



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE DOUTORADO



**AVALIAÇÃO DE MEDULA ÓSSEA E PERFIL
HEMOSTÁTICO DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*
*INFANTUM CHAGASI***

TAMIRES RAMBORGER ANTUNES

Campo Grande – MS
2021

TAMIRES RAMBORGER ANTUNES

**AVALIAÇÃO DE MEDULA ÓSSEA E PERFIL
HEMOSTÁTICO DE CÃES NATURALMENTE
INFECTADOS POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*
*INFANTUM CHAGASI***

*Evaluation of bone marrow and hemostatic profile of dogs naturally
infected by Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

TAMIRES RAMBORGER ANTUNES

Orientador: Alda Izabel de Souza

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor(a) em Ciências Veterinárias.

Campo Grande – MS
2021

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de medula óssea e perfil hemostático de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania infantum chagasi)*", registrada com o nº 951/2018, sob a responsabilidade de **Aida Izabel de Souza** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 4ª reunião ordinária do dia 17/05/2018.

Joice Stein
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 18 de maio de 2018.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.propp@ufms.br
fone (67) 3345-7925

ATA DE APROVAÇÃO



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



ATA DE DEFESA DE TESE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DOUTORADO

Aos vinte e dois dias do mês de outubro do ano de dois mil e vinte e um, às nove horas, via *on line*, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Alda Izabel de Souza (UFMS), Danilo Carloto Gomes (UFMS), Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa (UCDB), Paulo Henrique Braz (IFFar) e Thirssa Helena Grando (IFFar), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **TAMIRES RAMBORGER ANTUNES**, CPF 03624967142, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**AVALIAÇÃO DE MEDULA ÓSSEA A PERFIL HEMOSTÁTICO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM CHAGASI**" e orientação de Alda Izabel de Souza. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

AVALIAÇÃO

Dr.ª Alda Izabel de Souza (Presidente) _____ (APROVADO)

Dr. Danilo Carloto Gomes (Interno) _____ (APROVADO)

Dr.ª Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa (Externo) _____ (APROVADO)

RESULTADO FINAL:

() Aprovação (X) Aprovação com revisão () Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinatura



Documento assinado eletronicamente por **Thirssa Helena Grando**, **Usuário Externo**, em 12/11/2021, às 12:35, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Henrique Braz**, **Usuário Externo**, em 12/11/2021, às 13:29, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tamires Ramborger Antunes**, **Usuário Externo**, em 16/11/2021, às 11:01, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alda Izabel de Souza, Professora do Magistério Superior**, em 16/11/2021, às 11:13, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danilo Carloto Gomes, Professor do Magisterio Superior**, em 16/11/2021, às 12:39, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **MAGYDA ARABIA ARAJI DAHROUG MOUSSA, Usuário Externo**, em 19/11/2021, às 12:34, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2864443** e o código CRC **0AA09239**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

À minha família

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	10
1. CAPÍTULO I.....	11
1.1. INTRODUÇÃO.....	11
1.2. OBJETIVOS.....	13
1.2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
1.3. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.3.1. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA NA HEMOSTASIA E HEMATOLOGIA: ASPECTOS GERAIS.....	13
1.3.2. MEGACARIOPOIESE E PLAQUETOPOIESE.....	15
1.3.3. HEMOSTASIA.....	18
1.3.4. EXAMES LABORATORIAIS.....	23
1.3.4.1. PLAQUETOGRAMA.....	24
1.3.4.1. COAGULOGRAMA.....	27
1.3.4.1. MIELOGRAMA: LINHAGEM MEGACARIOCÍTICA.....	30
1.4. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
1.5. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU INOVAÇÃO ..	34
1.6. REFERÊNCIAS.....	35
2. CAPÍTULO II – PERFIL HEMOSTÁTICO DE CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL.....	44
2.1. INTRODUÇÃO.....	45
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
2.4. CONCLUSÕES.....	52
2.5. AGRADECIMENTOS.....	52
2.6. REFERÊNCIAS.....	52
3. CAPÍTULO III - AVALIAÇÃO MEGACARIOCÍTICA E DE PLAQUETAS RETICULADAS EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL.....	56
3.1. INTRODUÇÃO.....	58
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62

3.4. CONCLUSÕES.....	69
3.5. AGRADECIMENTOS.....	69
3.6. REFERÊNCIAS.....	70
4. CAPÍTULO IV - ANEXOS.....	75
4.1. ANEXO I - RESOLUÇÕES DO COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO.....	75

ANTUNES, T.R. Avaliação de medula óssea e perfil hemostático de cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. 2021. Doutorado em Ciências Veterinárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2021.

RESUMO

A leishmaniose visceral é considerada como uma das principais enfermidades parasitárias negligenciadas de maior importância para a saúde pública, acometendo diferentes espécies de mamíferos. Cães sintomáticos têm demonstrado distúrbios hemorrágicos e estudos avaliando a integridade dos componentes envolvidos na coagulação ainda são insuficientes para justificar tais alterações. A presença de plaquetopenia frequentemente é descrita em animais infectados, entretanto, são escassas as descrições em medicina veterinária do uso de plaquetas reticuladas para avaliação de regeneração medular. O objetivo com este estudo é avaliar o perfil hemostático, a linhagem megacariocítica e a dinâmica plaquetária em cães infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Para a pesquisa foram utilizados materiais biológicos colhidos de 90 cães e o estudo foi dividido em duas etapas: na primeira fase realizou-se a análise do perfil hemostático em amostras sanguíneas de 40 animais. Destes, 06 representaram o grupo controle e 34 apresentavam LVC. Já na segunda etapa investigou-se amostras sanguíneas e de medula óssea de 50 cães, sendo 5 hígidos e 45 infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. A análise de biomarcadores hemostáticos neste estudo não demonstrou alterações importantes que levariam ao desenvolvimento de quadros hemorrágicos nos cães com LV. A ausência de lesão hepática e/ou alteração de função renal pode justificar esses resultados. Ao avaliar a medula óssea e a plaquetopoiese, alterações morfológicas megacariocíticas foram observadas em 91% dos cães infectados e a presença de micromegacariócitos e hiperlobulações pode estar associada a infecções parasitárias medulares mais intensas na LVC. A análise de plaquetas reticuladas demonstrou plaquetogênese ativa, para manutenção de valores basais, em alguns cães infectados e resposta inadequada à plaquetopenia devido comprometimento medular, constatada após a análise dos valores absolutos, chamando à atenção para o uso deste parâmetro diante de concentrações plaquetárias circulantes diminuídas.

Palavras-chave: coagulação, índices plaquetários, dímero-D, plaquetas reticuladas, megacariócitos

ANTUNES, T.R. *Evaluation of bone marrow and hemostatic profile of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. 2021. PhD in Veterinary Sciences. Graduate Program in Veterinary Sciences. Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2021.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is considered one of the main neglected parasitic diseases of major public health importance, affecting different species of mammals. Symptomatic dogs have demonstrated bleeding disorders and studies evaluating the integrity of the components involved in coagulation are still insufficient to justify such alterations. The presence of thrombocytopenia is frequently described in infected animals, however, there are few descriptions in veterinary medicine of the use of reticulated platelets to assess medullary regeneration. The aim of this study is to evaluate the hemostatic profile, megakaryocytic lineage and platelet dynamics in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. For the research, biological materials collected from 90 dogs were used and the study was divided into two stages: in the first phase, the analysis of the hemostatic profile in blood samples from 40 animals was carried out. Of these, 06 represented the control group and 34 had CVL. In the second stage, blood and bone marrow samples from 50 dogs were investigated, being 5 healthy and 45 infected by *Leishmania (L.) infantum chagasi*. The analysis of hemostatic biomarkers in this study did not show important changes that would lead to the development of hemorrhagic conditions in dogs with VL. The absence of liver damage and/or impaired renal function may justify these results. When evaluating bone marrow and thrombocytopoiesis, megakaryocytic morphological changes were observed in 91% of infected dogs and the presence of micromegakaryocytes and hyperlobulations may be associated with more intense medullary parasitic infections in canine VL. The analysis of reticulated platelets showed active thrombocytopoiesis to maintain baseline values in some infected dogs and inadequate response to thrombocytopenia due to medullary involvement, verified after the analysis of absolute values, calling attention to the use of this parameter in the face of decreased circulating platelet concentrations.

Keywords: coagulation, platelet indices, d-dimer, reticulated platelet, megakaryocytes

1. CAPÍTULO I

1.1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* que apresenta epidemiologia complexa, com variações no ciclo de transmissão, hospedeiros reservatórios, vetores flebotomíneos, manifestações clínicas e respostas a terapias, podendo acometer diversas espécies, com destaque para os caninos e os seres humanos (BRASIL, 2014; 2016; WHO, 2019; PAHO, 2021).

Essa zoonose é considerada como uma das principais enfermidades parasitárias negligenciadas de maior importância para a saúde pública por apresentar alto potencial de surto e mortalidade. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), ela é endêmica nos cinco continentes e, mais de 90% dos novos casos notificados ocorreram na Etiópia, Índia, Somália, Sudão, Sudão do Sul e no Brasil, país em que a doença se encontra em expansão e representa mais de 97% dos registros nas Américas (BRASIL, 2014; 2016; WHO, 2019; PAHO, 2021).

O aumento da incidência de LV humana associado à alta prevalência da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) torna o cão como um dos mais importantes elos na transmissão da *Leishmania* aos seres humanos, devido à alta densidade do vetor, ao parasitismo da pele e a presença de animais assintomáticos (ASHFORD, 1996; PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001; TEIXEIRA-NETO et al., 2014).

A LVC caracteriza-se por ser crônica e multissistêmica com amplo espectro de sinais clínicos inespecíficos em variados níveis de gravidade (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BRASIL, 2014; 2016). Sangramentos como epistaxes, petéquias, hematúria e hemorragias digestivas já foram relatadas (MORENO, 1999; CIARAMELLA et al., 2005) e podem ocorrer devido a plaquetopenias imunomediadas, dano hepático e/ou renal e coagulação intravascular disseminada (CID) (CORONA et al., 2004; CIARAMELLA et al., 2005; HONSE et al., 2014; TORRES et al., 2016).

Na LV, estudos avaliando a integridade dos componentes envolvidos na coagulação ainda são insuficientes para justificar tais alterações hemorrágicas

33 em cães, uma vez que demonstram resultados variáveis e, conseqüentemente
34 ainda inconclusivos, descritos na literatura investigada.

35 Rotineiramente, o perfil de coagulação inclui a análise das concentrações
36 de plaquetas e fibrinogênio e determinação dos tempos de protrombina (TP) e
37 tromboplastina parcial ativada (TTPa). Contudo, outros parâmetros laboratoriais
38 estão sendo estudados, já que a hemostasia é um processo dinâmico complexo
39 e informações adicionais possibilitam aumentar a acurácia diagnóstica
40 (STOCKHAM e SCOTT, 2011; TEMIZEL et al., 2011; PAAR et al., 2017;
41 ERDOGAN et al., 2019).

42 As plaquetas são pequenos fragmentos citoplasmáticos de
43 megacariócitos que participam principalmente na reparação de lesão vascular
44 para impedir a ocorrência de hemorragias (COWELL et al., 2009; STOCKHAM e
45 SCOTT, 2011). Apresentam estrutura complexa, contendo moléculas essenciais
46 para sua ativação, alteração morfológica e desempenho de funções em
47 processos hemostáticos e inflamatórios, estando envolvidas em diversos tipos
48 de patologias (CASTRO et al., 2006).

49 Análises de índices plaquetários, tais como plaquetócrito (PCT), volume
50 plaquetário médio (VPM), amplitude da distribuição plaquetária (PDW),
51 porcentagem de macroplaquetas (PLC-R) e fração de plaquetas imaturas (IPF)
52 podem fornecer dados adicionais importantes (STOCKHAM e SCOTT, 2011;
53 ERDOGAN et al., 2019).

54 Condições trombóticas foram correlacionadas a valores aumentados de
55 VPM, PDW e PLC-R e a associação destes parâmetros com análise das
56 concentrações plasmáticas de dímero-D podem ser úteis para avaliação de risco
57 à trombofilias, como ocorre na CID (STOCKHAM e SCOTT, 2011; TEMIZEL et
58 al., 2011; ERDOGAN et al., 2019).

59 Apesar da ampla aplicabilidade do estudo da medula óssea na LVC,
60 devido ao rápido acúmulo e persistente parasitismo de amastigotas (COTTEREL
61 et al., 2000), permitindo determinar a intensidade parasitária e verificar o grau de
62 comprometimento hematológico frente à infecção (CHULAY e BRYCESON,
63 1983; CARDOSO, 2010; SINGH et al., 2010), ainda não há padronização quanto
64 a metodologia para avaliação da celularidade megacariocítica (COWELL et al.,
65 2009). Conseqüentemente, há variabilidade da análise de acordo com o tipo de
66 técnica utilizada.

67 Em contrapartida, o uso de plaquetas reticuladas para avaliação de
68 regeneração medular à plaquetopenias tem sido aplicada em seres humanos
69 como método alternativo menos invasivo (AULT et al., 1992; HOFFMAN, 2014).
70 Contudo, são escassas as descrições em medicina veterinária e não foram
71 encontrados relatos associados às leishmanioses.

72

73 **1.2. OBJETIVOS**

74 **1.2.1. OBJETIVO GERAL**

75 Avaliar amostras de medula óssea e sangue periférico de cães com LV e
76 caracterizar o perfil hemostático, a linhagem megacariocítica e dinâmica
77 plaquetária nesses animais.

78

79 **1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 80 • Avaliar os parâmetros hemostáticos em cães com LV incluindo índices
81 plaquetários e bioquímicos na composição do perfil de análise laboratorial;
- 82 • Determinar alterações morfológicas megacariocíticas na LVC;
- 83 • Avaliar a associação entre displasias de megacariócitos e intensidade
84 parasitária medular em cães com LV;
- 85 • Avaliar a resposta medular na plaquetopenia por meio do uso do parâmetro
86 de plaquetas reticuladas em cães com LV;
- 87 • Avaliar a associação entre concentrações sanguíneas e em medula óssea de
88 plaquetas reticuladas na LVC;
- 89 • Correlacionar as concentrações de plaquetas reticuladas na plaquetopenia e
90 hipocelularidade em cães com LV;

91

92 **1.3. REVISÃO DE LITERATURA**

93 **1.3.1. LESHMANIOSE VISCERAL CANINA NA HEMATOLOGIA E** 94 **HEMOSTASIA: ASPECTOS GERAIS**

95 As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas parasitárias
96 potencialmente fatais causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida,
97 família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (WHO, 2019). Sua transmissão
98 é principalmente vetorial por meio do repasto sanguíneo de fêmeas infectadas

99 de flebotomíneos (PAHO, 2021). As manifestações clínicas variam e as formas
100 cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e a visceral (LV) são mundialmente
101 reconhecidas, sendo esta considerada a mais grave e a segunda doença com
102 envolvimento parasitário mais letal do mundo, superada apenas pela malária
103 (WHO, 2019).

104 A LV é endêmica nos cinco continentes e, nas américas, é causada *pela*
105 *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, transmitida por meio da *Lutzomyia*
106 *longipalpis*, *L. cruzi* e *L.evansi*. Essa enfermidade acomete mamíferos,
107 especialmente o ser humano e o os cães. A espécie canina é considerada como
108 o principal reservatório urbano e responsável pela manutenção da transmissão
109 do agente, apesar de animais silvestres também participarem desse ciclo
110 (TEIXEIRA-NETO et al., 2014; PAHO, 2021).

111 A LVC é considerada um importante problema veterinário e de saúde
112 pública por ser endêmica em mais de 70 países (SOLANO-GALLEGO et al.,
113 2011). Os casos variam de sinais clínicos ausentes, oligossintomáticos e
114 sintomáticos progressivos e potencialmente fatais, manifestados geralmente 3-8
115 meses após da inoculação do agente (PAHO, 2021). A presença de cães
116 assintomáticos é estimada entre 40%-60% no Brasil (BRASIL 2014; 2016) e eles
117 são considerados tão competentes quanto os sintomáticos na infecção do vetor,
118 favorecendo a disseminação do parasito e dificultando o diagnóstico e controle
119 dessa zoonose (LAURENTI et al., 2013).

120 Durante a infecção o micro-organismo se dissemina para diversos órgãos
121 por meio do sistema vascular e linfático, com preferência para o fagocítico-
122 mononuclear (BRASIL 2014; 2016; PAHO, 2021). Dentre os tecidos envolvidos,
123 em medula óssea ocorre parasitismo rápido e persistente de amastigotas
124 (COTTERELL et al., 2000) e as citocinas ativadas na resposta inflamatória
125 sistêmica, associadas ao processo de deposição de imunocomplexos, podem
126 induzir à importantes anormalidades hematológicas nos pacientes portadores de
127 LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; BRASIL, 2014; 2016).

128 Alterações hematológicas que envolvem eritrócitos, leucócitos e
129 plaquetas frequentemente são descritas na LV. Os achados laboratoriais, na
130 maioria dos casos, são inespecíficos e incluem anemia, leucocitose, leucopenia
131 com neutropenia, linfocitose e monocitose (SOLANO-GALLEGO et al., 2011;
132 PAHO,2021). A presença de plaquetopenia tem sido relatada há anos e Dube et

133 al. (1995) revelaram que 92% dos casos em humanos apresentam
134 concentrações plaquetárias diminuídas acompanhadas de comprometimento do
135 processo de adesão e redução do fator III plaquetário. A interação direta do
136 agente com as plaquetas foi demonstrada *in vitro* e associada à ocorrência de
137 pseudoplaquetopenias *in vivo* (DOMÍNGUEZ e TORAÑO, 2001).

138 Na LVC, anormalidades megacariocíticas podem contribuir nas
139 disfunções plaquetárias por comprometimento da megacariopoiese e, o
140 processo de lesão tecidual, por mecanismos inflamatórios e deposição de
141 imunocomplexos, causa vasculite, dano renal e hepático e CID, favorecendo a
142 plaquetopenia e prejudicando a hemostasia (CORONA et al., 2004;
143 CIARAMELLA et al., 2005; HONSE et al., 2014; MOMO et al., 2014; TOMMASI
144 et al., 2014; TORRES et al., 2016). Alterações da coagulação e fibrinólise podem
145 estar presentes em casos mais graves da doença, uma vez que hemorragias são
146 frequentes e representam, assim como infecções bacterianas, um dos fatores
147 para risco de morte de pacientes se a causa não for identificada e tratada
148 adequadamente (BADYLAK, 1988; VALLADARES et al., 1998; MORENO, 1999;
149 SOLANO-GALLEGO et al., 2011; PAHO, 2021).

150 Os processos de produção de plaquetas e mecanismos hemostáticos são
151 complexos e há o envolvimento de diversos componentes em várias etapas.
152 Deste modo, conceitos sobre a fisiologia precisam ser revistos. Nos tópicos
153 seguintes são abordadas as informações essenciais para o entendimento dos
154 resultados dos exames laboratoriais.

155

156 **1.3.2. MEGACARIOPOIESE E PLAQUETOPOIESE**

157 Plaquetas de mamíferos são fragmentos anucleares celulares
158 provenientes de megacariócitos derivados de células-tronco hematopoiéticas
159 (COWELL et al., 2009; STOCKHAM e SCOTT, 2011). Elas caracterizam-se por
160 serem essenciais à hemostasia e, apesar de apresentarem uma estrutura
161 pequena, são complexas e contêm proteínas e glicoproteínas, fosfolípidios,
162 organelas, grânulos e receptores citoplasmáticos, dentre outros importantes
163 componentes necessários para o controle de hemorragias (GIBBINS, 2004;
164 CASTRO et al., 2006; THRALL et al., 2012).

