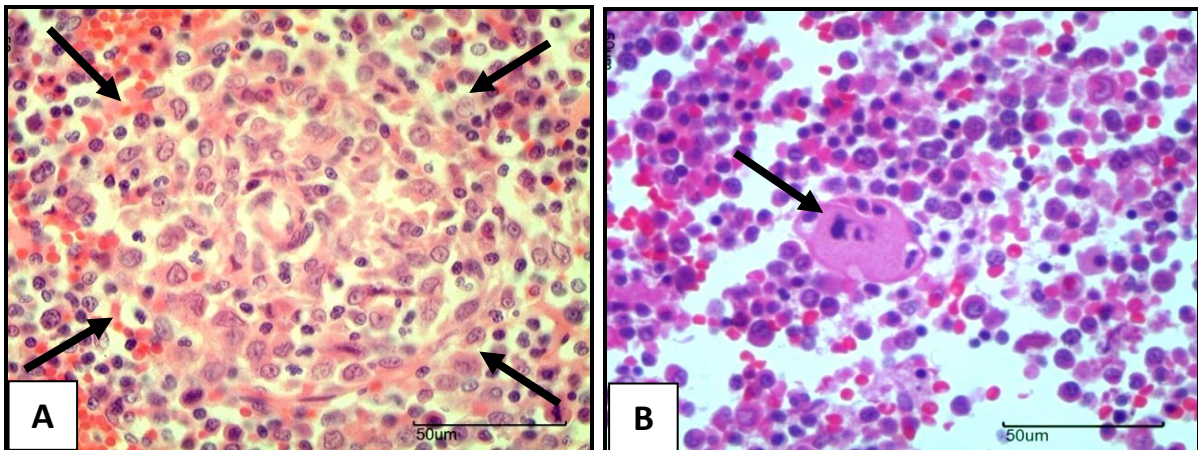


Figura 4- Fotomicrografia de medula óssea de cão com leishmaniose visceral. (A) Notar um granuloma com limites pobremente definidos (setas). (B) Notar megacariócito com núcleo irregular e presença de células em seu citoplasma, caracterizando emperipolesis (seta), aspecto indicativo de displasia de megacariócitos. HE, barra = 50µm.

### 5.5 Análise imuno-histoquímica da medula óssea

Durante a avaliação da medula óssea pela técnica de imuno-histoquímica, para verificação da carga parasitária de *L. chagasi*, foi observada marcação para o parasito no citoplasma de macrófagos e também no interstício (figura 5A) dos animais do GI. Houve diferença significativa entre o GI (40/54) e GC ( $p < 0,0099$ ) (Teste de Kruskal-Wallis) figura 5B.

Nos animais do GI, a carga parasitária apresentou correlação negativa com o  $\text{IFN-}\gamma$  ( $p = - 0,5553$ ), com os mielócitos ( $p = - 0,4775$  / Coeficiente de Correlação de Spearman) e com os linfócitos do sangue periférico ( $p = - 0,4584$  / Coeficiente de Correlação de Spearman).

Os linfócitos T CD3+ apresentaram marcação no citoplasma (figura 6A). Houve diferença significativa entre os cães do GI e do GC ( $p < 0,0299$  / Teste de Kruskal-Wallis), figura 6B.

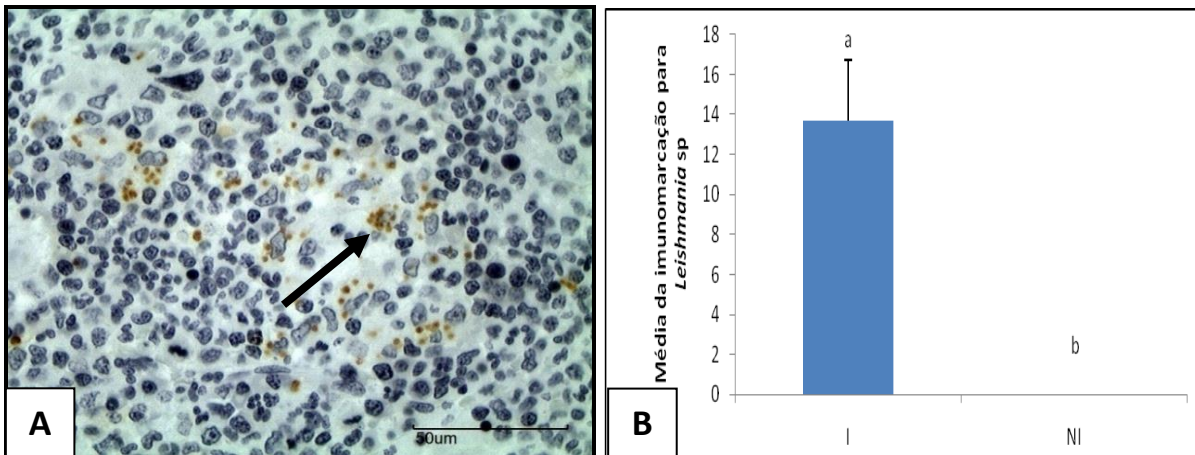


Figura 5- (A) Fotomicrografia de imunomarcção positiva para *L. chagasi* no citoplasma de macrófagos (seta). Estreptavidina Biotina Peroxidase. Barra = 50 μm. (B) Média da imunomarcção para amastigotas de *Leishmania* sp, na medula óssea de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o GI em relação ao GNI ( $p < 0,0042$ ). Teste de Student-Newman-Keuls. I: infectado; NI: não infectado.

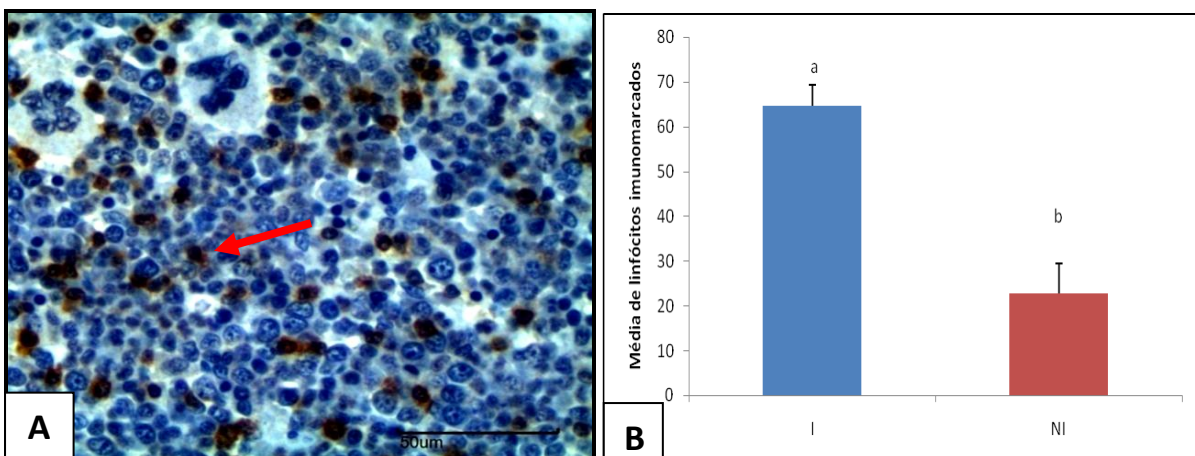


Figura 6- (A) Fotomicrografia de imunomarcção positiva para linfócitos T CD3+ (seta). Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase. Barra = 50 μm. (B) Média da quantidade de linfócitos imunomarcados na medula óssea de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o GI em relação ao GNI ( $p < 0,0299$ ). Teste de Student-Newman-Keuls. I: infectado; NI: não infectado.

Os macrófagos apresentaram imunomarcção no citoplasma pelo MAC387 (figura 7A). Poucos macrófagos presentes nos granulomas apresentaram imunomarcção. Houve diferença significativa entre o GI e o GC ( $p < 0,0076$  / Teste de Kruskal-Wallis), figura 7B.

Populações de macrófagos e células apresentadoras de antígeno apresentaram imunomarcção citoplasmática para MHC de classe II (figura 8A). A marcação foi especificamente citoplasmática. Uma pequena quantidade de macrófagos imunomarcados foi observada nas áreas contendo granulomas. Houve diferença significativa entre os cães do GI em relação aos do GC ( $p < 0,0001$  / Teste de SNK), figura 8B.

Foi observada imunomarcção para TNF- $\alpha$  no citoplasma de macrófagos, linfócitos e plasmócitos (figura 9A). Houve diferença significativa entre o GI em relação ao GC ( $p < 0,0001$  / Teste de SNK), figura 9B.

O TGF- $\beta$  marcou o citoplasma de macrófagos e linfócitos, além do estroma da medula óssea (figura 10A). Foi observada diferença significativa entre o GI e o GNI ( $p < 0,0001$  / Teste de SNK), figura 10B.

A imunomarcção para IFN- $\gamma$  foi observada no citoplasma de macrófagos e linfócitos (figura 11A). Foi constatada diferença significativa entre o grupo infectado em relação ao grupo não infectado ( $p < 0,0001$  / Teste de SNK), figura 11B. Nos cães infectados, foi observada correlação negativa entre a quantidade de células imunomarcadas para IFN- $\gamma$  na medula óssea e os leucócitos ( $p = 0,6789$ ) e monócitos no sangue ( $p = 0,7228$  / Coeficiente de Correlação de Spearman), além de correlação positiva entre essa citocina e os macrófagos imunomarcados da medula óssea ( $p = 0,4614$ ).

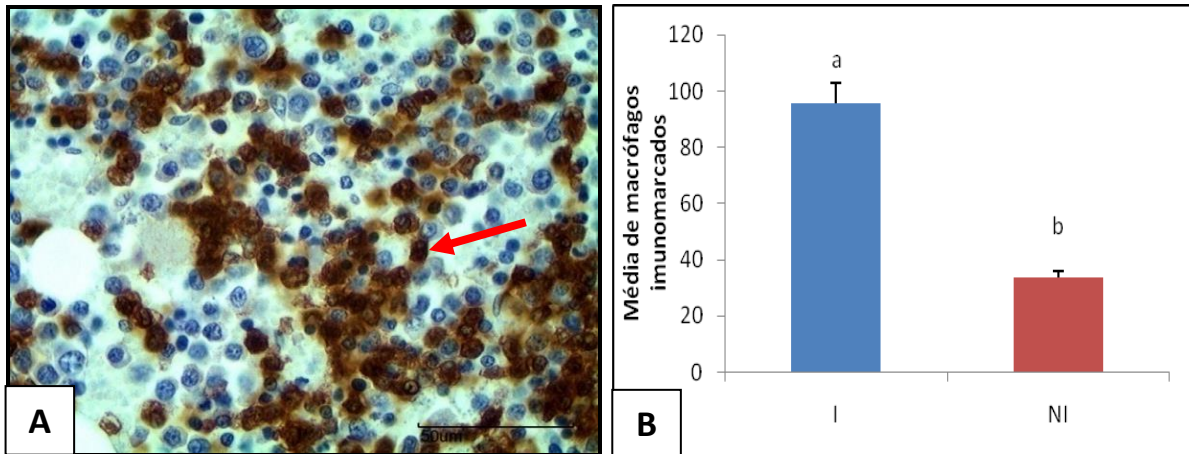


Figura 7- (A) Fotomicrografia de imunomarcção positiva para macrófagos, utilizando-se MAC387 (seta). Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase. Barra = 50µm. (B) Média da quantidade de macrófagos imunomarcados na medula óssea de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o Grupo I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0076$ ). Teste de Kruskal-Wallis. I: infectado; NI: não infectado.

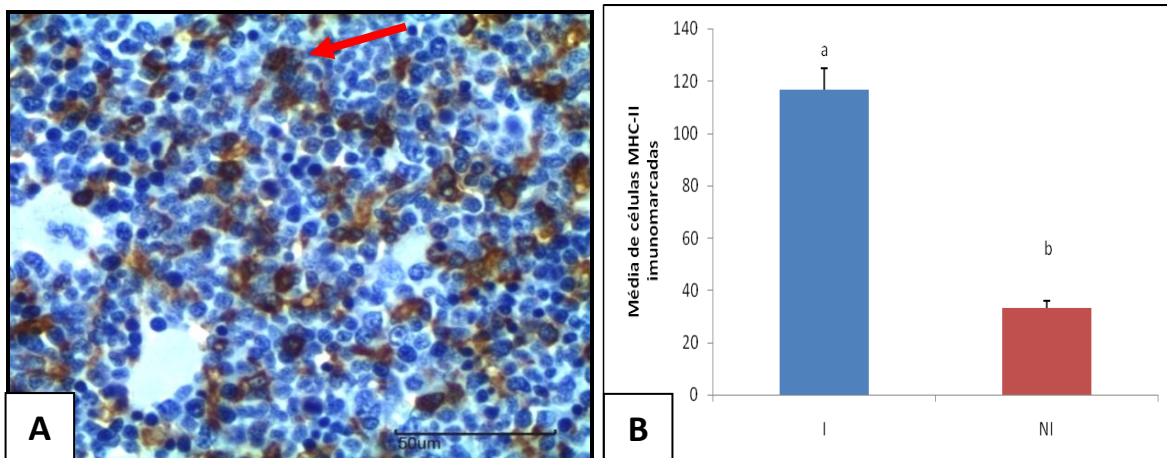


Figura 8- (A) Fotomicrografia de imunomarcção positiva para MHC de classe II (seta). Estreptavidina Biotina Peroxidase. Barra = 50µm. (B) Média da quantidade de células expressando MHC de classe II imunomarcadas na medula óssea de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o grupo I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0001$ ). Teste de Kuskal-Wallis. I: infectado; NI: não infectado.

A citocina IL-10 apresentou imunomarcção na membrana de linfócitos (figura 9B). Foi observada diferença significativa entre o grupo infectado em relação ao grupo não infectado ( $p < 0,0001$  / Teste de SNK), figura 11D. Os cães infectados apresentaram correlação positiva entre a IL-10 e o MHC de classe II ( $p = 0,7126$ ), entre IL-10 e TGF- $\beta$  ( $p = 0,5825$ ) e correlação negativa entre a quantidade de células imunomarcadas para IL-10 e a quantidade de macrófagos no exame citológico da medula óssea ( $p = -0,6009$  / Coeficiente de Correlação de Spearman).

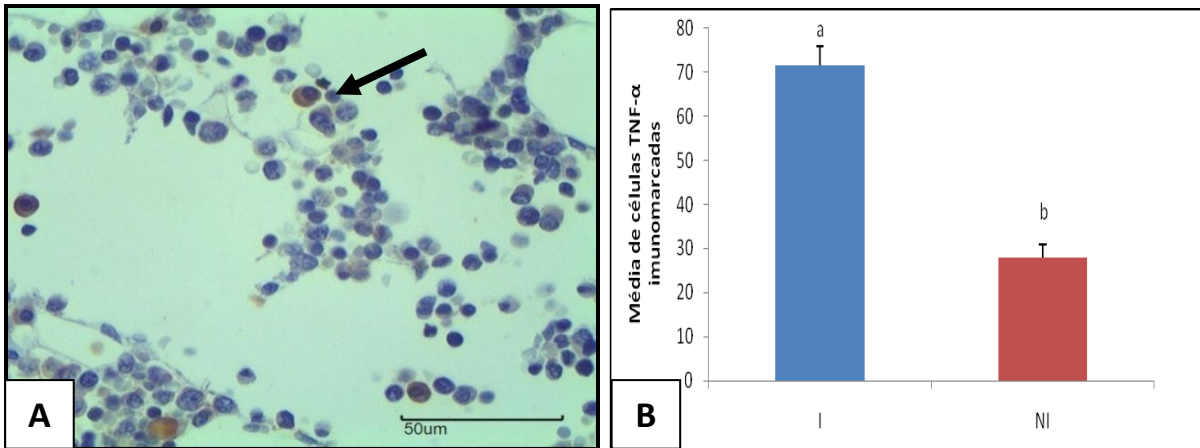


Figura 9- (A) Fotomicrografia de imunomarcção positiva para TNF- $\alpha$  (seta). Complexo de polímero ligado a peroxidase. Barra = 50 $\mu$ m. (B) Média da quantidade de células imunomarcadas pelo TNF- $\alpha$  na medula óssea de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o grupo I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0001$ ). Teste de Student-Newman-Keuls. I: infectado; NI: não infectado.

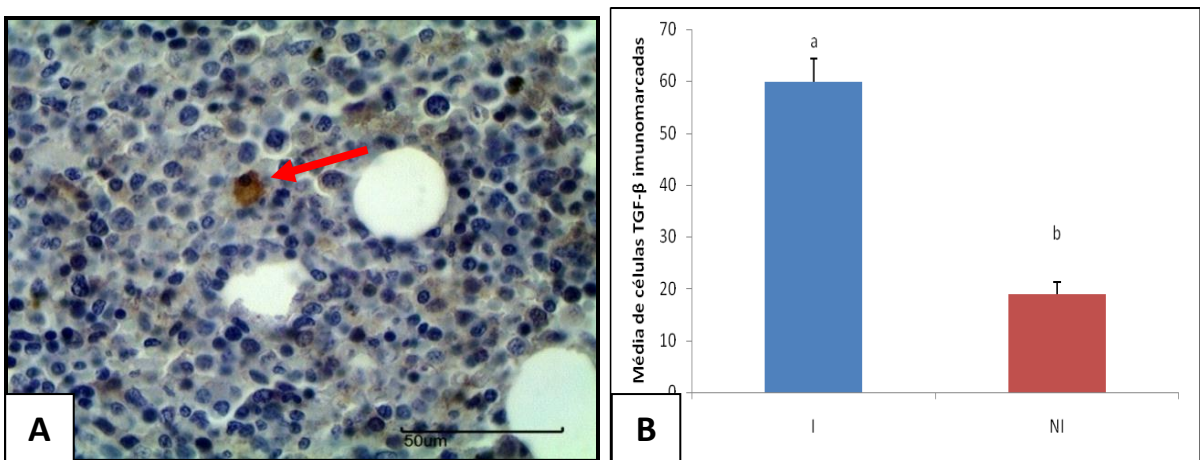


Figura 10- (A) Fotomicrografia de imunomarcção positiva para TGF- $\beta$  (seta). Complexo de polímero ligado a peroxidase. Barra = 50 $\mu$ m. (B) Média da quantidade de células imunomarcadas pelo TGF- $\beta$  na medula óssea de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o grupo I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0001$ ). Teste de Kruskal-Wallis. I: infectado; NI: não infectado.

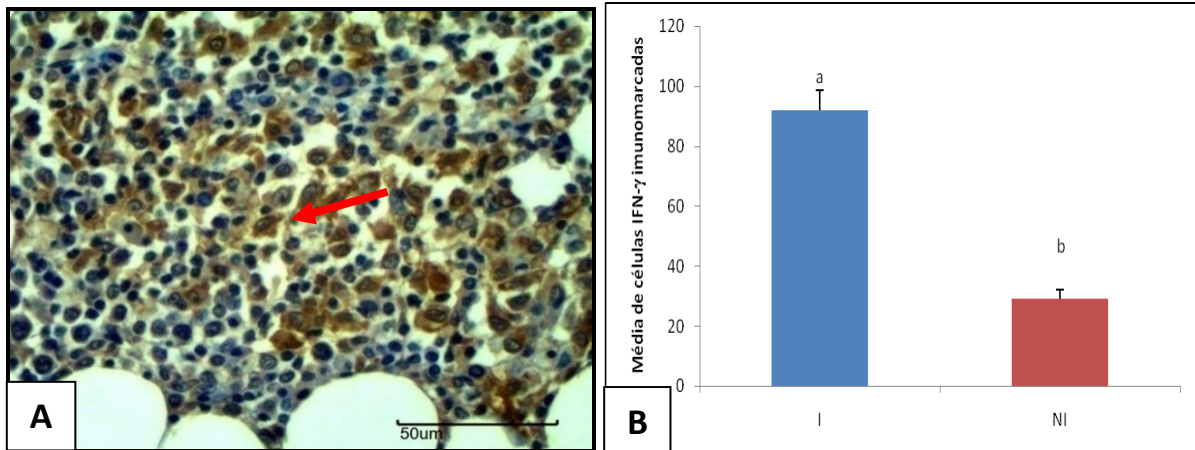


Figura 11- (A) Fotomicrografia de imunomarcção positiva para IFN- $\gamma$  (seta) em vários tipos celulares. Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase. Barra = 50 $\mu$ m. (B) Média da quantidade de células imunomarcadas pelo IFN- $\gamma$  na medula óssea de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o grupo I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0001$ ). Teste de Student-Newman-Keuls. I: infectado; NI: não infectado.

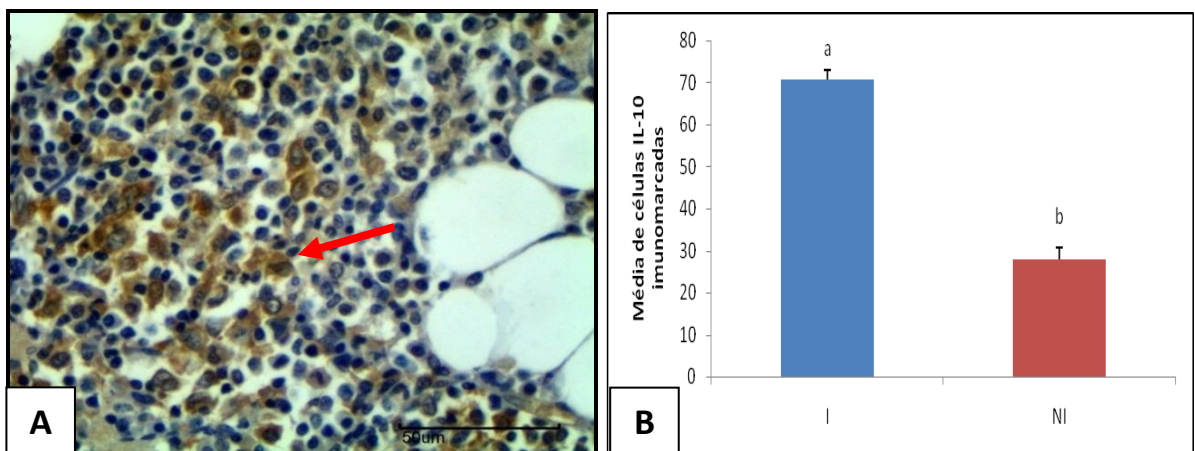


Figura 12- (A) Fotomicrografia de imunomarcção positiva para IL-10 (seta) em vários tipos celulares. Complexo Estreptavidina Biotina Peroxidase. Barra = 50 $\mu$ m. (B) Média da quantidade de células imunomarcadas pela IL-10 na medula óssea de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” e “c” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o grupo I em relação ao grupos NI ( $p < 0,0001$ ). Teste de Student-Newman-Keuls. I: infectado; NI: não infectado.