165 O processo de produção de plaquetas é intrincado e ocorre em duas
166 etapas: a megacariopoiese e plaquetopoiese (KAUSHANSKY, 2008;
167 STOCKHAM e SCOTT, 2011).

168 A megacariopoiese consiste na proliferação e maturação da linhagem
169 megacariocítica que ocorre principalmente em medula óssea. Já a
170 plaquetopoiese é o estágio final da formação de plaquetas a partir da
171 fragmentação citoplasmática de megacariócitos (KAUSHANSKY, 2008;
172 STOCKHAM e SCOTT, 2011). Ambos os processos ocorrem em resposta à
173 estímulo de citocinas, principalmente trombopoietina (Tpo), entretanto, a
174 produção basal de plaquetas na ausência de Tpo já foi descrita (SHIVDASANI
175 et al., 1995; ALEXANDER, 1999).

176 A Tpo apresenta produção constante no organismo principalmente em
177 hepatócitos, epitélio tubular renal e em células da medula óssea (STOCKHAM e
178 SCOTT, 2011). Ela é capturada da circulação ao se ligar em seu receptor
179 específico, a proteína c-Mpl, que é expressa na superfície das “células alvo”
180 (célula tronco pluripotente, célula tronco mieloide, unidade formadora de colônia
181 megacariocítica, células da linhagem megacariocítica e plaquetas), induzindo as
182 vias de sinalização intracelular e estimulando a produção e maturação de
183 megacariócitos (KUTER e ROSENBERG, 1995; ALEXANDER, 1999;
184 KAUSHANSKY, 2008).

185 A destruição de plaquetas e megacariócitos, seja fisiológica ou patológica,
186 permite que maior quantidade de Tpo permaneça disponível (livre) para
187 estimular a megacariopoiese e, quando há diminuição concomitante da massa
188 plaquetária circulante, mais Tpo se ligará às células progenitoras, reduzindo
189 suas concentrações circulantes. À medida que as quantidades de plaquetas na
190 corrente sanguínea se normalizam, há menos Tpo livre para estimular a
191 megacariopoiese. Deste modo, a produção de plaquetas depende da
192 disponibilidade celular e do nível citocinas circulantes, sendo a concentração de
193 plaquetas dependente do equilíbrio entre as taxas de produção, consumo,
194 destruição e desvio de plaquetas da circulação e para a circulação (NICHOL et
195 al., 1995; KAUSHANSKY e DRACHMAN 2002; KAUSHANSKY, 2005;
196 STOCKHAM e SCOTT, 2011).

197 Durante a megacariopoiese os megacariócitos adaptam seu citoplasma e
198 sistemas de membrana para a biogênese plaquetária, um processo altamente

199 ativo e móvel que resulta em ramificação de pró-plaquetas (precursores de
200 plaquetas) (ITALIANO JR et al., 1999; KAUSHANSKY, 2008).

201 Antes de um megacariócito ter a capacidade de liberar plaquetas, ele
202 aumenta consideravelmente de diâmetro e se enche com altas concentrações
203 de ribossomos que facilitam a produção de proteínas específicas das plaquetas.
204 O aumento celular ocorre em resposta principalmente à Tpo e é mediado por
205 vários ciclos de endomitoses, um processo que amplifica seu DNA em até 64
206 vezes. Além da expansão do DNA, há formação de uma rede membranosa de
207 cisternas e túbulos interconectados, chamada de sistema de membrana de
208 demarcação (DMS), que atua como um reservatório de membrana para
209 formação de pró-plaquetas. Proteínas, receptores, mitocôndrias, grânulos, uma
210 rede tubular densa e o sistema canalicular aberto (envolvido com a liberação de
211 grânulos) também são formados (EBBE e STOHLMAN JR, 1965; ITALIANO JR
212 et al., 1999; SCHULZE e SHIVDASANI, 2005; MACHLUS e ITALIANO JR, 2013).

213 Após sua maturação em estágio final, o megacariócito se torna
214 plaquetogênico. Ele gera pró-plaquetas a partir de prolongamentos de
215 microtúbulos citoplasmáticos que formam pseudópodes, com migração de
216 organelas e grânulos para a periferia dessas extensões (RICHARDSON et al.,
217 2005). A formação de pró-plaquetas continua a se expandir e o citoplasma
218 celular torna-se inteiramente transformado em uma rede extensa e complexa de
219 pró-plaquetas interconectadas que comprimem e expulsam o núcleo
220 multilobulado, que é eliminado por fagocitose mediada por macrófagos. As
221 plaquetas jovens, ricas em RNA (reticuladas), se destacam e entram na corrente
222 sanguínea por meio de sinusoides medulares (EBBE e STOHLMAN, 1965;
223 ITALIANO JR et al., 1999; SCHULZE e SHIVDASANI, 2005; MACHLUS e
224 ITALIANO JR, 2013; GHALLOUSSI et al., 2019).

225 Estima-se que cada megacariócito dê origem a 1.000 e 3.000 plaquetas,
226 (STENBERG e LEVIN, 1989) sendo a concentração de formas imaturas na
227 medula óssea, em média, 2–3 vezes maior do que a quantidade presente no
228 sangue periférico, correlacionando-se com o número de megacariócitos (AULT
229 et al., 1992; HOFFMAN, 2014). Enquanto a vida média das plaquetas circulantes
230 geralmente é de 5-10 dias em animais hípidos, com variação entre espécies,
231 (STOCKHAM e SCOTT, 2011), as plaquetas reticuladas contém vida útil mais
232 curta, em torno de 24-36h, período em que ocorre a degradação progressiva do

233 RNA e posterior transformação em formas maduras (AULT e KNOWLES, 1995;
234 JUNG et al., 2010; BUTTARELLO et al., 2020). Desta forma, assim como os
235 reticulócitos para eritrócitos, elas podem ser utilizadas como biomarcadores da
236 atividade megacariopoiética na medula óssea (HOFFMAN, 2014).

237

238 **1.3.3. HEMOSTASIA**

239 A hemostasia representa o conjunto de eventos mecânicos e bioquímicos
240 que ocorrem no organismo para que o sangue permaneça circulando, em fluxo
241 contínuo, no interior dos vasos, mas que também permitem a formação rápida
242 de tampões sólidos para estancar hemorragias na presença de lesão vascular
243 (BOOM, 1993; OGEDEGBE, 2002; STOCKHAM e SCOTT, 2011; RODRIGUES
244 et al., 2012; THRALL et al., 2012).

245 Em condições fisiológicas, a hemostasia ocorre em um processo
246 sincrônico e sequencial mantido pelas interações complexas entre vasos
247 sanguíneos, plaquetas, fatores de coagulação e fibrinolíticos que determinam a
248 formação e resolução do tampão hemostático (BOOM, 1993; STOCKHAM e
249 SCOTT, 2011). A descoberta da interação desses componentes levou ao
250 desenvolvimento do modelo clássico (DAVIE e RATNOFF, 1964;
251 MACFARLANE, 1964) com segmentação da hemostasia em três fases distintas:
252 primária (formação o tampão plaquetário), secundária ou coagulação (vias
253 intrínseca, extrínseca e comum da cascata de coagulação) e terciária ou
254 fibrinólise (FERREIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012; THRALL et al.,
255 2012).

256 Estudos tem demonstrado que o modelo clássico não reflete diretamente
257 o que ocorre *in vivo*, com identificação de deficiências, nos últimos anos, que
258 não representam alguns aspectos clínicos de distúrbios de coagulação
259 (HOFFMAN, 2001; RIDDEL et al., 2007; SMITH, 2009; RODRIGUES et al., 2012;
260 SUCKER e ZOTZ, 2014). Um novo esquema, baseado em superfícies celulares,
261 parece explicar melhor a fisiologia hemostática. A atual teoria da coagulação
262 considera a interrelação dos processos físicos, celulares e bioquímicos que
263 atuam em uma série de estágios e não nas vias intrínseca, extrínseca e comum
264 da cascata da coagulação (RIDDEL JR et al., 2007; FERREIRA et al., 2010).

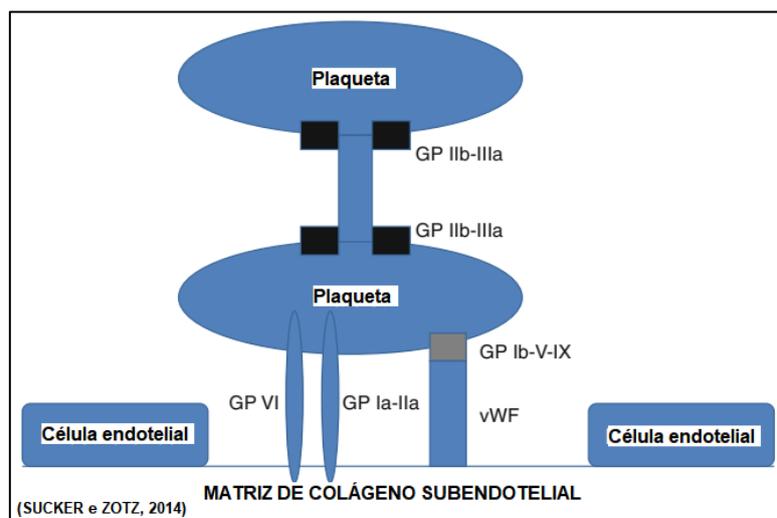
265 No modelo clássico, após a lesão vascular e exposição do colágeno
266 subendotelial, ocorrem os seguintes eventos (RIDDEL JR et al., 2007;
267 STOCKHAM e SCOTT, 2011; THRALL et al., 2012):

- 268 • Vasoconstrição reflexa: células do músculo liso vascular se
269 contraem transitoriamente, em resposta à endotelina liberada após
270 a lesão, o que induz a diminuição do fluxo sanguíneo e
271 consequente redução de perda de sangue.
- 272 • Ativação de células endoteliais: as células expressam funções pró-
273 trombóticas e antitrombóticas para limitar o sangramento e a
274 coagulação, respectivamente, atuando como “maestrina” entre
275 essas vias opostas.
- 276 • Adesão plaquetária (Fig.1): a lesão vascular expõe o colágeno
277 subendotelial, tornando o fator de von Willebrand (FvW) acessível
278 à adesão de plaquetas, via glicoproteína I, ao longo do defeito no
279 vaso. Obs.: o FvW se associa ao fator VIII da cascata de
280 coagulação (discutida a seguir), formando o complexo FvW-VIII, o
281 que torna o fator VIII estabilizado, contudo, para a agregação
282 plaquetária no sítio da lesão esse composto pode ser desfeito.
- 283 • Agregação plaquetária (Fig.1): as plaquetas aderidas e ativadas
284 liberam moléculas estocadas em seus grânulos (ADP, tromboxano
285 A2, trombospondina, trombina, entre outros) que ativam os
286 receptores para glicoproteína II na membrana plaquetária. As
287 plaquetas circulantes se agregam mediante pontes de fibrinogênio
288 e FvW, que se ligam à glicoproteína $\alpha\text{IIb}\beta$, formando o tampão
289 hemostático primário. Os produtos secretados pelas plaquetas
290 ajudam a manter a vasoconstrição e a coagulação.
- 291 • Facilitação da coagulação: fosfolípidios (fosfatidilserina – fator
292 plaquetário) se movem da membrana interna para a externa após
293 a ativação plaquetária, ficando disponíveis para a ligação de
294 enzimas, cofatores e zimogênios da coagulação.
- 295 • Cascata de coagulação: fatores de coagulação (Tab.1) são
296 ativados em sequência. É ativada por meio do fator tecidual (via
297 extrínseca) ou induzida pela superfície (intrínseca) e resulta na

298 formação de fibrina com ligações cruzadas (fibrina estável) na via
299 comum. Na figura 2 são demonstrados os processos.

300 • Fibrinólise e fibrinogênólise: para que o coágulo pare de crescer e
301 não obstrua o lúmen do vaso, ocorre a degradação enzimática da
302 fibrina. Ela se inicia simultaneamente com a coagulação: o
303 zimogênio inativo (plasminogênio) se liga a fibrina. O ativador de
304 plasminogênio liberado pelas células endoteliais liga-se ao
305 complexo fibrina-plasminogênio clivando-o em plasmina, que
306 degrada enzimaticamente a fibrina, o fibrinogênio e os fatores Va,
307 VIIIa, fvW, entre outros. A degradação da fibrina não estabilizada e
308 do fibrinogênio leva à formação dos produtos da degradação da
309 fibrina e fibrinogênio (PDFs). Dímeros-D são resultantes da fibrina
310 estável.

311



312

313

314

315

316

317

318

319

Figura 1. Ilustração esquemática da adesão e agregação plaquetária. Após a lesão endotelial, as plaquetas se aderem ao colágeno pela interação da glicoproteína receptora (GP) Ib / V / IX com o fator de von Willebrand que está ligado ao colágeno. Esta adesão é estabilizada pela interação direta dos receptores de colágeno plaquetário GP Ia /IIa e GP VI com o colágeno. Após a ativação dos receptores de agregação GP IIb / IIIa, as plaquetas se agregam, mediada pelo fator de von Willebrand ou fibrinogênio (SUCKER e ZOTZ, 2014).

320

321

322

323

324

O modelo de hemostasia clássica é útil para a compreensão de como as etapas enzimáticas de coagulação ocorrem *in vitro*, permitindo a interpretação clínica de exames laboratoriais e a investigação de anormalidades de coagulação que ocorrem no plasma ou em sistemas de fluido à base de proteína purificada, que é estático e não interage com parede vascular ou superfícies

325 celulares (MANN et al., 2003; SMITH, 2009). A compreensão que o fator tecidual
 326 é uma proteína transmembrânica, presente em células endoteliais e do leito
 327 vascular (músculo liso e fibroblastos), que age como receptor e cofator para o
 328 fator VII, resultou no questionamento do verdadeiro papel da via extrínseca na
 329 hemostasia *in vivo* (FERREIRA et al., 2010).

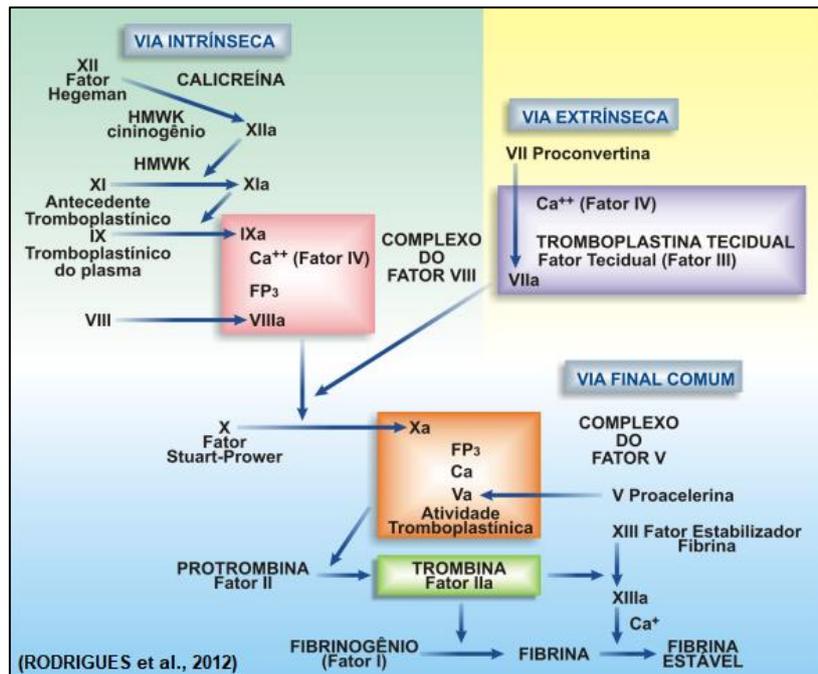
330 A inclusão do modelo baseado em superfícies celulares permite
 331 compreender os mecanismos em um sistema vascular dinâmico e que algumas
 332 enzimas podem executar funções em outros mecanismos fisiológicos do
 333 organismo (SMITH, 2009). Neste novo esquema, a exposição do fator tecidual
 334 na corrente sanguínea, por lesão de células endoteliais e vizinhas ou ativação
 335 de endoteliais e monócitos, induz ao início da coagulação (FERREIRA et al.,
 336 2010; SUCKER e ZOTZ, 2014). O complexo fator VIIa-fator tecidual ativa
 337 também o fator IX, além do X, e esse conjunto é essencial para estimular a
 338 coagulação (RIDDEL JR et al., 2007). O modelo baseado em superfícies
 339 celulares contém quatro fases que garantem a hemostasia (SMITH, 2009;
 340 FERREIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012; SUCKER e ZOTZ, 2014) e
 341 seus detalhes podem ser vistos da figura 3.

342

343 **Tabela 1.** Fatores de coagulação.

FATOR	NOME	VIA
I	Fibrinogênio	Comum
II*	Protrombina	Comum
III	Fator tecidual, fator tromboplastina tecidual	Extrínseca
IV	Cálcio livre ionizado	Intrínseca
V	Proacelerina	Comum
VII*	Proconvertina	Extrínseca
VIII	Fator anti-hemolítico	Intrínseca
IX*	Fator de Christmas	Intrínseca
X*	Fator de Stuart, Stuart-Power	Comum
XI	Antecedente da tromboplastina plasmática	Intrínseca
XII	Fator de Hageman	Intrínseca
XIII	Fator estabilizador da fibrina, fibrinase	Comum
HMWK	Fator de Fitzgerald	Intrínseca
FP3	Fator plaquetário 3, principalmente fosfatidilserina	Intrínseca, comum
PK	Fator Fletcher	Intrínseca

344 STOCKHAM e SCOTT, (2011). * Fatores que dependem de vitamina K para serem funcionais.



346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376

Figura 2. Cascata da coagulação. A cascata da coagulação começa com a ativação das vias do fator tecidual (extrínseca) ou induzida pela superfície (intrínseca). **Via extrínseca:** é iniciada pelo fator tecidual liberado de, ou exposto a, tecido lesado ou monócitos, macrófagos e possivelmente células endoteliais ativadas. O fator tecidual da membrana celular liga-se ao fator VII (e VIII) na presença de cálcio livre ionizado, e o complexo fator tecidual-VIIa resultante rapidamente ativa o fator X (via comum) e IX (via intrínseca) na presença de cálcio livre ionizado e fosfolípido. O inibidor da via da coagulação do fator tecidual inativa rapidamente o complexo fator tecidual-VIIa, mas não até que a trombina seja gerada através da via comum. A trombina ativa o fator XI e a amplificação dos pró-cofatores V e VIII para manter a produção de fator Xa pela via induzida pela superfície. **Via intrínseca:** é iniciada pela ativação do fator XII em XIIa por contato com uma superfície carregada negativamente (colágeno subendotelial exposto no local da lesão vascular). O fator XIIa ativa a pró-caliceína em caliceína, que produz enzimaticamente mais caliceína e mais fator XIIa em uma potente via de amplificação. O fator XIIa cliva o fator XI produzindo XIa, que cliva o fator IX na presença de cálcio livre ionizado para formar o fator IXa. O fator IXa forma o complexo tenase com o fator VIIIa (ativado anteriormente principalmente pela trombina) na presença de cálcio livre ionizado, que cliva o fator X para formar o fator Xa. **Via comum:** continuação comum das vias extrínseca e intrínseca, começando com a ativação do fator X. O fator Xa forma um complexo com o fator Va (ativado principalmente pela trombina) e o cálcio livre ionizado em uma superfície fosfolípida para formar o complexo pró-trombinase ativo, que resulta na conversão enzimática de protrombina (fator II) em trombina (fator IIa). A trombina então ativa as plaquetas e cliva seus muitos substratos, dentre os principais: fibrinogênio é clivado para formar monômeros de fibrina. A trombina cliva o fator XIII em XIIIa, que na presença de cálcio livre ionizado faz ligações cruzadas para estabilização da fibrina e reforça o tampão hemostático secundário. A trombina cliva o fator XI em XIa, ocorrendo uma retroalimentação positiva nas vias comum e intrínseca. A proteína C ativada inativa os fatores Va e VIIIa e promove a fibrinólise por intermédio do ativador de plasminogênio tecidual. A trombina, por meio da trombomodulina, ativa o inibidor da fibrinólise ativável por trombina inibe a fibrinólise clivado os locais de ligação do plasminogênio da fibrina (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