## 5.2 Análise do hemograma

Avaliando-se o hemograma (Anexo B), os cães infectados apresentaram anemia, com diminuição ( $p < 0,0001$  / Teste de SNK) da quantidade de hemácias, hemoglobina e hematócrito. Em relação aos eritrócitos, houve diferença significativa dos animais infectados em relação aos do grupo não infectado ( $p < 0,0001$  / Teste de SNK).

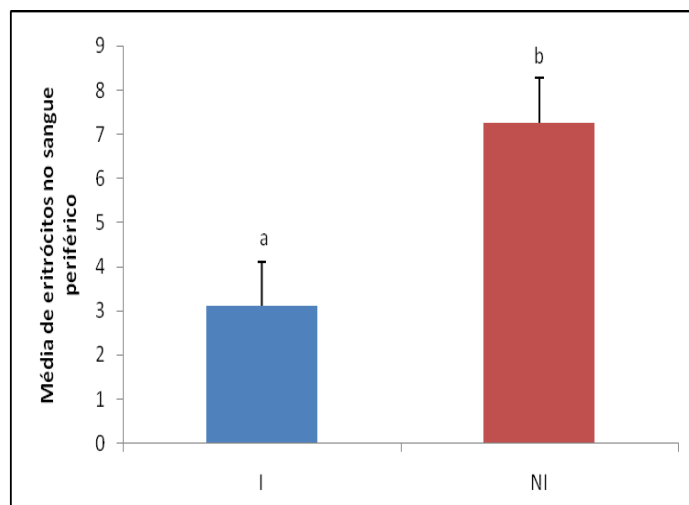


Figura 13- Média da quantidade de eritrócitos no sangue periférico de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o grupo I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0001$ ). Teste de Student-Newman-Keuls. I: infectado; NI: não infectado.

Em relação à hemoglobina e hematócrito, foi observada diferença significativa do grupo infectado em relação ao grupo não infectado (figura 4a). Não foi constatada diferença significativa nos valores de volume corpuscular médio (VCM) e (CHCM) tanto dos animais infectados quanto nos não infectados.

Foi observada linfocitose, com diferença significativa entre a quantidade de linfócitos no sangue no grupo infectado em relação ao grupo não infectado ( $p < 0,0004$  / Teste de Kruskal-Wallis).

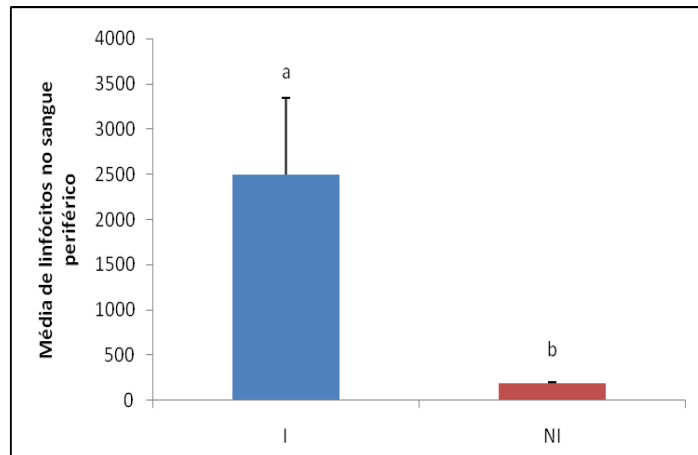


Figura 14- Média da quantidade de linfócitos no sangue periférico de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o grupos I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0004$ ). Teste de Kuskal-Wallis. I: infectado; NI: não infectado.

Os linfócitos da medula óssea apresentaram correlação com os linfócitos do sangue periférico ( $p < 0,4787$ ) nos cães infectados.

Foi observada monocitose, com diferença significativa em relação à quantidade de monócitos no sangue dos animais infectados em relação ao grupo não infectado ( $p < 0,0055$  / Teste de SNK), figura 4C.

Correlação negativa foi observada entre a quantidade de monócitos no sangue periférico e a carga parasitária na medula óssea dos cães infectados ( $p = -0,4950$  / Coeficiente de Correlação de Spearman). A quantidade de monócitos no sangue periférico dos cães infectados também apresentou correlação positiva com os segmentados na medula óssea ( $p = 0,7015$ ) e correlação negativa com a carga parasitária na medula óssea ( $p = -0,4950$ ).

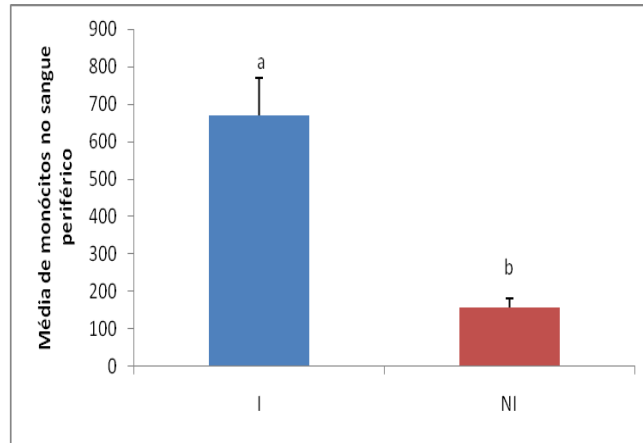


Figura 15- Média da quantidade de monócitos no sangue periférico de cães com Leishmaniose Visceral. Letras “a” e “b” significam diferença estatística entre os grupos e “ab” mostra que não houve diferença significativa. Notar a diferença significativa entre o grupos I em relação ao grupo NI ( $p < 0,0013$ ). Teste de Student-Newman-Keuls. I: infectado; NI: não infectado.

## 6. DISCUSSÃO

A estrutura e função da medula óssea em espécies domésticas, bem como, as citocinas hematopoiéticas, receptores específicos para cada linhagem celular e o microambiente ainda não são completamente entendidos (SHARLEY; HILL, 2007). Abreu et al. (2011) destacaram a medula óssea como um órgão importante na dinâmica da LV, pois permite estudar a correlação entre a densidade parasitária com a eritropoiese e a leucopoiese.

A carga parasitária diferiu significativamente entre o grupo infectado em relação ao grupo não infectado. Mesmo a medula óssea sendo considerada um dos tecidos mais sensíveis para diagnóstico da leishmaniose visceral (PAPARCONI et al., 2013), de acordo com Harvey et al. (2005), o exame citológico deste compartimento apresenta limitado valor diagnóstico. A importância deste exame está, sobretudo, na determinação das porcentagens exatas dos tipos celulares de cada linhagem e na observação das alterações da morfologia celular.

Na avaliação das células da linhagem eritroide da medula óssea, não foi constatada diferença significativa em relação à quantidade, quando comparados os grupos infectado e não infectado. Esta observação difere do relatado por Abreu et al. (2009), que descreveram diferenças significativas nas quantidades de proeritroblasto e eritroblasto policromático e ortocromático entre os cães infectados e os não infectados. Kaye et al. (2004) e Cotterell et al. (2000b) também descreveram aumento da eritropoiese secundário à infecção por *L. donovani*. De acordo com Morceau et al. (2009), as citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a infecção pela *Leishmania* sp, induzem apoptose precoce e tem efeito inibitório na diferenciação eritroide, o que não foi constatado nesse estudo, provavelmente por

haver uma mistura de citocinas anti e pró inflamatórias. A cultura de células da medula óssea de hamsters infectados experimentalmente com *L. donovani*, revelou que a diferenciação dos eritroblastos é inibida por apoptose (LAFUSE et al., 2013).

As células precursoras granulocíticas da linhagem mieloide não apresentaram diferenças significativas em relação aos grupos estudados. Já Abreu et al. (2009), relataram diminuição no número de mieloblastos em cães infectados, quando comparado aos não infectados. No entanto, foi constatada correlação negativa entre a imunomarcação para o parasito e os mielócitos dos cães infectados. Esses achados evidenciam a interferência negativa da *Leishmania* sp na proliferação e maturação dos precursores granulocíticos. Essa supressão da maturação dos mielócitos pode ser extremamente prejudicial, pois de acordo com Radin; Wellmann (2010), os mielócitos são o último estágio de proliferação da linhagem granulocítica que pode sofrer mitose.

Apesar de Costa Val et al. (2004) afirmarem que o infiltrado inflamatório e o parasitismo medular parecem não influenciar negativamente as células precursoras dos leucócitos e plaquetas, como se supõe que ocorra com a linhagem eritroide, foi observada displasia nos precursores de granulócitos em 27,8% (15/54) dos animais infectados, caracterizada por núcleos irregulares ou duplos. Segundo relatos de Baltridge et al. (2011), o TNF- $\alpha$  também está associado à dismielopoiese em resposta a agentes infecciosos.

Displasia megacariocítica, caracterizada por fragmentação ou irregularidade nuclear ocorreu em 40,7% (22/54) dos cães infectados, enquanto que os cães não infectados não apresentaram tal alteração. No presente trabalho, grande quantidade de células imunomarcadas para IL-10 foi observada nos cães infectados, o que

sugere o envolvimento no processo de dismielopoiese. Pinelli et al. (1994) sugeriram que a dismegacariopoiese estaria associada à resposta imune predominantemente do tipo Th2, com alta produção de IL-4 e IL-10.

Ainda em relação aos megacariócitos, 37% (20/54) dos cães infectados apresentaram emperipolesi, enquanto que a mesma lesão não foi observada nos não infectados. No presente estudo, foi observada a presença de parasitos no citoplasma de megacariócitos. Não existem relatos na literatura que expliquem se esse achado seria emperipolesi ou infecção do megacariócito, nem se isso interfere com a função da célula. No entanto, Sable et al. (2009) sugerem que a emperipolesi ocorra estimulada por citocinas inflamatórias liberadas na infecção por *Leishmania* sp. A emperipolesi consiste na penetração ativa de uma célula em outra e difere da fagocitose, porque a célula pode sair da hospedeira, sem que haja danos para ambas. Como exemplos, são descritas hemácias, precursores de polimorfonucleares e linfócitos (SABLE et al, 2009). Seu significado, no entanto, é incerto, já que pode ocorrer também em doenças mieloproliferativas, hemorragias e neoplasias (LEE et al., 1989).