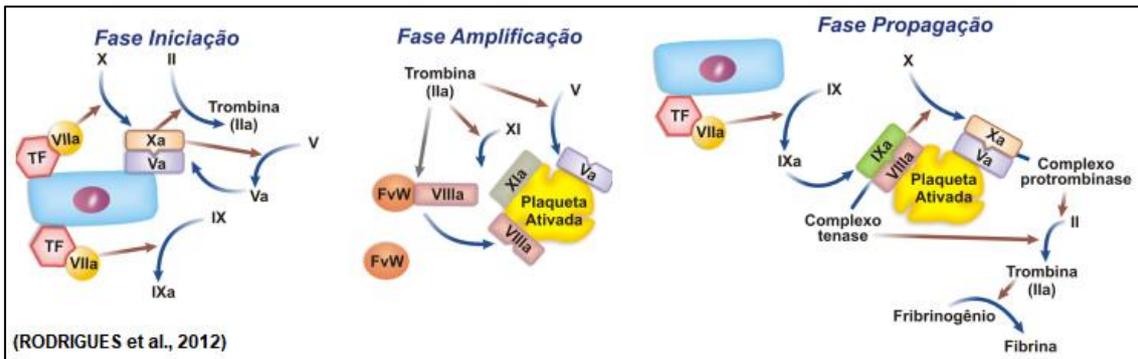


Figura 3. Novo modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares. O

processo ocorre em uma série de etapas simultâneas. Na fase de **iniciação** células endoteliais, micropartículas ou monócitos expõem o fator tecidual (FT) que se associa ao fator VIIa presente no sangue, formando o complexo FT-VIIa, que ativa pequenas quantidades de fator IX e X em IXa e Xa. O fator Xa ativa o V em Va. O fator V também pode ser ativado por proteases não coagulantes. O fator Xa então se associa ao Va e forma o complexo Xa-Va (protrombinase) na superfície da célula que expressa o fator tecidual. A protrombinase transforma pequenas quantidades do fator II (protrombina) em IIa (trombina). Essas concentrações são suficientes para completar o processo de formação do coágulo de fibrina e são fundamentais para as fases de amplificação e propagação. Independentemente da presença de lesão vascular, pequenas quantidades de trombina são produzidas constantemente fora do leito vascular, estando a via iniciação constantemente ativa e o processo de amplificação ocorre somente quando há dano vascular. Obs.: a trombina e outros fatores (VII, X e protrombina) são capazes de deixar o vaso sanguíneo e percorrer espaços entre os tecidos. Na fase de **amplificação**, a lesão vascular expõe o fator de von Willebrand (FvW) presente no colágeno, ocorrendo o processo de formação do tampão hemostático primário descrito no modelo clássico e também do complexo FvW-fator VIII. Como houve lesão, a trombina presente no espaço extravascular pode interagir com as plaquetas, tornando-as ativadas, e com o complexo FvW-fator VIII dissociando-o. A trombina também ativa os fatores V, VIII, XI e X que foram atraídos para a superfície das plaquetas, iniciando-se rapidamente a fase de propagação. A ativação do fator XI pela trombina na superfície das plaquetas explica por que o fator XII não é necessário para a homeostasia normal neste novo modelo baseado em superfícies celulares. Na fase de **propagação** há recrutamento de grande número de plaquetas para o sítio da lesão e também são formados dois complexos: tenase (IXa-VIIIa) e protrombinase (Xa-Va) na superfície das plaquetas ativadas. O fator IXa, ativado durante a fase de iniciação, liga-se ao fator VIIIa na superfície das plaquetas, formando o complexo tenase. Como o fator Xa não pode se mover efetivamente das células que expressam fator tecidual para a plaqueta ativada, maior quantidade de fator Xa deve ser produzida, diretamente na superfície da plaqueta, pelo complexo tenase. O fator Xa se associa ao fator Va ligado à plaqueta durante a fase de amplificação, resultando na formação do complexo protrombinase, o qual converte grande quantidade de protrombina em trombina que cliva o fibrinogênio para formar fibrina, que depois é estabilizada. Na fase de **finalização** ocorrem processos para se evitar a disseminação da coagulação e a oclusão trombótica do vaso. Entram em ação quatro anticoagulantes naturais: o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), a proteína C (PC), a proteína S (PS), e a antitrombina (AT). O TFPI é uma proteína secretada pelo endotélio, que forma um complexo quaternário (fator tecidual-fator VIIa-fator Xa-inibidor do fator tecidual), inativando os fatores ativados. As proteínas C e S inativam os cofatores procoagulantes Va e VIIIa. A proteína C, quando ativada, promove a proteólise dos cofatores Va e VIIIa. A proteína C (PC) é ativada pela trombina, que está ligada à proteína transmembrânica trombomodulina OS na superfície das células endoteliais intactas. A atividade da PC é aumentada pela proteína S (OS) que atua como cofator. A antitrombina (AT) inibe a atividade da trombina e outras serino proteases (fatores IXa, Xa, XIa e XIIa). As células endoteliais produzem uma variedade de glicosaminoglicanos, que funcionam como sítios de ligação, de alta afinidade, para a AT, que são cruciais para uma rápida inativação da trombina (FERREIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2012).

1.3.4. EXAMES LABORATORIAIS

424 **1.3.4.1. PLAQUETOGRAMA**

425 O hemograma é um exame laboratorial utilizado para analisar os
426 componentes celulares sanguíneos com o objetivo de detectar alterações
427 fisiopatológicas que podem ocorrer em respostas a doenças ou identificar
428 anormalidades hematológicas (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Este exame é
429 dividido em etapas, sendo o plaquetograma (mamíferos) e trombograma (não
430 mamíferos) o processo de análise de plaquetas e trombócitos respectivamente.
431 (STOCKHAM e SCOTT, 2011; THRALL et al., 2012).

432 Assim como nas demais fases do hemograma, o plaquetograma é
433 composto por avaliações quantitativas, como a determinação das concentrações
434 plaquetárias circulantes, e qualitativas, em que há a procura por alterações
435 morfológicas (THRALL et al., 2012).

436 A concentração de plaquetas representa a quantidade de partículas que
437 estão dentro de um intervalo definido para o tamanho plaquetário, de acordo com
438 a espécie (STOCKHAM e SCOTT, 2011). É determinada por meios
439 automatizados e manuais com o objetivo de identificar interferências pré-
440 analíticas e analíticas (controle interno de qualidade) (COMAR et al., 2009). Na
441 microscopia, além de se estimar os valores por mm^3 , investiga-se a presença de
442 agregados, microcoágulos, macro e microplaquetas, setelismo e, até mesmo se
443 megacariócitos estão presentes na amostra (HARVEY, 2001; COWELL et al.,
444 2009). A análise de esfregaços diretos representa um método auxiliar utilizada
445 para complementar e corroborar com os resultados do hemograma fornecidos
446 por aparelhos, aumentando a acurácia do diagnóstico laboratorial (COMAR et
447 al., 2009).

448 Em relação à interpretação, quantidades plaquetárias diminuídas
449 (plaquetopenia) decorrem de redução do tempo de vida (consumo e/ou
450 destruição), redistribuição anormal (sequestro esplênico, por ex.) ou diminuição
451 de produção (hipoplásia ou aplasia medular). Já valores aumentados
452 (plaquetocitose) são encontrados quando há elevação de produção, seja
453 fisiológica (correção de plaquetopenia; resposta ao estresse) ou patológica
454 (leucemia) (STOCKHAM e SCOTT, 2011; THRALL et al., 2012). As alterações
455 morfológicas podem ser encontradas devido a condições diversas e devem ser

456 analisadas considerando-se o histórico do paciente e outros resultados do
457 hemograma (COMAR et al., 2009; COWELL et al., 2009).

458 Com a evolução dos métodos automatizados, novas ferramentas foram
459 introduzidas, o que permite o enriquecimento das análises sanguíneas e devem
460 ser utilizadas para complementação da investigação diagnóstica. Elas estão
461 disponíveis há vários anos na rotina laboratorial, contudo, ainda são pouco
462 utilizadas devido a problemas metodológicos que dificultam a padronização e a
463 determinação de valores de referência (GIOVANETTI et al, 2011; BUTTARELLO
464 et al., 2020).

465 Na medicina veterinária esses “novos” índices plaquetários vão sendo
466 utilizados na rotina a partir da produção de intervalos de referência para as
467 espécies. Dentre eles, o plaquetócrito (PCT), o volume plaquetário médio (VPM),
468 a largura de distribuição plaquetária (PDW) e a porcentagem de macroplaquetas
469 com volume geralmente superior à 12 fL (PLC-R) representam os parâmetros
470 mais acessíveis por estarem disponíveis na maioria dos aparelhos com
471 metodologia de impedância, não acrescentando custos adicionais ao
472 hemograma. Já para a avaliação de plaquetas jovens circulantes (fração de
473 plaquetas imaturas-IPF; porcentagem de plaquetas reticuladas) é necessário o
474 uso de equipamentos e metodologias mais complexas. Deste modo, essas
475 análises ainda são aplicadas, em sua maioria, em pesquisas científicas devido a
476 necessidade de maior investimento financeiro (GIOVANETTI et al, 2011;
477 STOCKHAM e SCOTT, 2011; THRALL et al., 2012; BUTTARELLO et al., 2020).

478 Em relação aos parâmetros do plaquetograma, o PCT representa a massa
479 plaquetária do sangue, medida equivalente ao hematócrito da série vermelha.
480 Valores diminuídos deste parâmetro são encontrados quando há plaquetopenias
481 acentuadas arregenerativas (não compensadas). O PCT é calculado a partir dos
482 valores de VPM e da concentração de plaquetas. Portanto, seus resultados
483 dependem que a mensuração destes parâmetros seja realizada sem
484 interferências analíticas (STOCKHAM e SCOTT, 2011; MONTEIRO, 2017).

485 Já o VPM é o tamanho (volume) médio aparente das plaquetas de uma
486 amostra. Por se tratar da média de uma população, é necessária a presença de
487 grande quantidade de macroplaquetas ou microplaquetas para que haja
488 deslocamento do histograma e conseqüente alteração desse parâmetro.
489 Portanto, plaquetas grandes ou pequenas podem ser detectadas em

490 microscopia na presença de valores de VPM dentro do intervalo de referência
491 para a espécie. Este parâmetro se assemelha ao VCM (volume corpuscular
492 médio) do eritrograma (FARIAS e BÓ, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011).

493 A presença de VPM aumentado geralmente sugere trombopoiese
494 acelerada devido aumento de estímulo para produção de plaquetas, em
495 decorrência de plaquetopenia, que ocorreu em qualquer período do tempo de
496 sobrevivência plaquetária em condições de saúde (5-10 dias) (THOMPSON et al.,
497 1983; THREATTE, 1993; STOCKHAM e SCOTT, 2011; TEMIZEL et al., 2011;
498 ERDOGAN et al., 2019). De acordo com Bowles et al., (2005), valores muito
499 elevados de VPM tendem a estar associados à consumo de plaquetas do que
500 diminuição de produção, possibilitando a exclusão de alteração medular após
501 plaquetogramas seriados.

502 O volume plaquetário pode estar correlacionado à ploidia (número de
503 cromossomos e/ou núcleo) de megacariócitos. O estímulo de citocinas para
504 aumento de velocidade da renovação plaquetária leva às células da linhagem se
505 tornarem plaquetogênicas antes de finalizarem sua maturação, resultando na
506 produção de plaquetas maiores e mais reativas (CORASH et al., 1987). Deste
507 modo, em condições fisiológicas, o VPM é inversamente proporcional à
508 contagem de plaquetas (BUTTARELLO e PLEBANI, 2008).

509 Hipocelularidade medular, sepse e processos inflamatórios tem sido
510 associados à presença de microplaquetas e conseqüente VPM diminuído em
511 amostras de humanos, entretanto, causas de diminuição em animais ainda são
512 controversas (FARIAS e BÓ, 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011).

513 O PDW representa a intensidade de anisocitose da massa plaquetária, ou
514 seja, o grau de variabilidade do tamanho de plaquetas. Se assemelha ao RDW
515 (largura da distribuição de eritrócitos) sendo, portanto, calculado a partir dos
516 histogramas da população. Na maioria dos aparelhos, é determinado por meio
517 do desvio padrão em relação à média (VPM), cálculo que representa o
518 coeficiente de variação (PDW-CV). Sua elevação ocorre devido ao aumento da
519 população de plaquetas grandes e/ou pequenas. Valores diminuídos devem ser
520 interpretados com cautela uma vez que indicam homogeneidade da população
521 (STOCKHAM e SCOTT, 2011; MONTEIRO, 2017).

522 A determinação da PLC-R, assim como para o PDW, é calculada a partir
523 dos histogramas de distribuição de plaquetas. Este parâmetro representa, em

524 porcentagem, a quantidade de plaquetas grandes presentes na amostra e
525 podem complementar a avaliação da cinética plaquetária (MONTEIRO, 2017).
526 Devido à escassez de intervalos de referência, seu uso tem sido evitado na
527 medicina veterinária.

528 Os parâmetros IPF ou plaquetas reticuladas, que são baseados no
529 princípio de plaquetas fluorescentes, determinam a quantidade de partículas que
530 emitem luz após o acréscimo de um corante específico (laranja de tiazol ou de
531 acridina) que se liga ao RNA presente nas plaquetas. A análise conjunta das
532 características de tamanho (volume) e complexidade celular permite que esses
533 fragmentos de megacariócitos sejam diferenciados de outras células ou
534 partículas presentes nas amostras. Para aumentar a acurácia, marcação com
535 anticorpos fluorescentes anti proteínas plaquetárias podem ser utilizadas, uma
536 vez que reticulócitos, especialmente fragmentados, podem interferir nos ensaios
537 (BUTTARELLO e PLEBANI, 2008; STOCKHAM e SCOTT, 2011; BUTTARELLO
538 et al., 2020; SYSMEX, 2021).

539 A análise de plaquetas jovens representa um método pouco invasivo para
540 avaliar a resposta medular na plaquetopenia (HOFFMAN, 2014). Deste modo,
541 assim como deve ser interpretado as concentrações de reticulócitos, valores
542 aumentados de plaquetas imaturas indicam resposta medular adequada. Já
543 resultados normais ou diminuídos sugerem redução ou ausência de produção
544 devido a alterações medulares que devem ser investigadas (BUTTARELLO e
545 PLEBANI, 2008).

546 Para interpretar os índices plaquetários, é primordial considerar todos os
547 parâmetros disponíveis no plaquetograma já que eles são complementares.
548 Cabe destacar que é importante também analisar o tipo de equipamento e
549 anticoagulante utilizados, o tempo e temperatura de armazenamento, a espécie
550 e se estão presentes agregados e/ou fibrina na amostra, uma vez que todos
551 podem interferir nos resultados (JACKSON e CARTER, 1993; THREATTE, 1993;
552 FARIAS e BÓ, 2010; BUTTARELLO e PLEBANI, 2008; STOCKHAM e SCOTT,
553 2011).

554

555 **1.3.4.2. COAGULOGRAMA**

556 O coagulograma é o exame realizado para avaliar se os processos
557 hemostáticos estão adequados, ou seja, se há alteração na fisiologia normal do
558 paciente (STOCKHAM e SCOTT, 2011; THRALL et al., 2012). Nele procura-se
559 explorar a participação de todos os componentes da coagulação e fibrinólise na
560 hemostasia para tentar identificar a causa de processos hemorrágicos e/ou
561 trombóticos. Alguns ensaios são mais complexos (dosagem de FvW,
562 agregometria, tromboelastometria, tromboelastografia por ex.) e, portanto,
563 realizados somente em instituições ou laboratórios especializados (RUSSEL,
564 2010; ZAMORA-GONZÁLEZ, 2012; GAMT et al., 2020).

565 De regra geral, são analisados o tempo de sangramento da mucosa oral
566 (TSMO), o plaquetograma, as concentrações plasmáticas de fibrinogênio e
567 determinados os tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada
568 (TTPa). Quando disponível, a análise do dímero-D também é realizada
569 (STOCKHAM e SCOTT, 2011; THRALL et al., 2012).

570 O TSMO é um teste *in vivo*, relativamente insensível, utilizado para
571 avaliação plaquetária e os processos envolvidos na formação do tampão
572 primário. Neste exame registra-se o tempo para estancamento do sangramento
573 após lesão realizada intencionalmente em mucosa oral. Tempos prolongados (>
574 5 minutos) sugerem defeitos em hemostasia primária ou fase de amplificação da
575 coagulação, sendo necessário maiores investigações (FERREIRA et al., 2010;
576 STOCKHAM e SCOTT, 2011; RODRIGUES et al., 2012). Por se tratar de um
577 teste geralmente realizado beira-leito, na maioria dos casos não será encontrado
578 nos laudos laboratoriais

579 Assim como o TSMO, o plaquetograma representa o conjunto de
580 parâmetros que permitem dizer que há alteração em algum(ns) dos processos
581 que ocorrem na hemostasia primária ou fase de amplificação (STOCKHAM e
582 SCOTT, 2011). Conceitos devem ser revistos em tópico anterior.

583 Para avaliação da função de plaquetas é necessário analisar a sua
584 capacidade de resposta em se agregar após a ativação com compostos
585 específicos (agonistas) na agregometria. A adição, em várias concentrações, de
586 colágeno, ADP (adenosina difosfato), epinefrina, ristocetina, trombina ou ácido
587 araquidônico induz à ativação, mudança de conformação e agregação, que são
588 registados em gráficos de curvas. Os resultados permitem indicar alteração nas

589 vias de ativação, demonstrando falhas na estrutura e/ou função plaquetária
590 (PATRÍCIO, 2017).

591 O fibrinogênio é uma proteína plasmática inflamatória de fase aguda
592 positiva produzida em hepatócitos que, na hemostasia, é convertida em fibrina,
593 atuando diretamente na formação do tampão hemostático. Sua análise permite
594 avaliar a hemostasia secundária *in vitro* e fase de propagação da coagulação *in*
595 *vivo*. Concentrações diminuídas indicam aumento de consumo ou diminuição de
596 produção e valores aumentados ocorrem devido à processos inflamatórios ou
597 hemoconcentração (FERREIRA et al., 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011;
598 RODRIGUES et al., 2012; THRALL et al., 2012).

599 O TP e o TTPa são testes que simulam o processo de coagulação *in vitro*
600 no plasma com o objetivo de se determinar do tempo para formação da fibrina.
601 No TP a coagulação é ativada por meio da ação do fator tecidual (tromboplastina)
602 e permite avaliar via do fator VII (extrínseca e comum; fase de iniciação). Já no
603 TTPa a ativação é por contato em que o ácido elágeno, em substituição ao
604 colágeno, estimula o fator XII, permitindo analisar a cascata subsequente de
605 ativação (via intrínseca e comum; fase de amplificação e propagação). Tempos
606 prolongados indicam deficiência de fatores que pode ocorrer devido à diminuição
607 de produção ou aumento de consumo ou inativação (STOCKHAM e SCOTT,
608 2011; RODRIGUES et al., 2012; ZAMORA-GONZÁLEZ, 2012; SUCKER e
609 ZOTZ, 2014).