Cotterell et al. (2000b) afirmaram que o parasito regula a hematopoiese de duas maneiras, tanto infectando diretamente as células tronco e progenitoras, quanto infectando a população de macrófagos do estroma da medula óssea. Por meio da técnica de imuno-histoquímica, observaram que estas últimas são as mais parasitadas. No presente estudo, os macrófagos foram as células predominantemente infectadas e raramente observou-se a presença do parasito em megacariócitos, concordando com as afirmações do referido autor.

Baldrige et al. (2011), Valli (2007b) e Cotterell et al. (2000b) afirmaram que a hematopoiese é regulada por diversas citocinas, entre elas, o TNF- $\alpha$ . De acordo com Baldrige et al. (2011), Morceau et al. (2009), Broxmayer (1998) e Kitagawa et al. (1997), o TNF- $\alpha$  tem a capacidade suprimir a proliferação e diferenciação de eritroblastos, reduzindo a hematopoiese, além de induzir a apoptose em células tronco hematopoiéticas.

A média da relação M:E dos cães infectados foi de  $1,43 \pm 1,38$ , variando de 0,6 a 8,22 e de  $1,74 \pm 0,95$ , variando de 0,7 a 3,5 nos animais não infectados. Foi observada diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo não infectado. Apesar da média da relação M:E estar próxima ao valor normal nos animais infectados, houve uma grande variação dentro de cada grupo, e a correlação da relação M:E com os promielócitos, mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados nos cães infectados indica hiperplasia mieloide, resultado do aumento da linhagem de granulócitos, concordando com Abreu et al. (2011).

A relação M:E apresentou correlação com os eosinófilos nos animais infectados. Abreu et al. (2011) afirmaram que os eosinófilos e seus precursores não foram responsáveis pelo aumento da relação M:E, pelo contrário, observaram hipoplasia eosinofílica, estabelecida nos cães infectados, sugerindo uma disfunção da medula óssea. Alves et al. (2009) referiram diminuição significativa de eosinófilos na medula óssea dos cães infectados em relação ao grupo não infectado. Conforme relatado por Watanabe et al. (2004), os eosinófilos são estimulados pelo IFN- $\gamma$  a produzirem óxido nítrico e nitrito, na intenção de destruírem o parasito.

Foi observado aumento significativo em relação à quantidade de linfócitos do grupo infectado em relação ao grupo não infectado, pela análise citológica da

medula óssea e os linfócitos da medula óssea dos animais infectados apresentaram correlação com o parasito. Abreu et al. (2009) também descreveram aumento no número de linfócitos na medula óssea de cães infectados em relação aos não infectados. De acordo com Reis et al. (2006b), o aumento da quantidade de linfócitos na medula óssea dos cães com leishmaniose é, provavelmente, uma resposta compensatória, já que a medula óssea pode estar produzindo linfócitos para os órgãos acometidos pelo parasito.

Parte dos linfócitos T observados neste estudo pode ser composta linfócitos T reguladores (Treg). Hussel et al. (2010) referiram que os linfócitos Treg são ativados pelo TGF- $\beta$  e, conforme relatado por Suffia et al. (2005), se acumulam no sitio de uma infecção crônica por *Leishmania* sp, favorecendo a expansão do parasito e suprimindo o efeito de linfócitos Th1 e Th2, por meio da produção de IL-10. Rai et al. (2012) descreveram esse mesmo achado na medula óssea no curso da leishmaniose visceral em humanos. Portanto, a grande quantidade de linfócitos observada tanto no exame citológico quanto pela técnica de IHC provavelmente influencia negativamente a defesa do organismo contra a *Leishmania* sp.

A grande quantidade de plasmócitos observada pode ocorrer, segundo Abreu et al. (2011), de acordo com a severidade dos sinais clínicos da doença. Gavvani et al. (2002) sugeriram que o parasito induza uma resposta humoral não protetora. Essa resposta humoral ocasiona uma hipergamaglobulinemia, que contribui para a formação de imunocomplexos, que podem se depositar nos rins e em outros tecidos, interferindo com a sua função (GOTO; LINDOSO, 2004). Harvey (2001) destacou o papel do TGF- $\beta$  e da IL-10 como responsáveis pela maturação de plasmócitos. Portanto, a grande quantidade de plasmócitos observada, pode ter sido

influenciada também por essas citocinas, observada pelo expressivo número de células imunomarcadas para TGF- $\beta$  e IL-10 neste trabalho.

Na análise histopatológica das amostras do presente estudo, foram observados granulomas multifocais a difusos na medula óssea de 37% (20/54) dos cães infectados. Estes granulomas eram compostos por linfócitos, plasmócitos e macrófagos, ocasionalmente parasitados. De acordo com Moore et al. (2013), os granulomas são compostos por linfócitos B, linfócitos T CD4 e CD8, macrófagos, células dendríticas e células *natural killer*, na intenção de destruir o parasito. Murray et al. (2000) afirmaram que a formação de granulomas é estimulada pelo TNF- $\alpha$ . Outros autores já haviam descrito a inflamação granulomatosa da medula óssea VALLI, 2007a; ORAZI et al., 2006; TAFURI et al.,2001). Bathia et al. (2011) descreveram inflamação granulomatosa na medula óssea de 69,7% dos casos de humanos com leishmaniose visceral.

O número de macrófagos computados no exame citológico da medula óssea não diferiu estatisticamente entre os grupos de cães e não infectados. Natami et al. (2000) observaram aumento da quantidade de macrófagos na medula óssea de cães com leishmaniose visceral e Bathia et al. (2011) descreveram aumento da quantidade de macrófagos em 81,2% dos humanos com LV. Mylonakis et al. (2005), Barrouin-Melo et al. (2006) e Giunchetti et al (2008) também descreveram hiperplasia monocítica em órgãos linfoides, como medula óssea, linfonodos e baço.

O número de macrófagos imunomarcados na medula óssea foi maior no grupo infectado e diferiu significativamente do grupo não infectado. A quantidade de macrófagos apresentou correlação significativa com a carga parasitária nos cães infectados. Estes resultados estão de acordo com os descritos por Abreu et al.

(2011), que relataram aumento significativo da quantidade de macrófagos nos cães com LV, o que pode ser interpretado como uma estimulação antigênica associada com a infecção local. Weiser et al. (2006) afirmaram que linfócitos estimulados por antígenos, produzem uma citocina pró-inflamatória que inibe a migração de macrófagos *in vitro*, o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF). De acordo com Kamir et al. (2008), o MIF se liga a receptores expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos, como monócitos e linfócitos B, resultando na ativação dos macrófagos, que passam a produzir TNF- $\alpha$ . A interação entre MIF e a *Leishmania* sp foi observada em linfonodos de cães com LV por Bandarra (2010).

Os macrófagos possuem um papel fundamental na defesa contra a *Leishmania* sp pois, para o estabelecimento de uma resposta imune protetora, é necessário que os macrófagos e as células dendríticas apresentem antígenos parasitários aos linfócitos T (KAYE et al., 1994), por meio da interação entre o MHC de classe II do macrófago com o CD3 dos linfócitos (TIZARD, 2009). Neste trabalho, a capacidade destes fagócitos apresentarem antígenos aos linfócitos T não fica clara, pois a imunomarcagem de MHC II foi alterada, observada no citoplasma das células e não na membrana celular.

A expressiva quantidade de células imunomarcadas para TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-10 e IFN- $\gamma$  pode se dever a resposta imune mista (Th1 e Th2), assim como descrito por Barbiéri (2006). Conforme descreveram Weiss; Souza (2010), os macrófagos são divididos em subpopulações, M1 que secretam citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , expressam MHC de classe II e moléculas coestimulatórias) e são eficientes em destruir microorganismos (Th1). Já, os macrófagos M2, são ativados pelas citocinas

TGF- $\beta$ , IL-1, IL-4 e IL-10, possuem atividade anti-inflamatória, e secretam IL-10 (Th2).

Os cães infectados apresentaram anemia, com diminuição da quantidade de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, quando comparados aos animais não infectados. Achados que estão de acordo com os de Abreu et al. (2011), Reis et al. (2006a), Amusatogui et al. (2003), Xavier (2002) e Ikeda et al. (2002). No entanto, Viadanna et al. (2011) afirmaram não haver uma correlação entre o estado clínico e os parâmetros hematológicos em cães com leishmaniose visceral.

Em relação à quantidade de hemoglobina e ao hematócrito, foi observada diferença significativa no grupo infectado em relação ao grupo não infectado, concordando com os achados de Freitas et al. (2012). Já Costa-Val et al. (2004).

Comparando-se os achados do hemograma (Anexo A) com o exame citológico da série eritropoietica, além das alterações na eritropoiese contribuírem para a anemia, que ocorre em grande parte dos casos de leishmaniose (LAFUSE et al., 2013), Sen et al. (2001) acreditam que os eritócitos produzidos durante a infecção por *Leishmania* sp, são mais susceptíveis ao dano oxidativo, apresentando, portanto, uma menor vida útil. Como causa de anemia, o dano imuno-mediado de hemácias foi descrito em humanos com LV por Mahajan; Marwaha (2007). Por isso, apesar da eritropoiese estar aumentada, o nível de eritrócitos circulantes pode se manter abaixo ou dentro dos padrões esperados (TESTA, 2004). Ademais, a anemia pode não ser tão pronunciada, pois, durante a infecção na medula óssea, pode ocorrer eritropoiese no baço e no rim (MORCEAU et al., 2009, ABREU-SILVA et al., 2004). Porém, de acordo com Reis et al. (2009) e Saridomichelakis et al. (2005), o baço também é um dos tecidos mais afetados pelo parasito, que pode

interferir com a hematopoiese extra-medular. Já, em relação ao rim, a deposição de imunocomplexos pode prejudicar sua função, diminuindo também, a hematopoiese extra-medular (REIS et al., 2006a).

Não foi constatada diferença significativa nos valores de volume corpuscular médio e nem da concentração de hemoglobina corpuscular média, nos animais infectados, o que demonstra anemia normocítica normocrômica, assim como descrito por Viadanna et al. (2011), Dias (2008), Reis et al. (2006a) e Koutinas et al. (2001).

Aumento significativo na quantidade de linfócitos no sangue periférico foi observado nos animais do grupo infectado em relação ao grupo não infectado, concordando com o descrito por Freitas et al. (2012), Coura-Vital et al. (2011) e Paludo et al. (2007). Os linfócitos estão diretamente envolvidos na resposta imune contra a *Leishmania* sp, fato que explica a correlação dessas células com o parasito (VALLI, 2007a; ORAZI et al., 2006; VALLI, 2002; VIRELLA; BIERER, 2001).

O número de linfócitos na medula óssea apresentou correlação positiva com a quantidade de linfócitos no sangue periférico nos cães infectados. Esta observação pode indicar a migração de linfócitos, tanto para tecidos acometidos pelo protozoário, quanto para órgãos linfóides secundários.