610 Os dímeros D são fragmentos da fibrina estável formados durante a
611 fibrinólise. Deste modo, valores aumentados são observados quando há
612 formação e/ou degradação aumentada de fibrina, permitindo avaliar a
613 hemostasia terciária ou a fase de finalização da coagulação (FERREIRA et al.,
614 2010; STOCKHAM e SCOTT, 2011; RODRIGUES et al., 2012).

615 A tromboelastometria e tromboelastografia são métodos laboratoriais que
616 demonstram alterações na viscoelasticidade durante a formação do coágulo.
617 Elas permitem determinar a resistência do coágulo e avaliar desde a sua
618 formação até a degradação, sendo os resultados expressos no formado de
619 gráficos. As propriedades físicas do coágulo dependem das relações entre
620 fibrinogênio, plaquetas e proteínas do plasma. Com esses exames é possível a
621 avaliação, em tempo real, da coagulação *in vivo* do paciente (CROCHEMORE
622 et al., 2017).

623 Apesar de existirem novos conceitos que justifiquem os processos
624 hemostáticos, alguns dos exames laboratoriais citados acima procuram simular
625 *in vitro* o que ocorre *in vivo*, sem considerar a dinâmica celular. Na rotina médica
626 veterinária, ainda são aplicados os conhecimentos do modelo da homeostasia
627 clássica para a compreensão dos resultados laboratoriais. Adaptações ainda são
628 necessárias para a inclusão da interpretação correta dos estágios da coagulação
629 e fibrinólise que ocorrem no sistema dinâmico do novo modelo baseado em
630 superfícies celulares.

631

632 **1.3.4.3. MIELOGRAMA: LINHAGEM MEGACARIOCÍTICA**

633 A medula óssea é o principal órgão linfóide e hematopoiético do
634 organismo (ALENCAR et al., 2002). Ela é um tecido localizado na cavidade dos
635 ossos, sendo envolto pela cortical óssea e ossos esponjosos. É composta, em
636 sua maioria, por células hematopoiéticas, tecido adiposo e tecido de sustentação
637 (STOCKHAM e SCOTT, 2011), sendo considerada, então, como maior órgão
638 hematopoiético do corpo (COWELL et al, 2009).

639 A avaliação microscópica da medula óssea é essencial na investigação
640 de anormalidades hematológicas que não são prontamente explicáveis com
641 base em um bom histórico, exame físico, perfil bioquímico e/ou outros
642 procedimentos complementares realizados de maneira seriada, na qual seu
643 estudo possibilite o diagnóstico, acompanhamento da doença e/ou avaliação da
644 resposta ao tratamento (KNOWLES e HOFFBRAND, 1980; RYAN e FELGAR,
645 2005; COWELL et al., 2009; ADRIOLO et al., 2014), uma vez que a análise
646 morfológica da medula óssea, por citologia ou cortes histológicos, fornece
647 informações mais detalhadas que passariam despercebidas principalmente no
648 exame do sangue periférico (TRAVLOS, 2006).

649 O mielograma ou exame citológico da medula óssea é utilizado
650 principalmente para identificação de micro-organismos e avaliar a morfologia
651 celular já que os métodos de colheita, armazenamento e processamento da
652 amostra permitem preservar as características das células hematopoiéticas
653 (KNOWLES e HOFFBRAND, 1980; BAIN, 2001; HARVEY, 2001; RYAN e
654 FELGAR, 2005; ALVES, 2009; LOKEN et al., 2009). Devido a hemodiluição, a
655 análise da celularidade deve ser determinada pela observação das espículas

656 (“mini biópsias”) que contêm elementos hematopoiéticos e gordurosos
657 suficientes para se estimar a quantidade celular (RYAN e FELGAR, 2005).

658 No mielograma, as linhagens rotineiramente analisadas incluem a
659 eritroide, mieloide, megacariocítica e linfoplasmocitária, porém, distúrbios
660 envolvendo outros tipos celulares também podem ser estudados (HARVEY,
661 2001; COWELL et al., 2009; STOCKHAM e SCOTT, 2011; OLIVEIRA et al.,
662 2016). Em relação à avaliação da série megacariocítica, verifica-se a
663 celularidade, a escala de maturação (diferencial) e a morfologia.

664 Na literatura consultada existe variabilidade de métodos utilizados para se
665 determinar a quantidade de megacariócitos e seus precursores.
666 Conseqüentemente, há diferentes intervalos de referência de acordo com a
667 metodologia utilizada, que incluem: por lâmina (COWELL et al., 2009); por
668 campo (MISCHKE, 2002; COWELL et al., 2009); por espícula em esfregaço
669 direto (MYLONAKIS, 2005; COWELL et al., 2009); por espícula em esfregaço
670 após recuperação de fragmentos em placa de petri (MYLONAKIS, 2005); por
671 camada lipídica (MYLONAKIS, 2005) ou por camada leucocitária (MYLONAKIS,
672 2005). Apesar disso, por representarem fragmentos teciduais medulares, a
673 análise por grumo medular pode demonstrar maior precisão analítica (RYAN e
674 FELGAR, 2005).

675 A análise de maturação celular permite verificar se as proporções e tipos
676 celulares representam a quantidade e sequência compatíveis com a fisiologia
677 normal da hematopoiese. Geralmente, mais que 70% das células da linhagem
678 são megacariócitos maduros (Tab.2) e 30% representam precursores imaturos.
679 Elevação nas concentrações de células mais jovens, com proporções iguais
680 (50% maduros e 50% imaturos) é indicativo de resposta regenerativa ou defeito
681 na maturação. Se blastos estiverem super-representados (maior que 30%)
682 investiga-se neoplasia (COWELL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2016). Na tabela
683 3 são descritos os padrões de maturação celular.

684 Na microscopia verifica-se a presença de displasias e/ou atipias (Fig.4),
685 ou seja, se há ou não células da linhagem megacariocítica realizando
686 emperipolese (fagocitando neutrófilos e outros tipos celulares), se apresentando
687 na forma de micromegacariócitos (menos de 20 μm) ou contendo núcleos
688 pequenos, arredondados e soltos (sem endomitose, desconectados),
689 hipolobulados (geralmente mononucleares) ou hiperlobulados (WEISS, 2005;

690 OLIVEIRA et al., 2016). Quando presentes e associados há contagens
 691 plaquetárias menores que 100.000/mm³ ou µ/L, a medula óssea encontra-se
 692 dismegacariopoiética, indicando presença de mielodisplasia. Contudo, é
 693 necessário que o mínimo de 30 células da linhagem sejam visualizadas e
 694 proporções iguais ou superiores à 10% destas encontrem-se atípicas (HARVEY,
 695 2001; COWELL et al., 2009; STOCKHAM e SCOTT, 2011; OLIVEIRA et al.,
 696 2016).

697 Como foi demonstrado, o mielograma, assim como a histologia, é um
 698 exame complementar complexo, composto por várias etapas de avaliação, e é
 699 essencial para investigar e/ou confirmar patologias que não podem ser
 700 diagnosticadas somente com os demais exames complementares disponíveis na
 701 rotina médica veterinária.

702

703 **Tabela 2.** Células da linhagem megacariocítica reconhecidas
 704 microscopicamente.

CÉLULAS	CARACTERÍSTICAS EM CONDIÇÕES FISIOLÓGICAS
Megacarioblastos	Célula relativamente grande com núcleo único, arredondado ou ovalado e muito grande (ocupa quase toda a célula-alta relação núcleo:citoplasma) contendo cromatina frouxa, porém, os núcleos costumam parecer mais densos quando comparado com outros tipos de blastos. Raramente são vistas formas multinucleadas. Os nucléolos são em número variado, mas nem sempre estão visíveis. O citoplasma é escasso, agranular, com intensa basofilia e pode conter número variável de vacúolos. Está presente em quantidades muito baixas em aspirado medular normal.
Promegacariócitos	Célula maior que o megacarioblasto. Apresenta dois a quatro núcleos que podem parecer separados, mas estão ligados por finas linhas de material nuclear. A cromatina é mais densa, sem nucléolos, e citoplasma um pouco mais abundante que a fase anterior, contudo, permanece intensamente basofílico, com vacúolos e contém contorno irregular.
Megacariócito basofílico	Megacariócito imaturo. Célula gigante contendo mais de quatro núcleos que são unidos formando uma massa lobulada. Apresenta citoplasma mais abundante e menos basofílico que as fases anteriores. Também pode conter vacúolos e contorno irregular. Pode se tornar plaquetogênico dependendo da necessidade do organismo.
Megacariócito eosinofílico	Megacariócito maduro. Ligeiramente maior que a anterior, com quantidade de citoplasma mais abundante e coloração variando de anfofílica à eosinofílica. Finas granulações de cor magenta estão

presentes. As características nucleares se mantêm semelhantes à linhagem anterior.
Fase que demonstra intensa plaquetogênese.

705 COWELL et al. (2009); OLIVEIRA et al. (2016).

706

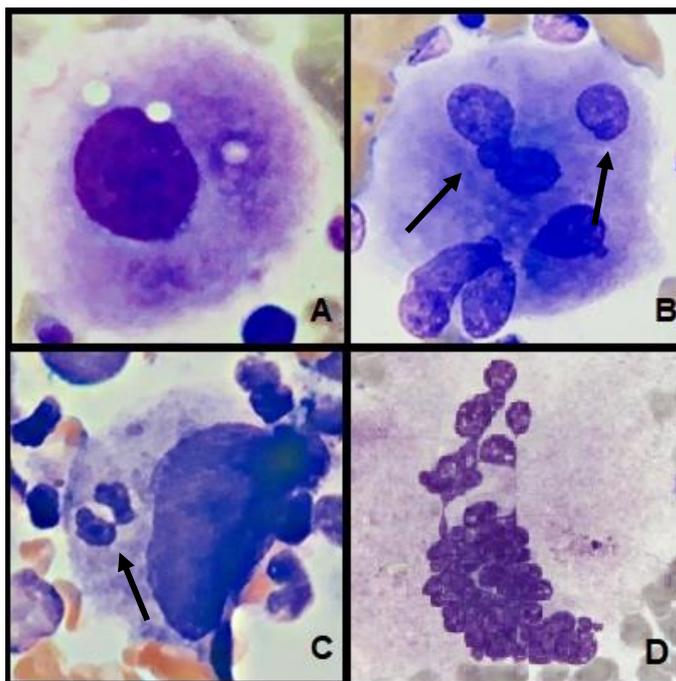
707

Tabela 3. Interpretação dos padrões de maturação celular.

PADRÃO	CARACTERÍSTICAS	SIGNIFICADO CLÍNICO
Ordenado	Todos os estágios de maturação presentes em proporções normais. Blastos são incomuns (<5%). Células imaturas (<30%). Células maduras (>70%).	Animais saudáveis.
Desvio à esquerda	Todos os estágios de maturação presentes e ordenados, exceto pelos estágios iniciais que estão super-representados.	Início ou fim de hiperplasia. Leucemia.
Desvio à direita	Todos os estágios de maturação presentes e ordenados, exceto pelos estágios finais que estão super-representados.	Início de hipoplasia. Início de recuperação da medula óssea.
Retardado	Todas as células estão no compartimento blástico e/ou proliferativo, com ausência do compartimento de maturação após este estágio.	Doença mieloproliferativa. Destruição imunomediada dos estágios finais.
Discrasia/displasia	Aumento inadequado de células blásticas e/ou células morfológicamente atípicas.	Doenças mieloproliferativas. Síndrome mielodisplásica. Toxicidade. Drogas/quimioterapia. Início de neoplasia (leucemia).
Neoplasia	Intenso aumento de blastos (>30%) e precursores jovens com mínimo de maturação. Presença de células anômalas.	Leucemia. Linfoma. Neoplasia metastática.

708 Cowell et al., (2009).

709



710 **Figura 4. Displasias megacariocíticas.** **A)** Micromegacariócito mononuclear (hipolobulado). **B)**
 711 Núcleos múltiplos, arredondados e soltos (setas). **C)** Emperipolese de neutrófilo (seta)
 712 (OLIVEIRA et al., 2016). **D)** Hiperlobulação. (VACARI, 2020).
 713

714

715 1.4. MATERIAL E MÉTODOS

716 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da
 717 Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Ceua/UFMS), sob o
 718 protocolo de número 951/2018.

719 Para a pesquisa foram utilizados materiais biológicos colhidos de 90 cães
 720 e o estudo foi dividido em duas etapas: na primeira fase realizou-se a análise do
 721 perfil hemostático em amostras sanguíneas de 40 animais. Destes, 06
 722 representaram o grupo controle e 34 eram positivos para *Leishmania (L.)*
 723 *infantum chagasi*. Já na segunda etapa investigou-se amostras sanguíneas e de
 724 medula óssea de 50 cães, sendo 5 hígidos e 45 portadores da LVC. As
 725 respectivas metodologias das duas etapas são descritas nos próximos capítulos.

726

727 1.5. IMPACTO ECONÔMICO, SOCIAL, TECNOLÓGICO E/OU 728 INOVAÇÃO

729 A LV é uma enfermidade infecciosa parasitária zoonótica presente nos
 730 cinco continentes que acomete diferentes espécies de mamíferos e cursa com
 731 variedade de manifestações clínicas em diferentes níveis de gravidade. Dentre
 732 elas, os sinais indicativos de hemorragias sugerem a presença de anormalidades

733 hematológicas e hemostáticas que podem se transformar em emergências
734 médicas.

735 Esta pesquisa é fundamentada na aplicação de metodologias de
736 diagnóstico laboratorial que permitem a avaliação completa do sistema
737 hemostático para investigar causas de hemorragias em cães portadores de LV
738 e, também, analisar o comportamento da resposta plaquetária nesses pacientes.
739 Os resultados impactam no direcionamento de conduta médica mais específica,
740 permitindo a aplicação de tratamentos que podem melhorar o prognóstico e
741 reduzir a chance de ocorrência de óbitos. Cabe destacar que devido as
742 semelhanças entre a fisiopatogenia canina e humana durante a infecção e
743 resposta imunológica, os resultados também podem ser aplicados para seres
744 humanos.

745 Em relação aos ensaios laboratoriais na medicina veterinária, este
746 trabalho pode impactar no uso de um perfil hemostático mais completo com
747 inclusão de novos parâmetros de análise que permitem ampliar a busca por
748 informações. Além disso, os resultados podem contribuir na elaboração de novo
749 protocolo para avaliação e interpretação de resposta plaquetária de maneira
750 menos invasiva, se assemelhando a análise eritrocitária, permitindo diminuir o
751 estresse que constitui um fator importante durante o processo de recuperação
752 de um paciente.

753

754 **1.6. REFERÊNCIAS**

755 ADRIOLO, A. BALLARATI, C.A.F.; GALORO, C.A.O.; MENDES, M.E.; MELO,
756 M.R.; SUMITA, N.M. Mielograma. In: **Recomendações da Sociedade**
757 **Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Coleta e**
758 **Preparo da Amostra Biológica**. Barueri-SP: Manole, p. 165-172, 2014.

759 ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K.C.H.; TAKAHIRA, R.K.
760 Mielograma. Parte I: indicações e colheita do material. **Rev. Educ. Cont. CRMV-**
761 **SP**, v. 05, fascículo 2, p.157-163, 2002.

762 ALEXANDER, W.S. Thrombopoietin. **G. Factors**, v. 17, p. 13–24, 1999.

763 ALVES, A. C. Histologia da Medula Óssea. **Rev. Bras. de Hematol. e Hemot.**,
764 São Paulo, 2009, v. 31, n. 3, p. 183-188.

765 ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin.**
766 **Dermatol.**, v.14, n.5, p.523-532,1996.

767 AULT, K.A.; RINDERM H.M.; MITCHELL, J.; CARMODY, M.B.; VARY, C.P.;
768 HILLMAN, R.S. The significance of platelets with increased RNA content
769 (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis. **Am. J. Clin.**
770 **Pathol.**, n.98, v.6, p. 637-646, 1992.

771 AULT, K.A.; KNOWLES C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated
772 platelets are the youngest platelets in circulation. **Exp. Haematol.**, v. 23, p. 996-
773 1001, 1995.

774 BADYLAK, S. F. Coagulation disorders and liver disease. **Vet. Clin. of North**
775 **America: S. Anim. Practice.**, v.18, n. 1, p. 87-93, 1988.

776 BAIN, B. J. Bone marrow aspiration. **J. of Clin. Pathol.**, v. 54, p. 657-663, 2001.

777 BOWLES, K.M.; COOKE, L.J.; RICHARDS, E.M.; BAGLIN, T.P. Platelet size has
778 diagnostic predictive value in patients with thrombocytopenia. **Clin. Lab.**
779 **Haematol.** v. 27, p. 370–373., 2005.

780 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento
781 de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da**
782 **leishmaniose visceral.** 1ed., 5 reimpr., Brasília: Ministério da Saúde, 120 p.,
783 2014.

784 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento
785 de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância em saúde.** 1ed., Brasília:
786 Ministério da Saúde, 542 p., 2016.

787 BUTTARELLO, M.; PLEBANI, M. Automated blood cell counts: state of the art. **Am.**
788 **J. Clin. Pathol.**, v. 130, n. 1, p. 104-16, 2008.

789 BUTTARELLO, M.; MEZZAPELLE, G.; FREGUGLIA, F.; PLEBANI, M. Reticulated
790 platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method
791 limitations. **Int. J. Lab. Hematol.** v. 42, p.363–370, 2020.

792 BOON, G.D. An Overview of Hemostasis. **Tox. Pathol.**, v.21, n.2, p. 170-179,
793 1993.

794 CARDOSO, A.I.Q. **Densidade parasitária em medula óssea de crianças com**
795 **Leishmaniose Visceral e sua relação com os aspectos clínicos,**
796 **laboratoriais e do tratamento.** 2010. 61p. Dissertação (Mestrado em Doenças
797 Infeciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de
798 Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil.

799 CASTRO, H.C.; FERREIRA, B.L.A.; NAGASHIMA, T. et al. Plaquetas: ainda um
800 alvo terapêutico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.42, n.5, p. 321-332, 2006.

801 CHULAY, J. D.; BRYCESON, A.D.M. Quantification of amastigotes of *Leishmania*
802 *donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis.
803 *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 32, n. 3, p. 475-479, may 1983.

804 CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M.E.; CORONA, M.;
805 LOMBARDI, P.; AVALLONE, L.; PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation
806 and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected
807 by *Leishmania infantum*. *Vet. J.*, v.169, n.3, p.465-467, 2005.

808 COMAR, S.R.; DANCHURA, H.M.; SILVA, P.H. Contagem de plaquetas: avaliação
809 de metodologias manuais e aplicação na rotina laboratorial. *Rev. Bras. Hematol.*
810 *Hemoter.*, v.31, n.6, 2009.

811 CORASH, L.; CHEN, H.Y.; LEVIN, J.; BAKER, G.; MOK, H.L. Regulation of
812 thrombopoiesis: effect of the degree of thrombocytopenia on megakaryocyte
813 ploidy and platelet volume. *Blood.* v.70, p.177-185, 1987.

814 CORONA, M.; CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M.E.;
815 SANTORO, D.; LOMBARDI, P. Haemostatic disorders in dogs naturally infected
816 by *Leishmania infantum*. *Vet. Res. Commun.*, v.28, p.331-334, 2004.

817 COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. *Leishmania donovani*
818 infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances
819 myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood.*, v.95,
820 n.5., p.1642-1651, 2000.

821 COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. **Diagnóstico**
822 **citológico e hematologia de cães e gatos, terceira edição.** São Paulo:
823 Med.Vet, 476p., 2009.