Ainda, com respeito às células do sangue, neste estudo foi observada monocitose significativa nos animais com LV em relação ao grupo não infectado. Quanto a esse aspecto, há uma controvérsia entre os autores, que citam desde monocitopenia nos cães infectados (Abreu et al (2011), Coura-Vital et al (2011), Ciarlini et al (2010) e Guerra et al. (2009), a nenhuma alteração nos valores, como Freitas et al. (2012) e Dias (2008). De acordo com Reis et al, (2006a), a monocitose

em cães com LV pode estar relacionada com a proliferação destas células na medula óssea, decorrente da tentativa para conter a intensa densidade parasitária em diversos órgãos. Estes dados podem sugerir que o recrutamento de macrófagos para tecidos linfoides secundários, que ocorre durante a doença ativa.

Os animais infectados apresentaram quantidade significativamente maior de células imunomarcadas para TNF- $\alpha$ , em relação ao grupo não infectado. Esse achado concorda com os de Alves et al. (2009) que, por meio de PCR *real time*, observaram uma grande quantidade de TNF- $\alpha$  em linfonodos de cães infectados. Contrariamente, Trinchieri (2003) observou que a produção de TNF- $\alpha$  é suprimida durante a infecção pela *Leishmania* sp.

A expressiva quantidade de células imunomarcadas pelo TNF- $\alpha$  pelos cães infectados deste trabalho pode indicar um acúmulo de macrófagos M1 e M2 na medula óssea, com resposta mista do tipo Th1 e Th2. O TNF- $\alpha$  é produzido, durante uma infecção, por linfócitos Th1 e macrófagos ativados e tem a função de destruir os amastigotas intracelulares (BARBIÉRI, 2006; SQUIRES, 2004; PLORDE, 2004; FALCOW, 2004, PINELLI, 2000). Além de ter um papel regulador na hematopoiese, sendo produzido normalmente pelas células do estroma (WU et al., 2005), Lafuse et al. (2013) descreveram que o TNF- $\alpha$  promove aumento da quantidade de colônias formadoras de eritrócitos, enquanto Baldrige et al. (2011) supõe que o TNF- $\alpha$  possa estimular as células tronco hematopoiéticas em uma infecção aguda e suprimir sua produção em uma infecção crônica.

Cools et al. (2007) afirmaram que células progenitoras e precursoras mieloides produzem TNF- $\alpha$  em resposta a uma inflamação, portanto os animais infectados do

presente estudo podem ter apresentado um aumento dessa citocina proveniente de células mieloides, e não de macrófagos ou linfócitos.

A expressão positiva de anti-CD3 nos linfócitos T observada na biopsia de medula óssea mostrou diferença entre os cães infectados e não infectados. De acordo com Tizard (2009), o complexo de proteínas CD3 é responsável pela transdução do sinal de ativação do linfócito. A maior imunodeteção neste trabalho pode indicar uma maior ativação dos linfócitos T.

No presente estudo, a marcação de MHC de classe II foi citoplasmática e não de membrana celular, sugerindo uma função ineficiente deste complexo. Poucos macrófagos imunomarcados para MHC II foram observados nas áreas contendo granulomas e houve diferença significativa entre o grupo infectado em relação ao grupo não infectado. A maior imunodeteção de MHC de classe II no citoplasma aliada à carga parasitária no grupo de cães com LV, sugerem um efeito que beneficia o parasito.

Tanto as células inflamatórias da medula óssea como também os precursores imaturos das linhagens hematopoiéticas apresentaram imunomarcção para MHC II. Ryley et al (2009) relataram que os precursores mieloides na medula óssea expressam MHC de classe II em sua membrana.

A IL-10 foi detectada por imuno-histoquímica na membrana de linfócitos e macrófagos, bem como, se observou diferença significativa entre os grupos de cães. Achado que concorda com os de Pinelli et al. (1999), que descreveram uma alta expressão de IL-10 em cães infectados. Alves et al. (2009) e Corrêa et al. (2007) descreveram o efeito da supressão da atividade de macrófagos pela IL-10.

Correlação negativa foi observada entre a quantidade de células imunomarcadas para IL-10 e a quantidade de macrófagos na medula óssea dos cães infectados deste trabalho. A IL-10 desempenha um papel fundamental na inibição da ativação macrofágica, e contribui para a multiplicação do parasito nas lesões (CARRERA, 1996). Fiorentino (et al., 1989) e D'Andrea et al. (1993) afirmaram que a IL-10 inibe a síntese de citocinas do tipo Th1 por macrófagos, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-12. A IL-10 foi incriminada, por Bhattacharya; Ali (2013), como a principal citocina responsável pela patogenia da leishmaniose visceral.

Foi constatada correlação entre IL10 e TGF- $\beta$  nos cães infectados, sugerindo um favorecimento da multiplicação do parasito. Segundo Bogdan (1994), o parasito promove a síntese das duas citocinas, sendo que a produção de IL-10 é estimulada pelo TGF- $\beta$  (OMER et al., 2000). Olivier et al. (2005) apontaram as duas citocinas como responsáveis pela supressão da produção de NO pelos macrófagos.

A detecção de TGF- $\beta$  diferiu significativamente entre os grupos de cães infectados e não infectados. Gannt et al. (2003) observaram na medula óssea de pessoas com LV, um aumento significativo de células imunomarcadas para TGF- $\beta$ , por meio da técnica de imuno-histoquímica. O TGF- $\beta$  está envolvido tanto positiva quanto negativamente na diferenciação e proliferação celular, na resposta imune e nos mecanismos de apoptose. Em grandes quantidades, provoca imunossupressão, inibe a resposta do tipo Th1 e estimula resposta do tipo Th 2 (OMER et al., 2000; BARRAL-NETTO et al., 1992). As células apoptóticas também estimulam a liberação de TGF-  $\beta$  (DAS et al., 2013).

Neste trabalho, a média da quantidade de células eritroides da medula óssea foi menor nos cães infectados, em relação aos não infectados, o que pode estar relacionado ao acúmulo TGF- $\beta$  e a IL-10, que estariam interferindo com a eritropoiese. Segundo Zermati (2000) e Oehler et al. (1999), essas citocinas inibem a eritropoiese.

De acordo com Barral-Netto et al. (1992), sob condições normais, TGF- $\beta$  é liberado pelas células da medula óssea e se mantém em uma forma latente na matriz extracelular, sendo ativado pela ação das proteases liberadas pela *Leishmania* sp. Gannt et al. (2003) e Barral et al. (1993) afirmaram que, tanto em cultura de células, quanto *in vivo*, o parasito e seus metabólitos podem ativar o TGF- $\beta$  latente, prolongando, dessa maneira, a sobrevivência dos amastigotas no citoplasma dos macrófagos. Essas afirmações confirmam os achados deste trabalho, que também observou a marcação para TGF- $\beta$  no interstício da medula óssea.

Das et al. (2012) e Barral-Netto et al. (1992) afirmaram que a indução da produção de TGF- $\beta$  é um importante mecanismo utilizado pela *Leishmania* sp para evitar a sua destruição pelos macrófagos. Esta citocina também inibe a produção e liberação de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  por macrófagos (DAS et al., 2013; OMER et al., 2000) e níveis elevados de IL-10 e TGF- $\beta$  provocam a irresponsividade das células ao IFN- $\gamma$  (BARRAL et al., 1993; BARRAL-NETTO et al., 1992).

Os animais infectados apresentaram correlação negativa entre o número de células imunomarcadas para IFN- $\gamma$  e a quantidade de *Leishmania* sp. De acordo com Wolfe et al. (1991), a infecção dos macrófagos pelo parasito prejudica a habilidade dessas células suprirem citocinas regulatórias para aumentar a produção de IFN- $\gamma$ , que segundo Belosevic et al (1986), é a citocina mais potente para a

indução de resposta contra a *Leishmania* sp. Essa interação favorece a sobrevivência do parasito no hospedeiro.

Baldrige et al. (2011) afirmaram que as células tronco hematopoiéticas são inibidas pelo IFN- $\gamma$ , incriminado como o maior responsável pela falência da medula óssea. Katigawa et al. (1997) referiram que, assim como o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$  também está associado à dismielopoiese, já que ambas tem papel principal na regulação das células tronco hematopoiéticas. Zhao et al. (2010) afirmaram que o IFN- $\gamma$  em alta quantidade está envolvido no aumento da mielopoiese. Kitagawa et al. (1997) afirmaram que o IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  estão diretamente ligados ao desenvolvimento da dismielopoiese. Acredita-se que tenham um papel regulatório das células tronco da medula óssea frente a infecções (BALDRIDGE et al., 2011).

O parasito altera o microambiente da medula óssea a seu favor (GANNT et al., 2003), pois durante a infecção, ocorre uma intrincada estimulação da produção de citocinas, da expressão de moléculas e da ativação de células do sistema imune, eventos que permitem que o parasito viva por longos períodos dentro de macrófagos (OLIVIER et al., 2005). Um aumento na produção das citocinas do tipo Th1 e Th2, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e IL-10, pode ter provocado a displasia da série granulocítica e megacariocítica nos cães com LV. A expressão inadequada do MHC de classe II pode contribuir para que os antígenos do parasito não sejam adequadamente apresentados pelo macrófago ao linfócito, então, dessa maneira, não há vantagem nos animais infectados apresentarem um maior número de linfócitos. As alterações observadas no sangue periférico dos cães infectados, como linfocitose e monocitose, podem ser um reflexo do aumento dessas células na

medula óssea, tanto para combaterem o parasito localmente, quanto para enviar a outros órgãos infectados.

## 7. CONCLUSÕES

Os cães infectados apresentaram anemia, porém a linhagem eritroide na medula óssea não foi afetada pela *Leishmania* sp, qualitativa ou quantitativamente.

Nos animais com LV, a linfocitose observada na medula óssea se refletiu no sangue.

Os cães infectados apresentaram displasia granulocítica e megacariocítica, além de granulomas na medula óssea.

Os pontos brancos observados no exame macroscópico da medula óssea dos cães infectados correspondem aos granulomas constatados à microscopia.

Os animais com LV apresentaram grande infiltração de linfócitos e macrófagos na medula óssea, observada no exame citológico e comprovada com a expressiva imunomarcção dessas células.

Os cães infectados demonstraram maior imunomarcção para TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 na medula óssea.

## 8. INFERÊNCIAS

A imunomarcção para de IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  na medula óssea pode ter sido responsável pela displasia granulocítica e megacariocítica e pelos granulomas na medula óssea dos cães infectados.

A imunodeteção de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 na medula óssea pode indicar um acúmulo de macrófagos M1 e M2 na medula óssea, com resposta mista do tipo Th1 e Th2.

A marcação citoplasmática de MHC II sugere uma função ineficiente deste complexo.

A correlação dos linfócitos da medula óssea com os do sangue periférico pode indicar a migração desse tipo celular para tecidos infectados pelo protozoário, bem como para órgãos linfóides secundários.