824 CROCHEMORE, T.; PIZA, F.M.T.; RODRIGUES, R.R.; GUERRA, J.C.C.;
825 FERRAZ, L.J.R.; CORRÊA, T.D. A nova era da tromboelastometria. *Einstein*,
826 v.15, n.3, p. 380-385, 2017.

827 DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting.
828 *Science.*v.145, p.1310-1312, 1964.

829 DOMINGUEZ, M.; TORAÑO, A. *Leishmania* immune adherence reaction in
830 vertebrates. *Par. Immun.*, v.23, n.5, 259–265, 2001.

831 DUBE, B.; ARORA, A.; SINGH, V.P.; KUMAR, K.; SUNDER, S. Platelet function
832 studies in Indian kala-azar. *J. Trop. Med. Hyg.*, v.38, n.3, p.166–168, 1995.

833 EBBE, S.; STOHLMAN JR, F. Megakaryocytopoiesis in the rat. **Blood**. v.26, p.20–
834 34, 1965.

835 ERDOGAN, H.; URAL, K.; PASA, S. Relationship between mean platelet volume,
836 low-grade systemic coagulation and vitamin D deficiency in canine visceral
837 leishmaniasis. **Med. Weter**, v.75, n.8, p.493-496, 2019.

838 FARIAS, M. G.; BÓ, S. D. Importância clínica e laboratorial do volume plaquetário
839 médio. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 46, n. 4, p. 275-281, 2010.

840 FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G. O novo
841 modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas
842 implicações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.32, n.5, p. 416-421, 2010.

843 GAMT, P.; MCBRIDE, D.; HUMM, K. Abnormal platelet activity in dogs and cats –
844 impact and measurement. **The J. S. Animal Practice**, v.61, n.1.p.3-18, 2020.

845 GHALLOUSSI, D.; DHENGE, A.; BERGMEIER, W. New insights into cytoskeletal
846 remodeling during platelet production. **J. Thromb. Haemost.**, v. 17, n.9, p.1430–
847 1439, 2019.

848 GIBBINS, J. M. Platelet adhesion signalling and the regulation of thrombus
849 formation. **J. Cell. Sci.**, v. 117, p. 3415-25, 2004.

850 GIOVANETTI, T.V.; NASCIMENTO, A.G.; PAULA, J.P. Platelet indices: laboratory
851 and clinical applications. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 33, n.2, p.164–165,
852 2011.

853 HARVEY, J. W. Bone Marrow. In: **Atlas of Veterinary Hematology – Blood and**
854 **Bone Marrow of Domestic Animals**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.
855 86-190, 2001.

856 HOFFMAN, M.; MONROE, D.M. A cell-based model of hemostasis. **Thromb.**
857 **Haemost.**, v. 85, n. 6, p.958-965, 2001.

858 HOFFMANN, J.J. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. **Clin.**
859 **Chem. Lab. Med.**v. 52, n.8, p. 1107-1117, 2014.

860 HONSE, C.O.; FIGUEIREDO, F.B.; DE ALENCAR, N.X.; MADEIRA, M.F.;
861 GREMIÃO, I.D.; SCHUBACH, T.M. Disseminated intravascular coagulation in a
862 dog naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi from Rio de Janeiro -
863 Brazil. **BMC Vet. Res.**, 2013.

864 ITALIANO JR, J.E., LECINE, P.; SHIVDASANI, R.A.; HARTWIG, J.H. Blood
865 platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced
866 by differentiated megakaryocytes. **J. Cell. Biol.**, v.147, p. 1299–1312, 1999.

867 JACKSON, S.R.; CARTER, J.M. Platelet volume: laboratory measurement. and
868 clinical application. **Blood Rev.**, v.7, n.2, p. 104-113, 1993.

869 JUNG, H.; JEON, H.K.; KIM, H.J.; KIM, S.H. Immature platelet fraction:
870 establishment of a reference interval and diagnostic measure for
871 thrombocytopenia. **Korean. J. Lab. Med.**, v. 30, n. 5, p. 451-9, 2010.

872 KAUSHANSKY, K.; DRACHMAN, J. G. The molecular and cellular biology of
873 thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. **Oncog.**, v.21,
874 p.3359-3367, 2002.

875 KAUSHANSKY, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. **J.**
876 **Clin. Invest.**, v.115, n.2, p.3339-3347, 2005.

877 KAUSHANSKY, K. Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis.
878 **Blood.** v.111, n.3, p.981-986, 2008.

879 KNOWLES, S.; HOFFBRAND, A.V. Bone-marrow aspiration and trephine biopsy.
880 **Brit Med. Journ.**, p. 204-205, 1980.

881 KUTER, D.J.; ROSENBERG, R.D. The reciprocal relationship of thrombopoietin
882 (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced
883 thrombocytopenia in the rabbit. **Blood.** v.85, p. 2720–2730, 1995.

884 LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; MATTA, V.L.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT,
885 C.E.; SECUNDINO, N.F.; PIMENTA, P.F.; MARCONDES, M. Asymptomatic
886 dogs are highly competent to transmit Leishmania (Leishmania) infantum chagasi
887 to the natural vector. **Vet. Parasitology**, v.23, n.196, p.296-300, Sep. 2013.

888 LOKEN, M.R.; CHU, S.C.; FRITSCHLE, W.; KALNOSKI, M.; WELLS, D.A.
889 Normalization of bone marrow aspirates for hemodilution in flow cytometric
890 analyses. Cytometry – Part B – **Clin. Cytometry**, v. 76B, p. 27-36, 2009.

891 MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its
892 function as a biological amplifier. **Nature.** v.202, p. 498-499, 1964.

893 MACHLUS, K. E.; ITALIANO JR, J.E. The incredible journey: From megakaryocyte
894 development to platelet formation. **J. Cell Biol.**, v. 201, n.6, p. 785–796, 2013.

895 MANN, K.G.; BRUMMEL, K.; BUTENAS, S.J. What is all that thrombin for?
896 **Thromb. Haemost.**, v.1, n.7, p. 1504-1514,2003

897 MISCHKE, R.; BUSSE, L.; BARTELS, D.; GLASER, S.; KREIENBROCK, L.
898 Quantification of thrombopoietic activity in bone marrow aspirates of dogs. **Vet.**
899 **J.**v.164, n. 3, p. 269-274, 2002.

900 MOMO, C.; JACINTHO, A.P.P.; MOREIRA, P.R.R.; MURANI, D.P.; MACHADO,
901 G.F.; VASCONCELOS, R.O. Morphological Changes in the Bone Marrow of the
902 Dogs with Visceral Leishmaniasis. *Vet. Med. Int.*, p.1-5, 2014.

903 MONTEIRO, L. Valores de referência dos índices plaquetários e construção de
904 algoritmo para liberação do plaquetograma. **RBAC**, v.49, n.3, p.263-267, 2017.

905 MORENO, P. Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis. **The**
906 **Vet. Record**, v.144, n.7, p.169-171, 1999.

907 MYLONAKIS, M.E.; DAY, M.J.; LEONTIDES, L.S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.;
908 KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.; PETANIDES, T.; FARMAKI, R.;
909 ATHANASIOU, L. Type of smear may influence thrombopoietic cell counts in the
910 bone marrow of clinically healthy dogs. **Vet. Clin. Pathology**, v. 34, n.4, p 358-
911 361, 2005.

912 NICHOL, J.L.; HOKOM, M.M.; HORNKOHL, A; SHERIDAN, W.P.; OHASHI, H.;
913 KATO, T.; LI, Y.S.; BARTLEY, T.D.; CHOI, E.; BOGENBERGER, J.
914 Megakaryocyte growth and development factor. Analyses of in vitro effects on
915 human megakaryopoiesis and endogenous serum levels during chemotherapy-
916 induced thrombocytopenia. **J. Clin. Invest.** v.95, n.6, p.2973–2978, 1995.

917 OGEDEGBE, H.O. An Overview of Hemostasis. **Lab. Med.**, v. 33, n. 12, p.948–
918 953, 2002.

919 OLIVEIRA, R.A.; PEREIRA, J.; BEITLER, B. **Mielograma e imunofenotipagem**
920 **por citometria de fluxo em hematologia, prática e interpretação.** Rio de
921 Janeiro: Roca, 440 p., 2016.

922 **PAHO-PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION.** Atlas interativo de
923 leishmanioses nas américas, aspectos clínicos e diagnósticos diferenciais, 2021.
924 Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/54129> Acesso em: 23 de
925 julho de 2021.

926 PAAR, M.; ROSSMANN, C.; NUSSHOLD, C. Anticoagulant action of low,
927 physiologic, and high albumin levels in whole blood. **PLoS One**, v.12, n. 8, 2017.

928 PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA,
929 R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine
930 control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil.
931 **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, n.5, p.510-517, 2001.

932 PATRÍCIO, D.F.M. **Diagnóstico diferencial de patologia plaquetar por**
933 **metodologias de agregometria e citometria de fluxo.** 2017.45p. Dissertação

934 (Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública) – Instituto Politécnico de
935 Coimbra, Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Departamento
936 de Análises Clínicas e Saúde Pública, Coimbra, Portugal.

937 RICHARDSON, J.L.; SHIVDASANI, R.A.; BOERS, C.; HARTWIG, J.H.; ITALIANO
938 JR, J.E. Mechanisms of organelle transport and capture along proplatelets during
939 platelet production. **Blood**. v. 106, p.4066–4075, 2005.

940 RIDDEL JR, J.P.; AOUIZERAT, B.E; MIASKOWSKI C.; LILLICRAP, D.P. Theories
941 of blood coagulation. **J. Pediatr. Oncol. Nurs.**, v. 24, n. 3, p. 123-131, 2007.

942 RODRIGUES, E.S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; COVAS, D.T.; FONTES, A.M.
943 Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Rev. Univ. Vale do Rio**
944 **Verde, Três Corações**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

945 RUSSEL, K.E. Platelet kinetics and laboratory evaluation of thrombocytopenia. In:
946 WEISS, D.J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**, sixth edition.
947 Iowa: Wiley-Blackwell, p.576-585, 2010.

948 RYAN, D. H.; FELGAR, R. E. Examination of the marrow. In: LICHTMAN, M.;
949 BEUTLER, E.; KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T.; SELIGSOHN, U.; PRCHAL, J.
950 **Williams Hematology**. 7 ed. New York: McGraw-Hill Professional, p. 21-31,
951 2005.

952 SCHULZE, H.; SHIVDASANI, R.A. Mechanisms of thrombopoiesis. **J. Thromb.**
953 **Haemost.**, v. 3, n. 8, p. 1717-24, 2005.

954 SHIVDASANI, R.A.; ROSENBLATT, M.F.; ZUCKER-FRANKLIN, D.; JACKSON,
955 C.W.; HUNT, P.; SARIS, C.J.; ORKIN, S.H. Transcription factor NF-E2 is required
956 for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in
957 megakaryocyte development. **Cell**, v.81, n.5, p.695-704, 1995.

958 SINGH, U.K.; PRASAD, R.; JAISWAL, B.P.; SINGH, P.K.; THAKUR, C.P.
959 Amphotericin B therapy in children with visceral leishmaniasis: daily vs. alternate
960 day, a randomized trial. **J. Trop. Pediatr.**, v.56, n.5, p.321-324, 2010.

961 SMITH, S.A. The cell-based model of coagulation. **J. Vet. Emerg. Crit. Care (San**
962 **Antonio)**, v. 19, n.1, p. 3-10, 2009.

963 SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI,
964 M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet
965 guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit.**
966 **Vectors**, v.4, p.1-16, 2011.

967 STENBERG, P.E.; LEVIN, J. Mechanisms of platelet production. **B. Cells**, v,15,
968 n.1, p.23-47, 1989.

969 STOCKHAM, S.L.; SCOTT, MA. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**.
970 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 729p., 2011.

971 SUCKER, C.; ZOTZ, R.B. The Cell-Based Coagulation Model. In: **Perioperative**
972 **Hemostasis**. Berlin: Springer, p. 3-11, 2015.

973 **SYSMEX**. Fração de plaquetas imaturas (IPF). Disponível em:
974 [https://www.sysmex.es/n/es-pt/academia/knowledge-centre/parametros-](https://www.sysmex.es/n/es-pt/academia/knowledge-centre/parametros-sysmex/immature-platelet-fraction-ipf.html)
975 [sysmex/immature-platelet-fraction-ipf.html](https://www.sysmex.es/n/es-pt/academia/knowledge-centre/parametros-sysmex/immature-platelet-fraction-ipf.html) Acesso em: 23 de julho de 2021

976 TEIXEIRA-NETO, R.G.; DA SILVA, E.S.; NASCIMENTO, R.A.; BELO, V.S.; DE
977 OLIVEIRA, C.L.; PINHEIRO, L.C.; GONTIJO, C.M.F. Canine visceral
978 leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study
979 involving spatial analysis. **Par. & Vect.**, v.7, n.485, p.1-10, 2014.

980 TEMIZEL, E.M.; CIHAN, H.; YILMAZ, Z.; AYTUG, N. Evaluation of erythrocyte and
981 platelet indices in canine visceral leishmaniasis. **Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.**,
982 v. 58, p. 185-188, 2011.

983 THREATTE, G.A. Usefulness of the mean platelet volume. **Clin. Lab. Med.**, v.13,
984 n.4, p.937-950, 1993.

985 THOMPSON, C.B.; LOVE, D.G.; QUINN, P.G.; VALERI, C.R. Platelet size does
986 not correlate with platelet age. **Blood**. v. 62, p. 487–494, 1983.

987 THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALISON, R.W. **Vet. Hemat. Clin. Chemistry**. 2nd
988 ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 784p., 2012.

989 TOMMASI, A.S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T; TASCA, CANTACESSI, C.;
990 BREITSCHWERDT, B.D.; STANNECK, D.; DANTAS-TORRES, F.; BANETH, G.
991 CAPELLI, G.; CAPRARIIS, D. Evaluation of blood and bone marrow in selected
992 canine vector-borne diseases. **P. Vectors**, v. 7, p.1-10, 2014.

993 TORRES, M.M.; ALMEIDA, A.B.; PAULA, D.A.; MENDONÇA, A.J.; NAKAZATO,
994 L.; PESCADOR, C.A.; SOUSA, V.R. Hemostatic assessment of dogs associated
995 with hepatic parasite load of *Leishmania infantum* chagasi. **Ver. Bras. Parasitol.**
996 **Vet.**, v.25, n.2, p.244-247, 2016.

997 TRAVLOS, G.S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow.
998 **Toxic.Pathol.** n. 34, v. 5, p. 548 565, 2006.

999 VACARI, P. Serviço de Hematologia do Hospital do Servidor Público do Estado de
1000 São Paulo. Aspirado de Medula Óssea de portador de Síndrome Mielodisplásica,
1001 2020.

1002 VALLADARES, J.E.; RUIZ DE GOPEGUI, R.; RIERA, C.; ALBEROLA, J.;
1003 GÁLLEGO, M.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ARBOIX, M. Study of haemostatic
1004 disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Res. Vet. Sci.*,
1005 v.64, n.3, p.195-198, 1998.

1006 ZAMORA-GONZÁLES, Y. Pruebas del coagulograma y componentes de la
1007 hemostasia. Utilidad para diagnosticar las diátesis hemorrágicas. **Rev. Cub.**
1008 **Hematol., Inmunol. y Hemot.**, v.28, n.2, p.141-150, 2012.

1009 WEISS, D.J. Recognition and Classification of Dysmyelopoiesis in the Dog: A
1010 Review. **J. Vet. Intern. Med.**, v.19, p.147–154, 2005.

1011 **WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Leishmaniasis. 2019. Disponível em:
1012 <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 23 de julho de 2021.

1013 **2. CAPÍTULO II – PERFIL HEMOSTÁTICO DE CÃES COM**
1014 **LEISHMANIOSE VISCERAL**

1015 Artigo formatado conforme as normas do periódico Arquivo
1016 Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1017 **Perfil hemostático de cães com Leishmaniose Visceral**

1018 *[Hemostatic profile of dogs with Visceral Leishmaniasis]*

1019

1020 T.R. Antunes^{1*}, P.M.P. da Silva², M.O. Castilho³, M.M. Madrid⁴, J.R.O. Maia⁵, G.G. de
1021 Oliveira⁶, A.I. Souza⁶

1022

1023 ¹ORCID: 0000-0002-5157-9708, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS.

1024 *Autor para correspondência: tamires_ramborger_antunes@hotmail.com

1025 ²ORCID: 0000-0001-5884-5143 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1026 ³ORCID: 0000-0002-8460-2070, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1027 ⁴ORCID: 0000-0000-0000-0000, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1028 ⁵ORCID: 0000-0000-0000-0000, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1029 ⁶ORCID: 0000-0002-1757-919X, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1030 ⁷ORCID: 0000-0002-8372-6047, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1031

1032 **RESUMO**

1033 A análise de componentes hemostáticos é necessária para investigar quadros
1034 hemorrágicos que ocorrem na leishmaniose visceral. O objetivo com este estudo foi
1035 avaliar o perfil hemostático de cães infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania)*
1036 *infantum chagasi*. Quando comparado com o grupo controle, não foram observadas
1037 diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) para todos os parâmetros estudados. A
1038 análise de biomarcadores hemostáticos neste estudo não demonstrou alterações
1039 importantes que levariam ao desenvolvimento de quadros hemorrágicos nos cães com
1040 LV. A ausência de lesão hepática e/ou alteração de função renal pode justificar esses
1041 resultados.

1042 Palavras-chave: canino, coagulação, *Leishmania*

1043

1044 **ABSTRACT**

1045 *The analysis of hemostatic components is necessary to investigate hemorrhagic*
1046 *conditions that occur in visceral leishmaniasis. The aim of this study was to evaluate the*
1047 *hemostatic profile of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) infantum*
1048 *chagasi. When compared with the control group, no statistically significant differences*
1049 *($p > 0.05$) were observed for all parameters studied. The analysis of hemostatic*
1050 *biomarkers in this study did not demonstrate any important changes that would lead to*

1051 *the development of hemorrhagic conditions in dogs with LV. The absence of liver damage*
1052 *and / or changes in renal function may justify these results.*

1053 *Keywords: canine, coagulation, Leishmania*

1054

1055

INTRODUÇÃO

1056 A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose parasitária negligenciada de grande
1057 importância para a saúde pública (WHO, 2019). No Brasil, é causada pelo protozoário
1058 *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* e o cão ainda é o principal reservatório da
1059 doença (Shaw, 2002; Brasil, 2014; 2016).

1060 A LV apresenta epidemiologia complexa, acometendo diversas espécies de
1061 mamíferos. Em cães a doença caracteriza-se por ser sistêmica, afetando diferentes órgãos.
1062 Assim, animais infectados, quando sintomáticos, apresentam sinais clínicos inespecíficos
1063 e variáveis (Baneth *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011), entretanto, distúrbios
1064 hemorrágicos como epistaxes, hematúria, petéquias, sangramentos digestivos e sufusões
1065 tem sido observadas e representam, na maioria dos casos, emergências médicas com risco
1066 de óbito se não tratadas adequadamente (Valladares *et al.*, 1998; Stockham e Scott, 2011;
1067 Solano-Gallego *et al.*, 2011).

1068 A presença de plaquetopenia frequentemente é descrita na LV (Ciaramella *et al.*,
1069 2005; Petanides *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011), contudo, a hemostasia é um
1070 sistema dinâmico complexo em que há o envolvimento de várias componentes e
1071 processos que precisam ser destrinchados e investigados (Smith, 2009; Ferreira *et al.*,
1072 2010; Rodrigues *et al.*, 2012).

1073 A determinação das concentrações de plaquetas e fibrinogênio e dos tempos de
1074 protrombina e tromboplastina parcial ativada representam os métodos frequentemente
1075 utilizados para a triagem investigativa (Stockham e Scott, 2011) e, nos últimos anos,
1076 outros parâmetros, tais como índices plaquetários, albumina e dímero-D tem sido
1077 incluídos para ampliar a busca por respostas, já que auxiliam na avaliação da dinâmica
1078 dos fatores de coagulação e na detecção de trombofilia, como a que ocorre na coagulação
1079 intravascular disseminada (CID) (Temizel *et al.*, 2011; Paar *et al.*, 2017; Erdogan *et al.*,
1080 2019).

1081 Até o presente momento, o enfoque principal das descrições científicas para
1082 justificar processos hemorrágicos em cães com LV tem se destinado à avaliação das
1083 concentrações plaquetárias e eritrocitárias. Os perfis hemostáticos realizados ainda são
1084 insuficientes uma vez que demonstram resultados variáveis e, conseqüentemente ainda

1085 inconclusivos. Portanto o objetivo com este estudo é avaliar o perfil hemostático de cães
1086 infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

1087

1088

MATERIAL E MÉTODOS

1089 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação
1090 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Ceua/UFMS), sob o protocolo de número
1091 951/2018.

1092 Para o estudo foram utilizados 40 cães adultos sem restrição de sexo, peso e raça,
1093 cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Campo Grande,
1094 MS. Desses, 34 eram positivos para *Leishmania (L.) infantum chagasi* (grupo LV) em
1095 ensaio sorológico imunoenzimático (DPP®, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Brasil) e em
1096 reação em cadeia da polimerase – PCR (Cortes *et al.*, 2009). O conjunto dos resultados
1097 das análises de amostras de seis animais hígidos, negativos para *Leishmania sp.* e
1098 infecções por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis* e *Hepatozoon canis*,
1099 foram utilizados como valores de referência desta espécie (grupo controle). Cães
1100 positivos tratados para LV e/ou contendo comorbidades foram excluídos do estudo
1101 devido a possível interferência destes fatores em parâmetros hematológicos. As
1102 informações epidemiológicas quanto ao curso das manifestações clínicas estavam
1103 indisponíveis devido a procedência dos animais.

1104 Para realização de exames laboratoriais obteve-se amostras sanguíneas, por punção
1105 da veia jugular, que foram acondicionadas em tubos estéreis contendo citrato de sódio
1106 (1:9), anticoagulante EDTA k2, heparina de lítio e tubos com a ativador de coágulo para
1107 avaliação hemostática e análises bioquímicas séricas.

1108 O perfil de coagulação incluiu a avaliação plaquetária, incluindo índices obtidos
1109 por impedância – plaquetócrito (PCT), volume plaquetário médio (VPM), largura de
1110 distribuição plaquetária (PDW) e porcentagem de macroplaquetas com volume superior
1111 à 12 fL (PLC-R) –, mensuração dos tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial
1112 ativada (TTPa) e das concentrações de fibrinogênio, plaquetas, albumina e dímero-D.
1113 Para avaliação hepática e renal determinou-se as atividades séricas de alanina
1114 aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), além das concentrações de
1115 colesterol total, creatinina, ureia e fósforo. Os ensaios foram realizados utilizando-se de
1116 kits comerciais, aparelhos automáticos e semiautomáticos.

1117 A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk
1118 e a comparação entre os grupos, em relação aos parâmetros laboratoriais analisados, com

1119 os testes t de Student e Mann-Whitney para dados com distribuição paramétrica e não-
1120 paramétrica respectivamente. A análise de correlação de Spearman foi utilizada para
1121 investigar a associação entre parâmetros hemostáticos e bioquímicos séricos dos cães com
1122 LV. As diferenças foram consideradas significativas quando *p-value* <0,05.

1123

1124

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1125 Os dados dos cães do grupo controle neste estudo demonstraram distribuição com
1126 aproximação da normalidade ($p>0,05$) por meio da estatística de Shapiro-Wilk. As curvas
1127 das populações foram potencialmente simétricas indicando presença de média, mediana
1128 e moda semelhantes. Apesar do pequeno número amostral, os resultados dos cães não
1129 infectados podem ser utilizados como referência para espécie (Spiegel e Stephens, 2000;
1130 Stockham e Scott, 2011).

1131 Em relação aos ensaios, a análise laboratorial da hemostasia é realizada por meio
1132 da utilização de um conjunto de biomarcadores que permitem identificar alterações em
1133 cada etapa desse processo dinâmico (Stockham e Scott, 2011; Temizel *et al.*, 2011; Paar
1134 *et al.*, 2017; Erdogan *et al.*, 2019). Na tabela 1 são demonstrados os resultados da
1135 avaliação plaquetária nas amostras dos cães negativos e positivos para LV. É possível
1136 observar ausência de diferença estatística significativa ($p>0,05$) ao comparar os dados,
1137 entre os grupos, em relação às concentrações sanguíneas.

1138 As plaquetas são essenciais para hemostasia por serem responsáveis pela
1139 interrupção inicial temporária do fluxo de sangue após à lesão (Castro *et al.*, 2006;
1140 Ferreira *et al.*, 2010; Thrall *et al.*, 2012). Domínguez e Toraño, (2001) demonstraram *in*
1141 *vitro* que nas fases iniciais de infecção por *Leishmania* sp., o parasito pode interagir com
1142 as plaquetas por meio de imunoaderência, induzindo a formação de grandes agregados,
1143 gerando pseudotrombocitopenias *in vivo*.

1144 A presença de destruição ou consumo aumentado, imunoglobulinas anti-
1145 plaquetárias e alterações em trombopoiese também podem ser responsáveis pela
1146 ocorrência de plaquetopenia na LV (Ciaramella *et al.*, 2005; Petanides *et al.*, 2008;
1147 Stockham e Scott, 2011). Contudo, sugere-se que os cães do presente estudo não
1148 apresentaram essas anormalidades uma vez que demonstraram concentrações
1149 plaquetárias semelhantes ao grupo controle (Tab.1).

1150 Em relação aos índices plaquetários, os resultados das análises dos cães infectados
1151 se assemelharam aos animais hígidos (Tab.1). Entretanto, valores aumentados desses

1152 parâmetros já foram descritos na LVC (Temizel *et al.*; 2011), indicando presença de
 1153 plaquetas grandes e/ou formação de aglomerados plaquetários (Stockham e Scott, 2011).

1154 Macroplaquetas caracterizam-se por serem mais reativas e agregáveis, produzirem
 1155 mais tromboxano₂, apresentarem altas quantidades de grânulos densos e expressarem
 1156 mais glicoproteínas adesivas quando comparado a plaquetas menores e menos ativas
 1157 (Martin *et al.*, 2012). Devido à ausência de alteração em VPM, PDW e PLC-R (Tab.1),
 1158 deste modo é possível sugerir que os cães neste estudo não demonstraram risco
 1159 aumentando para o desenvolvimento de trombofilias (Comar e Silva, 2009; Souza *et al.*,
 1160 2016).

1161 Cabe destacar que devido à impossibilidade de realização de testes para a
 1162 verificação da função de plaquetas e, apesar de não serem constatadas diferenças
 1163 estatísticas significativas, é incerto afirmar que os cães com LV não apresentaram
 1164 alterações no componente plaquetário.

1165

1166 **Tabela 1.** Medianas e quartis dos resultados das análises laboratoriais para avaliação
 1167 plaquetária em amostras de cães negativos (grupo controle) e positivos para Leishmaniose
 1168 Visceral.

Parâmetros Laboratoriais	GRUPOS	
	CONTROLE	LV
	Med (1ºQ; 3ºQ)	Med (1ºQ; 3ºQ)
PLT (10 ³ /µL)	349,50 ^A (280,75; 365,00)	295,00 ^A (202,00; 388,00)
PCT (%)	0,36 ^a (0,32; 0,41)	0,29 ^a (0,23; 0,41)
VPM (fL)	10,30 ^a (9,50; 13,70)	11,20 ^a (9,80; 12,10)
PDW (fL)	12,00 ^a (11,33; 14,18)	13,00 ^a (11,00; 14,70)
PLC-R (%)	33,82 ^a (24,30; 41,05)	33,98 ^a (24,00; 44,00)

1169 Abreviações: Md: mediana; 1ºQ: primeiro quartil; 3ºQ: terceiro quartil; PLT: plaquetas; PCT: plaquetócrito; VPM: volume plaquetário
 1170 médio; PDW: largura de distribuição plaquetária; PLC-R: porcentagem de macroplaquetas com volume superior à 12 fL. Medianas
 1171 seguidas de letras maiúsculas e minúsculas iguais entre colunas indicam ausência de diferença estatística pelo teste t de Student e
 1172 Mann-Whitney (p>0,05) respectivamente.

1173

1174 Ao avaliar a integridade das substâncias pro-coagulantes nas fases de iniciação e
 1175 propagação da coagulação *in vivo* por meio dos testes de TP e TTPA *in vitro* e dosagem
 1176 de fibrinogênio (Smith, 2009; Ferreira *et al.*, 2010; Stockham e Scott, 2011), não foram
 1177 observados prolongamentos dos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada
 1178 e alterações nas concentrações dessa proteína plasmática nos cães com LV (p>0,05). A
 1179 presença de alterações em fatores de coagulação e hipofibrinogenemia ou
 1180 afibrinogenemia podem resultar em intensos processos hemorrágicos (Ferreira *et al.*,
 1181 2010; Stockham e Scott, 2011; Rodrigues *et al.*, 2012; Chambers, 2013; Jolivet *et al.*,

1182 2017), contudo, no presente estudo os dados indicaram ausência de alterações
 1183 laboratoriais clinicamente relevantes (Tab.1) e corroboraram com outros autores
 1184 (Valladares *et al.*, 1998; Moreno, 1999; Ciaramella *et al.*, 2005; Petanides *et al.*, 2008;
 1185 Torres *et al.*, 2016; Pasa *et al.*, 2017).

1186

1187 **Tabela 2.** Medianas e quartis dos resultados das análises laboratoriais estudadas em
 1188 amostras de cães negativos (grupo controle) e positivos para Leishmaniose Visceral.

Parâmetro Laboratoriais	GRUPOS	
	CONTROLE Med (1ºQ; 3ºQ)	LV Med (1ºQ; 3ºQ)
Fibrinogênio (mg/dL)	175,23 ^a (116,47; 245,64)	204,92 ^a (121,85; 379,58)
TP (seg.)	7,37 ^a (6,44; 7,70)	7,80 ^a (6,79; 8,94)
TTPa (seg.)	13,78 ^a (7,74; 20,42)	14,29 ^a (9,87; 28,83)
DÍMERO-D (µg/mL)	0,10 ^a (0,10; 0,11)	0,10 ^a (0,10; 0,13)

1189 Abreviações: Md: mediana; 1ºQ: primeiro quartil; 3ºQ: terceiro quartil. TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de tromboplastina
 1190 parcial ativado. Médias seguidas de letras maiúsculas iguais entre colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney
 1191 ($p>0,05$).

1192 .

1193 De acordo com os achados de Erdogan *et al.* (2019), tempos prolongados podem
 1194 ser detectados apenas quando os cães apresentaram estágios mais graves da doença. A
 1195 inexistência de lesão hepática e anormalidades em função renal, demonstrados por meio
 1196 dos valores de ALT, AST, colesterol total, creatinina, ureia e fósforo (Tab.3), podem
 1197 justificar os resultados do presente estudo, já que a maioria dos componentes da cascata
 1198 de coagulação são produzidos em hepatócitos e substâncias anticoagulantes
 1199 (antitrombina, por exemplo) são perdidas excessivamente por meio da urina na presença
 1200 de nefropatia (Eberst e Berkowitz, 1994; Riyuzo e Soares, 1995; Stockham e Scott, 2011).

1201 Moreno (1999) descreveu prolongamento de TTPa em associação à elevação de
 1202 atividade da ALT em cães com LV e, de acordo com Badylak (1988), o tipo, a gravidade
 1203 e a cronicidade da lesão hepática pode influenciar no aumento ou diminuição de um ou
 1204 mais fatores. Doença renal frequentemente é relatada na LVC e pode ser leve, progredir
 1205 para doença crônica, síndrome nefrótica ou insuficiência renal (Solano-Gallego *et al.*,
 1206 2011), tornando os animais susceptíveis a desordens de coagulação. Entretanto, devido à
 1207 ausência de cães com indícios dessas condições, não foi possível afirmar presença de
 1208 associação entre alterações hepáticas-renais e distúrbios hemostáticos, uma vez que os
 1209 valores de *p-value* não foram significativos ($p>0,05$) (Tab.4).

1210 Em relação a albumina, essa proteína caracteriza-se por ser um importante
 1211 componente do organismo, atuando em diferentes processos fisiológicos (Miller e

1212 Jedrzejczak, 2001). Na hemostasia, estudos ainda são controversos, com descrições de
 1213 ação pró-coagulante, por induzir a ativação de fator tecidual (Liu *et al.*, 1997), e
 1214 anticoagulante, seja inibindo a agregação plaquetária ou apresentando atividade
 1215 semelhante a heparina, ligando-se à antitrombina III que promove a inativação de fatores
 1216 de coagulação (Joorgensen e Stoffersen, 1979;1980; Paar *et al.*, 2017).

1217 No presente estudo, concentrações inferiores de albumina foram constatadas nos
 1218 cães com LV (Tab.3) e, uma vez que os valores de TP, TTPA e biomarcadores hepáticos
 1219 e renais se assemelharam aos do grupo controle, sugere-se que não houve influência desse
 1220 analito na coagulação *in vitro*. O processo inflamatório devido à infecção do parasito
 1221 promove a menor produção de albumina por hepatócitos em resposta às citocinas
 1222 (interleucinas 1 e 6) e, conseqüentemente, desencadeia a redução das concentrações
 1223 sanguíneas dessa proteína (Stockham e Scott, 2011), justificando os resultados obtidos.

1224

1225 **Tabela 3.** Medianas e quartis dos resultados das análises laboratoriais estudadas em
 1226 amostras de cães negativos (grupo controle) e positivos para Leishmaniose Visceral.

Parâmetros Laboratoriais	GRUPOS	
	CONTROLE Med (1ºQ; 3ºQ)	LV Med (1ºQ; 3ºQ)
ALT (UI/L)	37,50 ^a (29,45; 60,32)	32,20 ^a (26,30; 42,57)
AST (UI/L)	28,15 ^a (25,05 29,07)	34,15 ^a (22,95; 54,97)
Colesterol Total (mg/dL)	217,00 ^a (190,75; 283,00)	218,00 ^a (181,25; 253,75)
Creatinina (mg/dL)	0,80 ^a (0,70; 0,90)	0,5 ^a (0,4; 0,7)
Ureia (mg/dL)	27,70 ^a (25,47; 33,90)	35,15 ^a (20,10; 52,90)
Fósforo (mg/dL)	4,26 ^a (4,25; 4,91)	5,09 ^a (4,63; 5,96)
Albumina (g/dL)	3,80 ^a (3,50; 4,17)	2,25 ^b (1,72; 3,10)

1227 Abreviações: Md: mediana; 1ºQ: primeiro quartil; 3ºQ: terceiro quartil ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato
 1228 aminotransferase. Medianas seguidas de letras minúsculas iguais entre colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-
 1229 Whitney (p>0,05).

1230

1231 **Tabela 4.** Análises de correlação entre parâmetros hemostáticos e analitos séricos em
 1232 cães com leishmaniose visceral.

Analitos Séricos	PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS		
	TP R (p-value)	TTPa R (p-value)	Fibrinogênio R (p-value)
ALT	0,1757 (0,32)	-0,1592 (0,37)	-0,6560 (0,71)
AST	-0,0943 (0,60)	0,0695 (0,69)	-0,0084 (0,96)
Colesterol Total	-0,0784 (0,66)	0,0738 (0,68)	0,2584 (0,14)
Creatinina	0,0837 (0,64)	0,2155 (0,22)	0,1289 (0,47)
Ureia	0,0179 (0,92)	0,2853 (0,10)	-0,0857 (0,63)
Fósforo	0,1484 (0,40)	0,1967 (0,26)	-0,0228 (0,90)

1233 Abreviações: ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; TP: tempo de protrombina; TTPa: tempo de
1234 trombolastina parcial ativado. R: coeficiente de correlação de Spearman, nível de significância de 5%.

1235

1236 Os dímeros-D são fragmentos de fibrina que possibilitam, por meio de sua
1237 mensuração sanguínea, avaliar o aumento da fibrinólise associada à coagulação
1238 (Stockham e Scott, 2011). No presente trabalho, não houve evidências de distúrbios
1239 trombóticos devido à ausência de alterações significativas das concentrações desse analito
1240 quando comparado ao grupo controle (Tab.2).

1241 Apesar de concentrações elevadas já tenham sido relatadas em cães com LV (Pasa
1242 *et al.*, 2017), Erdogan *et al.* (2019) descreveram níveis aumentados de dímero-D somente
1243 em animais que apresentaram as formas mais graves da doença. Nesses casos, geralmente
1244 há doença renal crônica em estágios mais avançados, por vezes evoluída para síndrome
1245 nefrótica (Solano-Gallego *et al.*, 2011). Há aumento do risco de desenvolver trombose,
1246 seja por perda de antitrombina III, interferindo na modulação da coagulação, ou aumento
1247 de produção de tromboxano₂ associado à hiperlipidemia (Rasedee e Feldman, 1985;
1248 Green, 1988; Riyuzo e Soares, 1995; Stockham e Scott, 2011).

1249

1250

CONCLUSÕES

1251 A análise de biomarcadores hemostáticos neste estudo não demonstrou alterações
1252 importantes que levariam ao desenvolvimento de quadros hemorrágicos nos cães com
1253 LV. A ausência de lesão hepática e/ou alteração de função renal pode justificar esses
1254 resultados.

1255

1256

AGRADECIMENTOS

1257 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento
1258 de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da
1259 Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de
1260 Mato Grosso do Sul – Brasil (FUNDECT) – Código de Financiamento:
1261 FUNDECT/CNPq n.14/2015 PPP/MS-Processo 59/300.037/2015

1262

1263

REFERÊNCIAS

1264 BADYLAK, S. F. Coagulation disorders and liver disease. *Vet. Clin. of North America:*
1265 *S. Anim. Practice.*, v.18, n. 1, p. 87-93, 1988.

- 1266 BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Canine leishmaniosis
1267 - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.*, v.24,
1268 n.7, p.324-330, 2008.
- 1269 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
1270 Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1^a
1271 ed., 5^a reimpressão. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120p.
- 1272 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
1273 Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância em saúde. 1ed., Brasília: Ministério da
1274 Saúde, p.542, 2016.
- 1275 CASTRO, H.C.; FERREIRA, B.L.A.; NAGASHIMA, T. *et al.* Plaquetas: ainda um alvo
1276 terapêutico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.42, n.5, p. 321-332, 2006.
- 1277 CHAMBERS, G. Treatment of afibrinogenemia in a chihuahua. *Jorn. Am. Anim. Hosp.*
1278 *Assoc.*, v.49, n.1, p.70-74, 2013.
- 1279 CIARAMELLA, P., PELAGALLI, A.; CORTESE, L. *et al.* Altered platelet aggregation
1280 and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by
1281 *Leishmania infantum*. *The Vet. Journ.*, v. 169, n.3, p.465-467, 2005.
- 1282 COMAR, S.R.; SILVA, P.H. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos
1283 parâmetros de volume plaquetário. *RBAC*, v. 41, n.4, p.257-265, 2009.
- 1284 CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive
1285 tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-
1286 specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.98, p.12-17, 2004.
- 1287 DOMÍNGUEZ, M.; TORANO, A. *Leishmania* immune adherence reaction in vertebrates.
1288 *Par. Immun.*, v.23, n.5, 259-265, 2001.
- 1289 EBERST, M.E.; BERKOWITZ, LR. Hemostasis in renal disease: pathophysiology and
1290 management. *Am. J. Med.*, v. 96, n.2, p. 168-179, 1994.
- 1291 ERDOGAN, H.; URAL, K.; PASA, S. Relationship between mean platelet volume, low-
1292 grade systemic coagulation and vitamin D deficiency in canine visceral leishmaniasis.
1293 *Med. Weter*, v.75, n.8, p.493-496, 2019.
- 1294 FERREIRA, C.N.; SOUSA, M.O.; DUSSE, L.M.S.; CARVALHO, M.G. O novo modelo
1295 da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. *Rev. Bras.*
1296 *Hematol. Hemoter.* v.32, n.5, p. 416-421, 2010.
- 1297 GREEN, R.A. Pathophysiology of Antithrombin III Deficiency. *Vet. Clin. North Am.*
1298 *Small Anim. Pract.* v.18, n.1, p.95-104, 1988.