A menor média da quantidade de células eritroides da medula óssea nos cães infectados pode estar relacionada ao acúmulo TGF- $\beta$  e a IL-10, que estariam interferindo com a eritropoiese.

## 9. REFERÊNCIAS

ABREU, R.T.; CARVALHO, M.G.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; COURA-VITAL, W.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **PLoS One**, v.6, n.5, e18873, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0018873.

ABREU, R.T. Myelopoiesis and erythropoiesis in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 128, 2009. p.299.

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; CUPOLILO, S.M.N.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; GONÇALVES DA COSTA, S.C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, v.121, p.179–187, 2004.

ALEXANDRE-PIRES, G.; BRITO, M.T.V.; ALGUERÓ, C.; MARTINS, C.; RODRIGUES, O.R.; FONSECA, I.P.; SANTOS-GOMES, G. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.137, p.275-283, 2010.

ALVES, C.F.; AMORIM, I.F.G.; MOURA, E.P.; RIBEIRO, R.R.; ALVES, C.F.; MICHALICKA, M.S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W.L.; TEIXEIRA, M.T.; MELO, M.N. Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, p.349–358, 2009. doi:10.1016/j.vetimm.2008.11.020.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ, F.; TESOURO, M.A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. **European Journal of Epidemiology**, v.18, p.147–156, 2003.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v.31, p.109-118, 2012. DOI: 10.1007/s10096-011-1276-0.

BARBIÉRI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v.28, p.329-337, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-3024.2006.00840.x.

BALDRIDGE, M.T.; KING, K.Y.; GOODELL, M.A. Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. **Trends in Immunology**, v.32, n.2, p.57–65, 2011. doi:10.1016/j.it.2010.12.003.

BANDARRA, M.B. **Análise da composição celular e imunodeteção de mif em linfonodos de cães com leishmaniose visceral.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). UNESP, Jaboticabal. 2010.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. Transforming growth factor f8 as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 3442-3446, 1993.

BARRAL-NETTO, M., A. BARRAL, C. E. BROWNELL, Y. A. W. SKEIKY, L. R. ELLINGSWORTH, D. R. TWARDZIK, AND S. G. REED. Transforming growth factor- $\beta$  in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v.12, p.257:545, 1992.

BARROUIN-MELO, S. M. ; SANTOS, S. O. ; CHAGAS-JUNIOR, A. D. ; DOS-SANTOS, W.L.C. ; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.. A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: Assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.111, p.251-261, 2006.

BARTLETT, M.S. Multivariate analysis. **Journal of Royal Statistic Society**, Serie B, v.9, p.176-197, London, 1947.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n.2, p.128-34, 2013.

BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; VAN DER MEIDE, P.; SLAYTER, M.V.; NACY, C.A. Administration of monoclonal anti-interferon gamma antibody *in vivo* abrogates natural resistance to C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. **Journal of Immunology**, v.143, p.266-274, 1989.

BHATIA, P.; HALDAR, D.; VARMA, N.; MARWAHA, R.K.; VARMA, S. A case series highlighting the relative frequencies of the common, uncommon and atypical/unusual hematological findings on bone marrow examination in cases of visceral leishmaniasis. **Mediterr Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v.3, 2011.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today**, v.15, n.1, 1999.

BOGDAN, C.; NATHAN, C. Modulation of macrophage function by trans-forming growth factor  $\beta$ , interleukin-4, and interleukin-10. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.34, p.685-713, 1993.

BRANDONISIO, O.; PANUNZIO, M.; FALIERO, S.M.; CECI, L.; FASANELLA, A.; PUCCINI, V. Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in

*Leishmania infantum* – infected dogs. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.53, p.95-103, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 122 p.

BROXMEYER, H.E.; WILLIAMS, D.E. The production of myeloid blood cells and their regulation during health and disease. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v.8, n.3, p.173-226, 1998.

CAR, B.D. The hematopoietic system. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Shalm's veterinary hematology**. Wiley Blackwell, Iowa. Cap 5. 6<sup>th</sup> ed, p.27-35, 2010.

CARRERA, L.; GAZZINELLI, R.T.; BADOLATO, R.; HIENY, S.; MFILLERFL, W.; KÜHN, R.; SACKS, D.L. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.183, p.515-526, 1996.

CIARLINI, P.C.; VALADARES, T.C.; IKEDA-GARCIA, F.A.; MARCONDES, M.; LIMA, V.M.F. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.11, n.2, p.369-375, 2010. DOI 10.526/cab.v11i2.2149.

COOLS, N.; PONSAERTS, P.; VAN TENDELOO, V.F.I.; BERNEMAN, Z.N. Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *Journal of Leukocyte Biology*, v.82, p.1365-74, 2007. DOI: 0741-5400/07/0082-1365.

CORRÊA, E.A. **Aspectos epidemiológicos e clinic-laboratoriais da leishmaniose tegumentar Americana nos subespaços 07 e 08 no Estado de Rondônia – Brasil**. Mestrado em Ciências da Saúde. UNB. 2007. 98 p.

COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; GONTIJO, N.F.; MICHALICK, M.S.M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v.174, p.636–643, 2007.

COTTERELL, S.E.J.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, n.4, p.1840-1848, 2000a.

COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. *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, 2000b.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MOREIRA, N.D.; VITORIANO-SOUZA, J.; VIEIRA, P.M.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, M. REIS, A.B. Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. **The Veterinary Journal**, v.190, p.43–47, 2011. DOI:10.1016/j.tvjl.2011.04.005.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon  $\gamma$  production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v.178, p.1041-1048, 1993.

DANTAS-TORRES, F. Ticks as vectors of *Leishmania* parasites. **Trends in Parasitology**, v.27, n.4, p.155-159, 2011. DOI:10.1016/j.pt.2010.12.006.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the laws of nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, p.117-118, 2006.

DAS, R.; XU, X.; QUAN, X.; NGUYEN, T.T.; KONG, I.D.; CHUNG, C.H.; LEE, E.Y.; CHA, S.K.; PARK, K.S. Upregulation of mitochondrial Nox4 mediates TGF- $\beta$ -induced apoptosis in cultured mouse podocytes. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v.4, n.8, 2013. DOI: 10.1152/ajprenal.00438.2013.

DIAS, C.A. **Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados no Distrito Federal**. Mestrado em Saúde Animal. UNB. 2008. 82 p.

DIAZ, S.; FONSECA, I.P.; RODRIGUES, A.; MARTINSC, C.; CARTAXEIRO, C.; SILVA, M.J.; BRITO, T.V.; ALEXANDRE-PIRES, G.; SANTOS-GOMES, G.M. Canine leishmaniosis. Modulation of macrophage/lymphocyte interactions by *L. infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.189, p.137-144, 2012.

ELMORE, S. Enhanced histopathology of the bone marrow. **Toxicologic Pathology**, v.34, p.666-686, 2006. DOI: 10.1080/01926230600939971.

FALCOW, S. Host-parasite relationships. In: RYAN, K.J.; RAY, C.G. (editors). **Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases**. Mcgraw-Hill, New York, 4ed., 2004, p.149-172. DOI: 10.1036/0838585299.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

FERREIRA, M.G.P.A.; FATTORI, K.R.; SOUZA, F.; LIMA, V.M.F. Potential role for dog fleas in the cycle of *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.150–154, 2009.

FIORENTINO, D.F.; BOND, M.W.; MOSMANN, T.R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **The Journal of Experimental Medicine** v.170, p.2081-2090, 1989.

II Fórum de Discussão sobre o Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina. Brasília, 2009. Disponível em <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii\\_forum\\_tratamento\\_relatorio\\_final.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ii_forum_tratamento_relatorio_final.pdf)> Consulta em 12 de agosto de 2013.

FREITAS, J.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; LOPES NETO, B.E.; SANTOS, G.J.L.; ABREU, C.R.A.; BRAGA, R.R.; CAMPOS, R.A.; OLIVEIRA, L.F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.1, p.24-29, 2012.

GANTT, K.R.; SCHULTZ-CHERRY, S.; RODRIGUEZ, N.; JERONIMO, S.M.B.; NASCIMENTO, E.T.; GOLDMAN, T.L.; RECKER, T.J.; MILLER, M.A.; WILSON, M.E. Activation of TGF- $\beta$  by *Leishmania chagasi*: importance for parasite survival in macrophages. **The Journal of Immunology**, v.170, p.2613-2620, 2003.

GAVGANI, A.S.; MOHITE, H.; EDRISSIAN, G.H.; MOHEBALI, M.; DAVIES, C.R. Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.67, p.511–515, 2002.

GINN, P.E.; MENSETT, J.E.K.L.; RAKICH, P.M. Skin and appendages. In: MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy, Palmer's Pathology of domestic animals**. 5<sup>th</sup> ed. San Diego, CA: Academic Press, 2007. p. 553-781.

GIUNCHETTI, R.G.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; MARQUES, M.; TAFURI, W.L.; REIS, A.B. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.269–277, 2008.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medicine Biology Research**, v.37, n.4, p. 615-623, 2004.

GRINDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPPERI, T.A. Cytology of bone marrow **Veterinary Clinics of Small Animal**, v.32, p.1313–1374, 2002.

GUERRA, L.L.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; REIS, A.B.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v.104, p.611–622, 2009. DOI 10.1007/s00436-008-1237-4.

HARVEY, J.W. **Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals**. W.B. Saunders. 2001. 288p.

HUSSELL, T.; CAVANAGH, M.; WISSINGER, E.; FINDLAY, E.G.; Chap 9. Lymphocytes. Ed: SERHAN, C.N.; WARD, P.A.; GILROY, D.W. **Fundamentals of inflammation**. Cambridge University Press. 2010. 107-125.

IKEDA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E.; LUVIZOTTO, M.C.R.; LIMA, V.M.F. 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, 2002.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Lea & Febiger. Philadelphia. 1993. 417 p.

JAYAKUMAR, A.; WIDENMAIER, R.; MA, X.; MCDOWELL, M.A. Transcriptional inhibition of interleukin-12 promoter activity in *Leishmania* spp.- infected macrophages. **Journal of Parasitology**, v.94, n.1, p.84–93, 2008.

KAMIR, D.; ZIEROV, S.; LENG, L.; CHO, Y.; DIAZ, Y.; GRIFFITH, J.; MCDONALD, C.; MERK, M.; MITCHELL, R. A.; TRENT, J.; CHEN, Y.; KWONG, Y. K. A.; XIONG, H.; VERMEIRE, J.; CAPPELO, M.; MCMAHON-PRATT, D.; WALKER, J.; BERNHAGEN, J.; LOLIS, E.; BUCALA, R. A. leishmania ortholog of Macrophage Migration Inhibitory Factor modulates host macrophage responses. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.180, n.12, p.8250-8261, 2008.

KAYE, P.M.; ROGERS, N.J.; CURRY, A.J.; SCOTT, J.C. Deficient expression of costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. **European Journal of Immunology**, v.24, p.2850-4, 1994.

KITAGAWA M, et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) -alpha and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v.11, n.2, p.2049–2054, 1997.

KOUTINAS, A.F.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKISA, M.E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.98, p.247–261, 2001.