1299 JOLIVET, F.; DIQUÉLOU, A.; TRUMEL, C. *et al.* Fibrinogen deficiency in a dog - a
1300 case report. *BMC Vet Res.*, v.13, article 183, 2017.

1301 JOORGENSEN, K.A.; STOFFERSEN, E. Heparin like activity of albumin. *Thromb Res.*,
1302 v.16, n.3-4, p. 569-574, 1979.

1303 JOORGENSEN, K.A.; STOFFERSEN, E. On the inhibitory effect of albumin on platelet
1304 aggregation. *Thromb Res.*, v. 17, n.1-2, p. 13-18, 1980.

1305 LIU, L.; MURRAY, D.K.; DAMERON, C.T. *et al.* Biochemical characterization of
1306 procoagulant albumin. *Thromb Res.*, v.85, n.5, p. 399-411, 1997.

1307 MARTIN, J.F.; KRISTENSEN, S.D.; MATHUR, A., *et al.* The causal role of
1308 megakaryocyte–platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat. Rev. Cardiol.*,
1309 v. 9, n.11, p.658–670, 2012.

1310 MILLER, A.; JEDRZEJCZAK W.W. Albumin-biological functions and clinical
1311 significance. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, v.55, n.1, p.17-36, 2001.

1312 MORENO, P. Evaluation of secondary haemostasis in canine leishmaniasis. *The Vet.*
1313 *Record*, v.144, n.7, p.169-171, 1999.

1314 PAAR, M.; ROSSMANN, C.; NUSSHOLD, C. Anticoagulant action of low, physiologic,
1315 and high albumin levels in whole blood. *PLoS One*, v.12, n. 8, 2017.

1316 PASA, S.; URAL, K.; GULTEKIN, M. Interpretation of coagulation tendency
1317 contributing to thrombosis in vector-borne diseases (Ehrlichiosis, Anaplasmosis,
1318 Leishmaniosis, and Dirofilariasis) among dogs. *Acta Scient. Vet.*, v.45, n.1, p.1-7, 2017.

1319 PETANIDES, T.A.; KOUTINAS, A.F.; MYLONAKIS, M.E. *et al.* Factors associated
1320 with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*).
1321 *J. Vet. Intern. Med.*, v.22, n.4, p.866-872, 2008.

1322 RASEDEE, A.; FELDMAN, B.F. Nephrotic syndrome: A platelet hyperaggregability
1323 state. *Vet. Res. Commun.*, v.9, n.1, p.199-211, 1985.

1324 RIYUZO, M.C.; SOARES, V.A. Sistema de coagulação nas glomerulopatias. *J. Bras.*
1325 *Nefrol.*, v.17, n. 3, p.133-141, 1995.

1326 RODRIGUES, E.S.; CASTILHO-FERNANDES, A. COVAS, D.T.; FONTES, A.M.
1327 Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. *Rev. Univers. Vale do Rio Verde (Três*
1328 *Corações)*, v. 10, n.1, p. 218-233, 2012.

1329 SHAW, J.J. New World Leishmaniasis: The Ecology of Leishmaniasis and the Diversity
1330 of Leishmanial Species in Central and South America. *World Class Parasit.: Leishmania*,
1331 p. 11-31, 2002.

1332 SMITH, S.A. The cell-based model of coagulation. *J. Vet. Emerg. Crit. Care. (San*
1333 *Antonio)*, v.19, n.1, p.3-10, 2009.

1334 SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. *et al.* LeishVet guidelines for
1335 the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors*, v.4, p.1-16, 2011.

1336 SOUZA, A.M.; PEREIRA, J.J.; CAMPOS, S.D.E. *et al.* Platelet indices in dogs with
1337 thrombocytopenia and dogs with normal platelet counts. *Arch. Med. Vet.*, v. 48, p.277-
1338 281, 2016.

1339 SPIEGEL, M.R.; STEPHENS, L.J. *Estatística*. Porto Alegre: Bookman, 600p., 2000.

1340 STOCKHAM, S.L.; SCOTT, MA. *Fundamentos de patologia clínica veterinária*. 2 ed.
1341 Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2011, 729p.

1342 TEMIZEL, E.M.; CIHAN, H.; YILMAZ, Z.; AYTUG, N. Evaluation of erythrocyte and
1343 platelet indices in canine visceral leishmaniasis. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.*, v. 58, p.
1344 185-188, 2011.

1345 THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; CAMPBELL, T. *Veterinary Hematology*
1346 *and Clinical Chemistry*. 2nd ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012, 784p.

1347 TORRES, M.M.; ALMEIDA, A.B.P.F.; PAULA, D.A.J. *et al.* Hemostatic assessment of
1348 dogs associated with hepatic parasite load of *Leishmania infantum chagasi*. *Rev. Bras.*
1349 *Parasitol. Vet.* vol.25, n.2, p.244-247, 2016.

1350 VALLADARES, J.E.; RUIZ DE GOPEGUI, R.; RIERA, C. *et al.* Study of haemostatic
1351 disorders in experimentally induced leishmaniasis in Beagle dogs. *Res. Vet. Sci.*, v.64,
1352 n.3, p.195-198, 1998.

1353 WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. 2019. Disponível em:
1354 <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 23 de julho de 2021.

1355 **3. CAPÍTULO III – AVALIAÇÃO MEGACARIOCÍTICA E DE**
1356 **PLAQUETAS RETICULADAS EM CÃES COM LEISHMANIOSE**
1357 **VISCERAL**

1358 Artigo formatado conforme as normas do periódico Arquivo Brasileiro
1359 de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1360 **Megacariócitos e plaquetas reticuladas: mielodisplasias e dinâmica plaquetária em**
1361 **cães com Leishmaniose Visceral**

1362 *[Megakaryocytes and reticulated platelets: myelodysplasias and platelet dynamics in*
1363 *dogs with Visceral Leishmaniasis]*

1364

1365 T.R. Antunes^{1*}, P.M.P. da Silva², M.O. Castilho³, M.M. Madrid⁴, J.R.O. Maia⁵, G.G. de
1366 Oliveira⁶, A.I. Souza⁶

1367

1368 ¹ORCID: 0000-0002-5157-9708, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS.

1369

*Autor para correspondência: tamires_ramborger_antunes@hotmail.com

1370

²ORCID: 0000-0001-5884-5143 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1371

³ORCID: 0000-0002-8460-2070, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1372

⁴ORCID: 0000-0000-0000-0000, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1373

⁵ORCID: 0000-0000-0000-0000, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1374

⁶ORCID: 0000-0002-1757-919X, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1375

⁷ORCID: 0000-0002-8372-6047, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

1376

1377

RESUMO

1378 Não foram encontrados estudos envolvendo a análise megacariocítica e de *turnover*
1379 plaquetário em cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. O
1380 objetivo com esse trabalho é avaliar a medula óssea e dinâmica plaquetária, por meio da
1381 análise de plaquetas reticuladas circulantes, na leishmaniose visceral canina. Dentre as
1382 alterações morfológicas investigadas, micromegacariócitos e hiperlobulações podem
1383 estar associados à maior intensidade parasitária medular. A análise dos valores absolutos
1384 de plaquetas reticuladas na plaquetopenia revelou resposta arregenerativa devido
1385 comprometimento medular nos cães com LV. A interpretação dos resultados em
1386 porcentagem deve ser realizada com atenção especialmente na presença de valores
1387 plaquetários circulantes diminuídos.

1388 Palavras-chave: morfologia, medula óssea, plaquetopoiese, plaquetas imaturas,
1389 leishmania

1390

1391

ABSTRACT

1392 *No studies were found involving megakaryocytic analysis and platelet turnover in dogs*
1393 *naturally infected with Leishmania (L.) infantum chagasi. The objective of this work is to*
1394 *evaluate the bone marrow and platelet dynamics, through the analysis of circulating*

1395 *reticulated platelets, in canine visceral leishmaniasis. Among the morphological changes*
1396 *investigated, micromegakaryocytes and hyperlobulations may be associated with higher*
1397 *medullary parasitic intensity. The analysis of the absolute values of crosslinked platelets*
1398 *in thrombocytopenia revealed a non-regenerative response due to medullary involvement*
1399 *in dogs with VL. The interpretation of results in percentage must be carried out with*
1400 *attention, especially in the presence of decreased circulating platelet values.*

1401 *Keywords: morphology, bone marrow, thrombopoiesis, immature platelets, leishmania*

1402

1403

INTRODUÇÃO

1404 A Leishmaniose Visceral (LV), causada por protozoários do gênero *Leishmania*,
1405 é uma enfermidade de grande importância para a saúde pública que acomete diferentes
1406 espécies de mamíferos (WHO, 2019). Diversas anormalidades clínicas e laboratoriais são
1407 relatadas, tanto em seres humanos quanto animais (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Brasil,
1408 2014; 2016; WHO, 2019), e o parasitismo rápido e persistente de amastigotas em medula
1409 óssea induz a importantes anormalidades hematológicas nos pacientes infectados por
1410 *Leishmania* (Cotterell *et al.*, 2000). No hemograma a anemia representa uma das
1411 principais alterações detectadas e plaquetopenias frequentemente são descritas na LV
1412 (Ciaramella *et al.*, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Brasil, 2014; 2016; Who, 2019).

1413 Para avaliação de reposta medular, devido concentrações eritrocitárias
1414 diminuídas, é utilizada a contagem de reticulócitos (Stockham e Scott, 2011), um
1415 protocolo mundialmente aceito nas medicinas há décadas. Já em relação às plaquetas, a
1416 análise da medula óssea ainda é considerada um bom método para avaliação de resposta
1417 regenerativa da linhagem celular (Ciaramella *et al.*, 2005; Petanides *et al.*, 2008; Solano-
1418 Gallego *et al.*, 2011). Contudo, ainda não há padronização quanto a metodologia para
1419 avaliação da celularidade megacariocítica, com variabilidade da análise de acordo com o
1420 tipo de técnica utilizada (Mischke, 2002; Mylonakis, 2005; Ryan e Felgar, 2005; Grindem
1421 *et al.*, 2009) e, de acordo com alguns autores, a citologia da medula óssea não tem
1422 demonstrado ser útil na avaliação da linhagem plaquetária de cães que apresentam
1423 plaquetopenias graves na ausência de outras alterações hematológicas (Lewis e Meyers,
1424 1996; Miller e Lunn, 2007).

1425 Atualmente, novos parâmetros laboratoriais estão sendo estudados como métodos
1426 auxiliares para avaliação da dinâmica plaquetária (Comar e Silva, 2009; Erdogan *et al.*,
1427 2019). Apesar da análise de índices plaquetários, tais como plaquetócrito (PCT), volume
1428 plaquetário médio (VPM), amplitude da distribuição plaquetária (PDW) e porcentagem

1429 de macroplaquetas (PLC-R) fornecerem informações significativas, a avaliação de
1430 plaquetas reticuladas pode ser considerada mais acurada para investigação de regeneração
1431 medular (Hoffman, 2014).

1432 Por representarem as formas mais jovens circulantes, com curta vida útil, a análise
1433 de plaquetas imaturas tem sido aplicada, principalmente em amostras humanas, como
1434 marcadores não invasivos da atividade megacariopoiética em substituição ao mielograma,
1435 além de permitirem, de maneira confiável, a diferenciação entre plaquetopenia por
1436 consumo ou alteração na produção (Ault *et al.*, 1992; Hoffman, 2014).

1437 Apesar da importância e aplicabilidade da análise da medula óssea e plaquetas
1438 imaturas circulantes nas plaquetopenias, há poucos estudos na medicina veterinária e não
1439 foram encontradas pesquisas envolvendo a avaliação do *turnover* plaquetário nas
1440 leishmanioses. Deste modo, o objetivo com esse trabalho é avaliar a medula óssea e
1441 dinâmica plaquetária, por meio da análise de plaquetas reticuladas circulantes, na
1442 leishmaniose visceral canina (LVC).

1443

1444

MATERIAL E MÉTODOS

1445 O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação
1446 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Ceua/UFMS), sob o protocolo de número
1447 951/2018.

1448 Para a pesquisa foram utilizadas amostras de 50 cães adultos sem restrição de sexo,
1449 peso e raça. Desses, 45 foram cedidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do
1450 município de Campo Grande – MS e eram positivos para *Leishmania (L.) infantum*
1451 *chagasi* (grupo LV) em ensaio sorológico imunoenzimático (DPP®, Bio-Manguinhos,
1452 FIOCRUZ, Brasil) e em reação em cadeia da polimerase – PCR (Cortes *et al.*, 2009). O
1453 conjunto dos resultados das análises de amostras de cinco animais hígidos, negativos para
1454 *Leishmania* sp. e infecções por *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis* e
1455 *Hepatozoon canis*, foram utilizados como valores de referência desta espécie (grupo
1456 controle). Cães positivos tratados para LV e/ou contendo comorbidades foram excluídos
1457 do estudo devido a possível interferência destes fatores em parâmetros hematológicos. As
1458 informações epidemiológicas quanto ao curso das manifestações clínicas foram de acesso
1459 indisponível devido a procedência dos animais.

1460 Para realização de exames laboratoriais obteve-se amostras sanguíneas e de medula
1461 óssea, por meio de punção da veia jugular e úmero, respectivamente, que foram
1462 acondicionadas em tubos estéreis contendo anticoagulante EDTA k2 (ácido

1463 etilenodiaminotetracético dipotássico). Esmegãos diretos também foram
1464 confeccionados, fixados e corados após a aspiração dos materiais. Para todos os cães, a
1465 colheita da medula óssea foi realizada de acordo com os métodos preconizados por
1466 Grindem *et al.* (2009), obedecendo os devidos cuidados de antissepsia e analgesia.

1467 As amostras sanguíneas foram utilizadas para realização de hemogramas e
1468 avaliação das plaquetas reticuladas, também executada nos aspirados medulares. As
1469 extensões diretas deste tecido destinaram-se à análise quantitativa e qualitativa da
1470 linhagem megacariocítica bem como para determinação da intensidade parasitária.

1471 Os materiais de sangue periférico dos cães do grupo LV foram classificados, de
1472 acordo com suas concentrações plaquetárias, em plaquetopenia (<200.000), DIR - dentro
1473 do intervalo de referência para espécie (entre 200.000 e 500.000) e plaquetocitose
1474 (>500.000) conforme os parâmetros definidos por Weiss e Wardrop (2010).

1475 A celularidade da linhagem megacariocítica foi avaliada em menor aumento
1476 (objetivas de 10x e 40x), em toda extensão das lâminas, classificando-se em normal (2-4
1477 células por espícula), aumentada (> 4 células por espícula) e diminuída (<2 células por
1478 espícula) a partir da média aritmética das análises de 4 lâminas consecutivas. Já a
1479 maturação da série celular foi classificada como sendo ordenada, com ou sem desvios à
1480 esquerda ou direita, desordenada ou retardada e a análise morfológica consistiu na
1481 investigação de emperipolese, micromegacariócitos, hipolobulação, hiperlobulação, e
1482 núcleos soltos, alterações displásicas dessa linhagem celular (Weiss, 2005; Oliveira *et al.*,
1483 2016).

1484 A determinação da intensidade parasitária nas amostras de medula óssea foi
1485 realizada de acordo com a adaptação do protocolo descrito por Chulay e Bryceson (1983)
1486 em: grau 0 (zero), diante de ausência de amastigotas após observação de 1.000 campos;
1487 grau 1+, após identificação entre uma e 10 amastigotas em 1.000 campos; grau 2+, entre
1488 uma e 10 amastigotas em 500 campos; grau 3+, entre uma e 10 amastigotas em 100
1489 campos; grau 4+, entre uma e 10 amastigotas em 10 campos; grau 5+, entre uma e 10
1490 amastigotas no primeiro campo de avaliação; e grau 6+ quando mais de 10 amastigotas
1491 foram visualizadas no primeiro campo de avaliação.

1492 Para identificação e quantificação, em porcentagem, das plaquetas reticuladas nas
1493 amostras sanguíneas e medulares, os materiais foram corados e marcados com laranja de
1494 tiazol (Sigma-Aldrich®, Estados Unidos da América) na concentração de 20 ng/mL
1495 (Santoro, 2004) e anticorpo anti-CD61 (PE Mouse anti-human CD61 clone VI-PL2,
1496 Becton Dickinson®, Estados Unidos da América) para posterior análise em citometria de

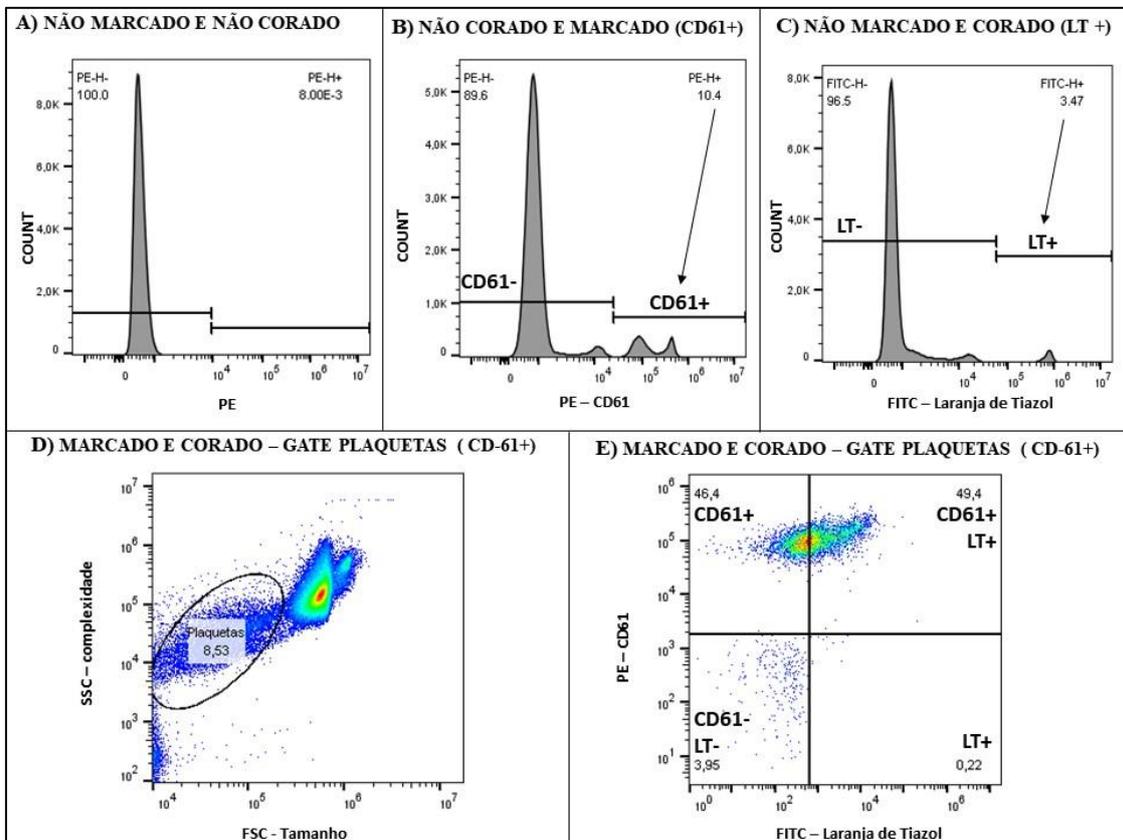
1497 fluxo (CitoFLEX, Beckman-Coulter®, Estados Unidos da América). Solução fisiológica
1498 foi utilizada diluente e, também, para constituição de controle negativo (amostra não
1499 coradas e/ou não marcada).