KOPTERIDES, P.; HALIKIAS, S.; TSAVARIS, N. Visceral leishmaniasis masquerading as myelodysplasia. **American Journal of Hematology**, v.74, p.198-199, 2003.

LAFUSE, W.P.; STORY, R.; MAHYLIS, J.; GUPTA, G.; VARIKUTI, S.; STEINKAMP, H.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A.R. *Leishmania donovani* infection induces anemia in hamsters by differentially altering erythropoiesis in bone marrow and spleen. **PLoS ONE**, v.8, n.3, e59509, 2013. DOI:10.1371/journal.pone.0059509.

LAGE, R.S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U.; GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA- OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.115, p.135–145, 2007.

LASHLEY, F.R.; DURHAM, J.D. **Emerging infectious diseases trends and issues**. 2<sup>nd</sup> ed. Springer Publishing Company. 2007, 591 p.

LEE, K.P. Emperipolesis of hematopoietic cells within megakaryocytes in bone marrow of the rat. **Veterinary Pathology**, v.26, p.473-478, 1989. DOI: 10.1177/030098588902600603.

LINCH, D.C. Bone marrow and hematopoiesis. **Encyclopedia of Immunology**. 1998. 374-376.

MAHAJAN V.; MARWAHA R.K. Immune mediated hemolysis in visceral leishmaniasis. **J. Trop. Pediatrics**, v.53, n.4, p.284-286, 2007.

MANNA, L.; REALE, S.; VIOLA, E.; VITALE, F.; MANZILLO, V.F.; MICHELE, L.P.; CARACAPPA, S.; GRAVINO, A.E. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.142, p.271–280, 2006.

MANZILLO, V.F.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A.; GRADONI, L.; OLIVA, G. Pathological changes in the bone marrow of dogs with leishmaniosis. **The Veterinary Record**, v.158, p.690-694, 2006.

MARTIN-SANCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUNOZ-PEREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MARQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.145, p.267-273, 2007.

MEDEIROS, C.M.O.; MELO, A.C.C.; LIMA, A.K.F.; SILVA, I.N.G.; OLIVEIRA, L.C.; SILVA, M.C. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v.18, n.1, p.43-50, 2008.

MEINKOTH, J.H.; COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MORTON, R.J. Sample collection and preparation. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. Mosby. 3<sup>rd</sup> ed. 1-19. 2009.

MELBY, P.C. Experimental leishmaniasis in humans: review. **Review in Infectious Diseases**, v.13, p.1009–1017, 1991.

MYLONAKIS, M.E. PAPAIOANNOU, N.; SARIDOMICHELAKIS, M.M.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.3, p.243–247, 2005.

MISCHKE, R.; BUSSE, L. Reference values for the bone marrow aspirates in adult dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.49, p.499-502, 2002.

JOHNW. J. MOORE, J.W.J.; MOYO, D.; BEATTIE, L.; ANDREWS, P.S.; TIMMIS, J.; KAYE, P.M. Functional complexity of the *Leishmania* granuloma and the potential of in silico modeling. **Frontiers in immunology**, v.4, art. 35, p.1-7, 2013. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00035.

MORCEAU, F.; DICATO, M.; DIECHERICH, M. Pro-inflammatory cytokine-mediated anemia: Regarding molecular mechanisms of erythropoiesis. **Mediators of Inflammation**, 405016. 2009.

MOREIRA, P.R.R.; BANDARRA, M.B.;MAGALHÃES, G.M.; MUNARI, D.P.; PRANDINI, M.M.; ALESSI, A.C.; VASCONCELOS, R.O. Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.192, p.149-157, 2013.

MÜLLER, N.; WELLE, M.; LOBSIGER, L.; STOFFEL, M.H.; BOGHENBOR, K.K.; HILBEE, M.; GOTTSTEINA, B.; FREYA, C.F.; GEYER, C.; BOMHARD, W. Occurrence of *Leishmania* sp. in cutaneous lesions of horses in central Europe. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.166, p.346–351, 2009.

MURRAY, H.W.; JUNGBLUTH, A.; RITTER, E.; MONTELIBANO, C.; MARINO, M.W. Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. **Infection Immunity**, v.68, p.6289–6293, 2000.

NATAMI, A.; SAHIBI, H.; LASRI, S.; BOUDOUMA, M.; GUESSOUSS-IDRRISSI, N.; RHALEM, A. Serological, clinical and histopathological changes in naturally infected dogs with *Leishmania infantum* in the Khemisset province, Morocco. **Veterinary Research**, v.31, p.355–363, 2000.

NATHAN, C.; SHILOH, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, p.8841-8848, 2000.

OEHLER L, KOLLARS M, BOHLE B, BERER A, Reiter E, et al. (1999) Interleukin-10 inhibits burst-forming unit-erythroid growth by suppression of endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production from T cells. **Experimental Hematology** 27: 217–223.

OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion mechanism by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.2, p.293, 2005. DOI: 10.1128/CMR.18.2.293-305.2005.

OMER, F.M.; KURTZHALS, J.A.L.; RILEY, E.M. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF- $\beta$ ? **Parasitology Today**, v.16, n.1, p.18-23, 2000.

ORAZI, A.; O'MALLEY, D.; ARBER, A. **Illustrated pathology of the bone marrow**. Cambridge University press, Cambridge. 2006.

PALUDO, G.R, AQUINO, L.C. LOPES, B.C.C. Laboratory findings in canine visceral leishmaniasis In Brasília, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v.36, p.382-398, 2007.

PAPARCONE, R.; FIORENTINO, E.; CAPPIELLO, S.; GIZZARELLI, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; MANZILLO, V.F. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: a practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. **Journal of Veterinary Medicine**, Article ID 217314, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/217314>

PINELLI, E.; RUTTEN, V.P.; BRUYSTERS, M.; MOORE, P.F.; RUITENBERG, E.J. Compensation for decreased expression of B7 molecules on *Leishmania infantum* infected canine macrophages results in restoration of parasite-specific T cell proliferation and gamma interferon production. **Infection and Immunity**, v.67, p.237–243, 2000.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S.Y.; SLAPPENDEL, R.; FRAGIO, C.; RUITENBERG, E.J.; BERNARDINE, W.; RUTTEN, V.P.M.G. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.69, p.121-126, 1999.

PINELLI, E.; ELLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, p.229–235, 1994.

PLORDE, J.J. Flagelattes. In: RYAN, K.J.; RAY, C.G. (editors). **Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases**. Mcgraw-Hill. 2004. 741-762. 4th ed.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A.; DAY, M.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C.; KAYE, P.M. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.1421-4, 2001.

RADIN, M.J.; WELLMAN, M.L. Granulopoiesis. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. Wiley Blackwell, Iowa. Cap 4. 6<sup>th</sup> ed, p.43-49, 2010.

RAI, A.K.; THAKUR, C.P.; SINGH, A.; SETH, T.; SRIVASTAVA, S.K.; SINGH, P.; MITRA, D.K. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of

human visceral leishmaniasis. **PLoS ONE**, v.7, n.2, e31551. doi:10.1371/journal.pone.0031551.

RASKIN,R.E.; MESSICK, J.B. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.42, p.23-42, 2012. doi:10.1016/j.cvsm.2011.10.001.

RASKIN R.E. Myelopoiesis and myeloproliferative disorders. **Veterinary Clinics North America Small Animal Practice**, v.26, n.5, p.1023-42, 1996.

REHG, J.; BUSH, D.; WARD, J. The utility of immunohistochemistry for the identification of hematopoietic and lymphoid cells in normal tissues and interpretation of proliferative and inflammatory lesions of mice and rats. **Toxicologic Pathology**, v.40, p.345-374, 2012. DOI: 10.1177/0192623311430695

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARVALHO, A.T.; GIUNCHETTI, R.C.; CARNEIRO, C.M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W.L.; OLIVEIRA, R.C. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.128, p.87–95, 2009.

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. Parasite density and impaired biochemical/ hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.81, p.68-75, 2006a.

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. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology Immunopathology**, Amsterdam, v.112, p.102-116, 2006b.

REIS, A. **Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cães naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção**. Tese. UFMG. 176 p. 2001.

RILEY, R.S.; WILLIAMS, D.; ROSS, M.; ZHAO, S.; CHESNEY, A.; CLARK, B.D.; BEN-EZRA, J.B. Bone marrow aspirate and biopsy: a pathologist's perspective. II. Interpretation of the bone marrow aspirate and biopsy. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.23, p.259-307, 2009.

RIZZI, T.E.; MEINKOTH, J.H.; CLINKENBEARD, K.D. Normal hematology of the dog. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. Wiley Blackwell, Iowa. Cap 104. 6<sup>th</sup> ed, p.799-810, 2010.

SABLE, M.N.; SEHGAL, K.; GADAGE, G.S.; SUBRAMANIAN, P.G.; GUJRAL, S. Megacaryocytic emperipolesis: a histological finding in myelodysplastic syndrome. **The Veterinary Journal**, v.174, p.636–643, 2007.

SANTIAGO, M.E.B. **Investigação de *Leishmania sp* em *Didelphis spp.* (Linnaeus, 1756) na cidade de Bauru – São Paulo**. Phd. Dissertação, Universidade Estadual Paulista. São Paulo. 62 p. 2007.

SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, n.1, p.82–86, 2005.

SEN, G.; MUKHOPADHYAY, R.; GHOSAL, J.; BISWAS, T. Oxidative damage of erythrocytes: a possible mechanism for premature hemolysis in experimental visceral leishmaniasis in hamsters. **Annals of Hematology**, v.80, p. 32–3, 2001.

SHARLEY, L.S.; HILL, S.A. Structure of bone marrow. In: WEISS, D.J.; WARDROP, J.K. (Editors). **Schalm's Veterinary Hematology**. 6th ed. Wiley-Blackwell. Chap 2. p.8-13, 2006.

SHAW, J.J. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of american visceral leishmaniasis. **Memorial do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, n.5, p.577-579, 2006.

SILVA, S.M. **Avaliação clínica e laboratorial de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha & Chagas, 1937), submetidos a um protocolo terapêutico em clínica veterinária de Belo Horizonte**. Dissertação Universidade Federal de Minas Gerais. 2007. 119 p.

SPERLING, A.I.; BLUESTONE, J.A. The complexities of T-cell co-stimulation: CD28 and beyond. **Immunology Review**, v.153, p155-182, 1996.

ST LOUIS, J.D.; LEDERER, J.A.; LICHTMAN, A.H. Costimulator deficient antigen presentation by an endothelial cell line induces a nonproliferative T cell activation response without anergy. **The Journal of Experimental Medicine**, v.178, p.1597-1605, 1993.

SPÄTH, G.F.; SCHLESINGER, P.; SCHREIBER, R.; BEVERLEY, S.M. A novel role for Stat1 in phagosome acidification and natural host resistance to intracellular infection by *Leishmania major*. **PLoS Pathogen**, v.5, n.4, p.1-9, 2009.

SQUIRES, R.A. Host-pathogen interactions. In: In: DUNLOP, R.H., MALBERT, C.H. **Veterinary Pathophysiology**. Blackwell Publishing: Iowa, cap. 3, p.79-110, 2004.

SUFFIA, I.; RECKLING, S.K.; SALAY, G.; BELKAID, Y. A role of CD103 in the retention of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg and control of *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology**, v.174: 5444-5455, 2005.

TAFURI, Wg.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N. MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v.292, p.17-23, 2004.

TAFURI, W.L.; DE OLIVEIRA, M.R.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case report from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.3, p.203–212, 2001.

TESH, R.D. Ecological sources of zoonotic diseases. In: BURROUGHS, T.; KNOBLER, S.; LEDERBERG, J. (Editors). **The emergence of zoonotic diseases: understanding the impact on animal and human health**. National Academy Press. 2002. p.40-47.

TESTA, U. Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. **Leukemia** 18: 1176–1199, 2004.

TIZARD, I. **Introducción a la inmunología veterinaria**. 8. Ed. Elsevier, Barcelona. 2009.

TOPLU, N.; AYDOGAN, A. An immunohistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v.109, p.1051-1057, 2011. DOI 10.1007/s00436-011-2345-0.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews / Immunology**, v.3, p.133-146, 2003.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. **Blood**, v.84, p.4008-27, 1994.

VALDEZ, R.; ZUTTER, M. FLOREA, A.D.; RUBIN, R. Hematopathology. Chap 20. p.947-1036. In: RUBIN, F. STRAYER, D.S. (editores). **Rubin's Pathology: Clinicopathologic foundations of medicine**. 6<sup>th</sup> Ed. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia. 2012.

VALLI, V.E. **Veterinary comparative hematopathology**. Blackwell Publishing. Ames, 558 p. 2007a.

VALLI, V.E. Hematopoietic system. In: MAXIE, M.G. **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals**. 5 ed., vol. 3, cap. 2, p.107-324, 2007b.

VALLI, V.E.; MCGRATH, J.P.; CHU, I. Hematopoietic system. In: HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G.; WALLIG, M.A. (eds). **Handbook of Toxicologic Pathology**, p.666–72. Academic Press, San Diego, CA. 2002.

VIADANNA, P.H.O.; MEDEIROS, A.A.; SZABÓ, M.J.P.; MUNDIM, A.V.; SOARES, N.P.; LIMONGI, J.E.; PAULA, M.B.C. Relationship between blood-borne parameters and gross lesions in *Leishmania chagasi* seroreagents dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.4, n.3, p,207-213, 2011.

VIRELLA, G. Infections and immunity In: VIRELLA, G. (editor) **Medical Immunology**. 5th ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 2001, p.259-278.

VIRELLA, G.; BIERER, B.E. The induction of an immune response: antigens, Lymphocytes, and accessory cells. In: VIRELLA, G. (editor) **Medical Immunology**. 5th ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 2001, p. 51-76.

WEISER, W.Y.; POZZI, L.M.; DAVID, J.R. Human recombinant migration inhibitory factor activates human macrophages to kill *Leishmania donovani*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v.147, n.6, p.2006-2011, 2006.

WEISS, D.J. Myelodysplastic syndromes. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. Wiley Blackwell, Iowa. Cap 66. 6<sup>th</sup> ed, p.467-474, 2010.

WEISS, D.J.; SOUZA, C.D. Monocytes and macrophages and their disorders. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's veterinary hematology**. 6<sup>th</sup> ed. Chap 45. P298-306. Willey-Blackwell. Iowa. 2010.

WEISS, D.J.; TVEDTEN, H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**. 4<sup>th</sup> ed. Elsevier. 2004. Saint Louis. 432 p.

WEISS, D.J.; AIRD, B. Cytologic evaluation of primary and secondary myelodysplastic syndromes in the dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v.30, p.67-75, 2001.

WEISS D.J.; SMITH, S.A. Primary myelodysplastic syndromes of dogs: a report of 12 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.14, p.491-4, 2000.

WHO. Visceral leishmaniasis elimination. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/bl10-business-plan.pdf>>. Acesso em 09/ago/2013.

WOLFE, S.F.; TEMPLE, P.A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, R.; FITZ, L.; FERENZ, C.; HEWICK, R.M. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **The Journal of Immunology**, v.146, p.3074-3081, 1991.

WU, S.; KORTE, A.; KEBELMANN-BETZING, C.; GESSNER, R.; HENZE, G.; SEEGER, K. Interaction of bone marrow stromal cells with lymphoblasts and effects of prednisolone on cytokine expression. **Leukemia Research**, v.29, p.63–72, 2005.

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.994-1000, 2006.

ZERMATI Y, FICHSELSON S, VALENSI F, FREYSSINIER JM, ROUYER-FESSARD P.; Cramer, E.; Guichard, J.; Varet, B.; Hermine, O. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking pro-liferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. **Experimental Hematology**, v.28, p.885–894, 2000.

ZHAO X, REN G, LIANG L, AI PZ, ZHENG B. Brief Report: Interferon induces expansion of LinSca-1+C-Kit+cells. **Stem Cells**, v,28, p.122–126, 2010.



## 9. ANEXOS

## ANEXO A - HEMOGRAMA DOS ANIMAIS AVALIADOS

Animal	Eritrocitos	Hemoglobina	Hematócrito	RDW	VCM	CHCM	Leucócitos	Metamielócitos	Bastonete	Segmentado	Linfócito
INFECTADOS	10 <sup>6</sup> /μl	g/dl	%	%	fL	%	x10 <sup>3</sup> /μL	//μL	//μL	//μL	//μL
1	1,65	4,1	12	13,3	72,73	34,17	4,3	0	0	3956	258
2	1,75	3,8	12	18,6	68,57	31,67	19,9	0	0	9552	9154
3	4,25	9,9	30	15,6	70,59	33,00	32,5	0	0	16087	14950
4	3,86	7,9	24	16,8	62,18	32,92	11,3	0	0	8136	904
5	1,42	3,6	11	16,1	77,46	32,73	15,7	0	0	14130	628
6	5,32	11	33	16,5	62,03	33,33	15,4	0	0	10934	2464
7	5,34	12	36	14,1	67,42	33,33	12,5	0	0	6500	5250
8	3,62	9	29	16,4	80,11	31,03	5	0	0	3500	1100
9	0,82	2,2	6	13,5	73,17	36,67	3,6	0	0	2484	720
10	1,99	3,8	11	17,9	55,28	34,55	7,6	0	0	5700	1064
11	4,68	10,8	32	14,9	68,38	33,75	26,6	0	266	24206	266
12	3,66	8,1	24	15	65,57	33,75	9,6	0	0	7392	1344
13	4,4	10,8	31	13,5	70,45	34,84	6,7	0	0	3886	2546
14	2,19	5,4	16	13,5	73,06	33,75	6,4	0	0	4608	832
15	2,24	5,3	15	14,1	66,96	35,33	17,6	0	0	15488	1584
16	2,98	6,8	20	16,1	67,11	34,00	3,3	0	0	1856	896
17	3,47	8,2	23	16,8	66,28	35,65	4	0	0	1840	1360
18	1,93	4,4	13	16,4	67,357513	33,846154	11,4	0	0	9576	912
19	3,41	6,7	20	16,9	58,6510264	33,5	14	0	0	11480	1260
20	4,49	9,9	29	14,1	64,5879733	34,137931	8,9	0	0	7298	1068
<b>MÉDIA</b>	3,1735	7,185	21,35	15,505	67,90	33,80	11,815	0	13,3	8430,45	2428

## ANEXO A- HEMOGRAMA DOS ANIMAIS AVALIADOS

Animal	Monócito	Eosinófilo	Basófilo	Citologia	Plaquetas	Plaquetas	Morfologia	Proteínas totais	IIC
INFECTADOS	/ $\mu$ L	/ $\mu$ L	/ $\mu$ L		p/cp/1000x	$\times 10^3/uL$		g/dL	
1	86	0	0	NDN	7	132	Normal	7	2
2	796	398	0	NDN	17	348	Normal	7,9	2
3	1137	326	0	NDN	7	135	Normal	9,6	2
4	904	1356	0	Monócitos ativados 10%	6	136	Normal	7,4	2
5	942	0	0	NDN	3	49	Normal	4	5
6	1078	924	0	Linfócitos reativos 10%	4	72	Normal	6,8	2
7	625	0	0	Monócitos ativados 10%	9	196	Normal	8,6	2
8	300	100	0	Monócitos ativados 16%	3	69	Normal	8,2	2
9	252	144	0	Aglomerados de mononucleares	5	79	Normal	4,6	2
10	836	0	0	NDN	7	131	Normal	10	2
11	1862	0	0	NDN	0	524	Agregação plaquetária	8	2
12	192	576	0	NDN	6	100	Normal	9	2
13	134	134	0	NDN	5	94	Normal	10	2
14	384	576	0	NDN	9	186	Normal	9,8	2
15	528	0	0	NDN	5	132	Normal	4	2
16	320	128	0	NDN	4	82	Normal	7	Discreta hemólise
17	640	160	0	NDN	4	71	Normal	7,2	Discreta hemólise
18	570	342	0	NDN	4	86	Normal	3,2	2
19	1120	140	0	NDN	6	172	Normal	8,8	2
20	267	267	0	NDN	10	106	Normal	7,4	2
<b>MÉDIA</b>	648,65	278,55	0	--	6,05	145	--	7,425	2

## ANEXO A- HEMOGRAMA DOS ANIMAIS AVALIADOS

Animal	Eritrocitos	Hemoglobina	Hematócrito	RDW	VCM	CHCM	Leucócitos	Metamielócitos	Bastonete	Segmentado	Linfócito
<b>NÃO INFECTADOS</b>											
1	6,8	17,1	50	15,1	73,5294118	34,2	13,5	0	0	8500	210
2	7,2	16	50	15,3	69,4444444	32	14,6	0	0	10650	190
3	8,4	18	50	16	59,5238095	36	14,8	0	0	7900	230
4	7	17,2	44	15,8	62,8571429	39,090909	13,8	0	0	11200	178
5	7,8	14,2	46	16,2	58,974359	30,869565	16,2	0	0	12100	160
6	6,4	16,5	44	17	68,75	37,5	12,4	0	0	9700	150
<b>MÉDIA</b>	7,266667	16,5	47,33333	15,9	65,51319	34,94341	14,2	0	0	10008	186

	Monócito	Eosinófilo	Basófilo	Citologia	Plaquetas	Plaquetas	Morfologia	Proteínas totais	IIC
<b>NÃO INFECTADOS</b>									
1	100	25	0	NDN	6	114	Normal	7,2	2
2	120	70	0	NDN	7	105	Normal	7,2	2
3	220	112	0	NDN	6	122	Normal	7,1	2
4	240	126	0	NDN	7	133	Normal	7,2	2
5	140	210	0	NDN	6	110	Normal	7,1	2
6	130	180	0	NDN	7	106	Normal	7,2	2
<b>MÉDIA</b>	158	120,5	0		5,5	115	--	7,17	2