1500 Após a preparação das soluções finais, elas foram homogeneizadas e deixadas por
1501 30 minutos em temperatura de refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), protegidas da luz, para marcação de
1502 acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Realizou-se a aquisição de 100 mil
1503 (sangue) e 300 mil (medula óssea) eventos de acordo com o tipo de amostra utilizada. Os
1504 fluorocromos foram excitados com o laser de argônio (488nm) e as fluorescências
1505 capturadas por meio dos filtros de tamanho (Forward Scatter – FSC), complexidade (Side
1506 Scatter - SSC), PE-585nm/42 (anti-CD61) e FITC-525nm/40 (laranja de tiazol).
1507 Compensação foi realizada para corrigir a sobreposição espectral.

1508 Histogramas de amostras sem marcação e/ou coloração (não marcado e não corado;
1509 corado e não marcado; não corado e marcado) foram utilizados para auxiliar na definição
1510 de área espacial de análise (controle negativo). A seleção da região da população
1511 plaquetária foi realizada após a análise de gráficos contendo informações sobre o tamanho
1512 e complexidade das partículas adquiridas e intensidade de fluorescência emitida em
1513 resposta a marcação com anticorpo anti-proteínas plaquetárias. A estimacão do nível de
1514 plaquetas reticuladas (valores relativos) foi determinada após análise da porcentagem de
1515 intensidade de fluorescência emitida em resposta à coloração com laranja de tiazol
1516 (Fig.1). A estimacão dos valores absolutos de plaquetas imaturas circulantes foi realizada
1517 por meio de adaptacão do cálculo para determinacão das concentrações de reticulócitos
1518 (Silva *et al.*, 2012).

1519 A normalidade da distribuicão dos dados foi verificada por meio do teste de
1520 Shapiro-Wilk. O teste exato de Fisher foi aplicado para avaliar as diferenças entre as
1521 porcentagens de anormalidades megacariocíticas nos cães não infectados e portadores da
1522 LV de acordo com a intensidade parasitária medular. Nas comparações entre dois grupos
1523 dependentes de mesmo tamanho amostral (porcentagem de plaquetas reticuladas
1524 sanguíneas *versus* medulares) utilizou-se o teste t de Student. Já o Mann-Whitney foi
1525 aplicado para grupos independentes, de tamanhos populacionais diferentes, em que pelo
1526 menos um apresentou dados não paramétricos (controle *versus* LV). Comparações entre
1527 três ou mais grupos, com diferentes tamanhos amostrais e pelo menos um apresentando
1528 distribuicão não normal, foram realizadas por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido
1529 pelo teste de Dunn. As análises de correlaçã de Spearman e regressão com ajustamento

1530 de curvas foram utilizadas para avaliar associações e interdependência entre variáveis.
 1531 Para todas as análises adotou-se o nível de significância de 5%.
 1532



1533 **Figura 1. Identificação das populações de plaquetas e suas formas imaturas (reticuladas) em amostra**
 1534 **canina.** Nota-se formação de picos a partir de 10^4 da escala logarítmica (seta) (B) indicando a presença de
 1535 emissão de fluorescência nas amostras somente marcadas com anticorpo anti CD61 conjugado ao
 1536 fluorocromo PE (ficoeritrina) quando comparado ao controle negativo (A). O mesmo por ser observado
 1537 para o uso do corante fluorescente laranja de tiazol (FITC) em C. Após o isolamento (*gate*) da população
 1538 plaquetária (partículas CD61 positivas adquiridas em citômetro) em gráfico de dispersão, de acordo com o
 1539 tamanho (FSC) e complexidade (SSC) celular (D), se identifica 49,4% de população de plaquetas
 1540 imaturas (E) em área de marcação e coloração positivas para anti-CD61 (PE) e laranja de tiazol (FITC).
 1541

1542

1543

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1544

1545

1546

1547

1548

1549

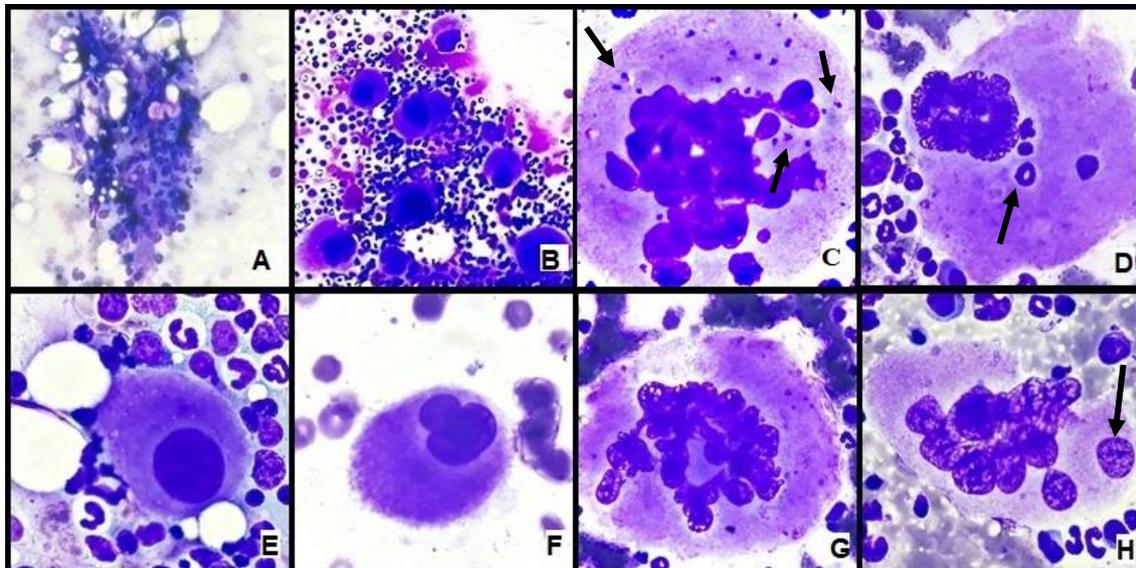
Os dados dos cães não infectados demonstraram distribuição normal ($p > 0,05$), por meio da estatística de Shapiro-Wilk, com curvas das populações potencialmente simétricas e mesocúrticas, indicando que a média, mediana e moda se assemelham. Deste modo, apesar do pequeno número amostral, os resultados podem ser utilizados como parâmetros de referência para espécie neste estudo (Spiegel e Stephens, 2000; Stockham e Scott, 2011).

1550 Em relação aos achados laboratoriais, as concentrações plaquetárias circulantes,
1551 celularidade, maturação e morfologia hematopoiética megacariocítica, nos 45 cães
1552 infectados, variaram.

1553 Plaquetocitoses e plaquetopenias foram observadas em 4,44% (2/45) e 51,11%
1554 (23/45), respectivamente, e 6,67% (3/45) das amostras medulares estavam hipercelulares
1555 e 55,56 % (25/45) hipocelulares (Fig.2). A linhagem megacariocítica demonstrou
1556 somente padrão ordenado de maturação (71,11%, 32/45), porém, às vezes acompanhado
1557 de discreto desvio à esquerda (6,67%, 3/45) ou à direita (6,67%, 3/45) em alguns dos
1558 animais. Em 28,89% (13/45), não foi possível avaliar a escala de maturação devido à
1559 intensa hipocelularidade medular.

1560 Pelo menos um tipo de alteração morfológica megacariocítica foi encontrada em
1561 91,11% (41/45) dos materiais analisados, sendo a emperilopese também identificada em
1562 cães não infectados (Tab.1). Contudo, das displasias observadas (Fig.2), é possível sugerir
1563 que micromegacariócitos e hiperlobulações ocorrem quando maior número de
1564 amastigotas estão presentes em medula óssea ($p < 0,05$) e núcleos soltos no citoplasma
1565 podem ser observados mesmo diante de baixa infecção parasitária tecidual (Tab.1)

1566



1567 **Figura 2.** Alterações medulares megacariocíticas encontradas em cães infectados por *Leishmania (L.)*
1568 *infantum chagasi*. Espículas demonstrando hipocelularidade (A) e hipercelularidade (B) megacariocíticas;
1569 emperilopese de amastigotas (C) e células (D); micromegacariócitos hipolobulares (E e F); hiperlobulação
1570 (G); núcleo solto (H).

1571

1572

1573 As displasias compreendem defeitos de maturação por produção ineficaz de
1574 células hematopoiéticas que podem cursar com citopenias medulares e periféricas (Weiss,
1575 2005; Oliveira *et al.*, 2016). A linhagem megacariocítica contém diferentes estágios que

1576 se maturam até a formação das plaquetas, com mudança gradual de seu fenótipo (Harvey,
1577 2001; Grindem *et al.*, 2009; Weiss e Wardrop, 2010; Oliveira *et al.*, 2016).

1578 Vários fatores que atuam diretamente no DNA durante o ciclo celular têm
1579 influência sob a megacariopoiese que é regulada por substâncias que inibem e estimulam
1580 a diferenciação celular. Essas substâncias quando alteradas podem levar à plaquetopenias
1581 e/ou formação de alterações morfológicas (Shivdasani *et al.*, 1995; Vyas *et al.*, 1999;
1582 Kuhl, 2005; Oliveira *et al.*, 2016).

1583 Nas leishmanioses, devido ao aumento de macrófagos no tecido em consequência
1584 à infecção medular, sugere-se que um desequilíbrio de citocinas e fatores de crescimento
1585 possam estar envolvidos no desenvolvimento de displasias celulares (Quinnell *et al.*,
1586 2001; Jacintho, 2010; Momo *et al.*, 2014; Tommasi *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016;
1587 Almeida *et al.*, 2021). Contudo, investigações aprofundadas ainda são necessárias
1588 (Kaushansky, 2005; Maia e Campino, 2011; Stockham e Scott, 2011; Momo *et al.*, 2014;
1589 Oliveira *et al.*, 2016).

1590 Quanto à emperipolese, definida por Humble *et al.*, (1956), sua etiopatogenia
1591 ainda é incerta e pode ser observada em medulas normais ou alteradas (Sable *et al.*, 2009),
1592 conforme também observado no presente estudo para cães hípidos e infectados (Tab.1).
1593 Sugere-se participação de fatores de crescimento e outras citocinas liberadas de gânnulos-
1594 alfa megacariocíticos e a expressão de selectinas pelas células penetrantes, resultando no
1595 aprisionamento no interior de megacariócitos (Schmitt *et al.*, 2000).

1596 Na LVC, mediadores inflamatórios liberados por macrófagos podem estar
1597 envolvidos na emperipolese de células e a presença de amastigotas deve ser diferenciada
1598 de infecção nessa linhagem celular, com a necessidade de estudos mais conclusivos
1599 (Momo 2013; Momo *et al.*, 2014).

1600

1601 **Tabela 1.** Distribuição de frequências contendo os valores relativos e absolutos das
1602 alterações morfológicas em linhagem megacariocítica de cães negativos e naturalmente
1603 infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi* estratificados de acordo com a
1604 intensidade parasitária medular.

MORFOLOGIA	FREQUÊNCIA							
	Controle	Grau 0	Grau 1+	Grau 2+	Grau 3+	Grau 4+	Grau 5+	Grau 6+
Sem alteração	40,00% (2/5)	0,00% (0/6)	25,00% (1/4)	0,00% (0/7)	0,00% (0/5)	16,67% (1/6)	12,50% (1/8)	11,12% (1/9)
Emperipolese	60,00% (3/5)	66,67% (4/6)	50,00% (2/4)	71,43% (5/7)	80,00% (4/5)	66,67% (4/6)	75,00% (6/8)	88,89% (8/9)

Micromega_ Cariócitos	0,00% (0/5)	16,67% (1/6)	25,00% (1/4)	14,29% (1/7)	40,00% (2/5)	16,67% (1/4)	62,50%* (5/8)	77,78%* (7/9)
Hipolobulação	0,00% (0/5)	16,67% (1/6)	0,00% (0/4)	28,57% (2/7)	20,00% (1/5)	16,67% (2/4)	50,00% (4/8)	44,44% (4/9)
Hiperlobulação	0,00% (0/5)	66,67% (4/6)	50,00% (2/4)	28,57% (2/7)	40,00% (2/5)	33,33% (2/4)	62,50%* (5/8)	55,56%* (5/9)
Núcleos soltos	0,00% (0/5)	66,67% (4/6)	25,00% (1/4)	100,00%* (7/7)	100,00%* (5/5)	66,67%* (4/4)	62,50%* (5/8)	88,89%* (8/9)

1605 *Diferença estatística pelo teste exato de Fisher (p<0,05).

1606

1607 Quando analisadas a marcação com anticorpo anti-CD61 e coloração com laranja
1608 de tiazol, foi possível estimar o nível de plaquetas imaturas nos materiais sanguíneos e
1609 medulares de cães hígdos e infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Fig.1).

1610 Ao observar as concentrações de plaquetas reticuladas, os valores relativos e
1611 absolutos em sangue periférico nos animais com *Leishmania* foram maiores quando
1612 comparado com o grupo controle (p<0,05). Já em relação às amostras medulares, as
1613 concentrações nos cães infectados e não infectados foram semelhantes (p>0,05) (Tab.2).

1614 Quando avaliadas as proporções sanguíneas e medulares, os valores relativos em
1615 medula óssea de cães hígdos e infectados foram quinze e três vezes maiores,
1616 respectivamente, quando comparado com os do sangue periférico (p<0,05) (Tab.2;
1617 Fig.3A). Na estratificação de acordo com as concentrações plaquetárias circulantes e
1618 celularidade medular, esse tipo de proporção também pode ser observada (Tab.2; Fig.3B).

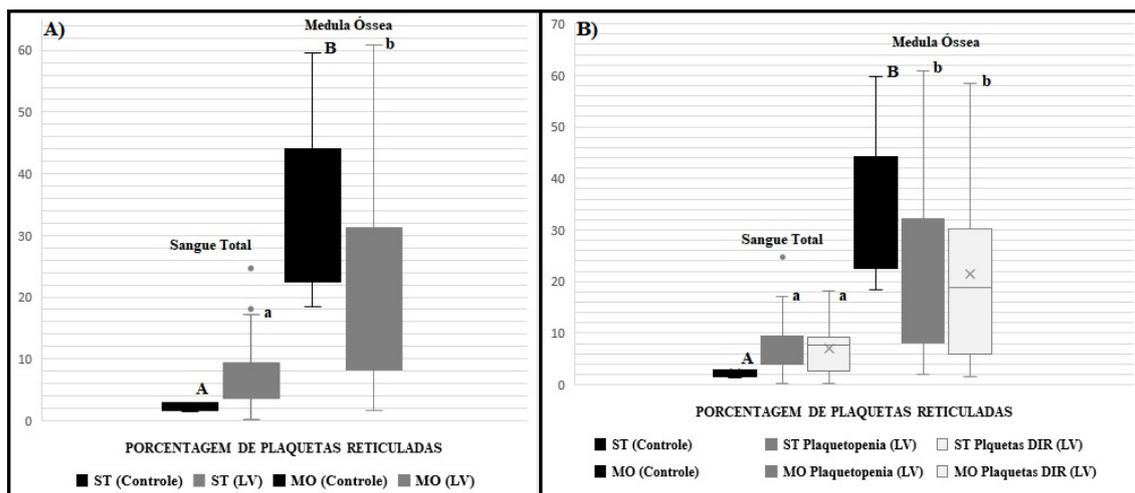
1619

1620 **Tabela 2.** Médias, desvios-padrões, valores mínimos e máximos dos resultados das
1621 análises laboratoriais estudadas em amostras de cães negativos (grupo controle) e
1622 positivos para Leishmaniose Visceral (grupo LV).

Parâmetros Laboratoriais	GRUPOS					
	CONTROLE			LV		
	$\bar{x} \pm SD$	Mín.*	Máx.*	$\bar{x} \pm SD$	Mín.*	Máx.*
PLT (10³/μL)	251 ^a ± 82	-	-	203 ^a ± 133	-	-
PR (%) ST	2,22 ^{Aa} ± 0,65	1,56	3,52	7,19 ^{Ab} ± 5,74	4,29	18,67
PR (10³/μL)	5,85 ^a ± 3,15	0	12,15	13,28 ^b ± 13,14	0	39,56
PR (%) MO	32,33 ^{Ba} ± 15,83	16,50	63,98	21,27 ^{Ba} ± 17,18	13,09	55,63

1623 Abreviações: \bar{x} : média; SD: desvio padrão; PLT: plaquetas; PR: plaquetas reticuladas; ST: sangue total; MO: medula óssea. Médias
1624 seguidas de letras maiúsculas diferentes entre linhas indicam diferença estatística pelo teste t de Student (p<0,05). Médias seguidas
1625 por letras minúsculas iguais entre colunas indicam ausência de diferença estatística pelo teste Mann-Whitney (p>0,05). Valores
1626 mínimos e máximos calculados considerando-se dois desvios-padrões.

1627



1628 **Figura 3. Distribuição da porcentagem de plaquetas reticuladas em sangue periférico e medula óssea**
 1629 **de cães hígidos (controle) e infectados (LV) por *Leishmania (L.) infantum chagasi*.** Em A) nota-se que
 1630 as proporções relativas em medula óssea (MO) foram superiores às de sangue periférico (ST) tanto para o
 1631 grupo controle quanto LV. Esta diferença também pode ser observada em B) nos cães com LV que
 1632 apresentaram plaquetopenia. Letras maiúsculas indicam diferença estatística significativa entre ST e MO
 1633 no grupo controle e letras minúsculas no grupo LV pelo teste t de Student ($p < 0,05$).
 1634
 1635

1636 A constante megacariopoiese leva à formação de 1.000 à 3.000 plaquetas
 1637 reticuladas em medula óssea por megacariócito (Stenberg e Levin, 1989) e a rápida
 1638 maturação em sangue periférico, em torno de 24-36 horas (Dale *et al.*, 1994; Ault e
 1639 Knowles, 1995; Jung *et al.*, 2010; Corpataux *et al.*, 2020), faz com que sejam encontradas,
 1640 em média, pelo menos uma proporção de duas à três vezes maior em medula óssea em
 1641 relação à circulação e depende diretamente do número de megacariócitos em estágio de
 1642 plaquetogênese, justificando os resultados do presente estudo (Ault *et al.*, 1992;
 1643 Stohlawetz *et al.*, 1999; Hoffman, 2014).

1644 A maior quantidade de plaquetas reticuladas sanguíneas em cães com LV,
 1645 observadas em relação aos dados do grupo controle (Tab.2), sugere plaquetopoiese ativa
 1646 em alguns dos animais. A produção de plaquetas depende dos mecanismos envolvidos
 1647 em sua estimulação, elevando-se o *turnover*, e remoção na corrente sanguínea,
 1648 permitindo-se diferenciar destruição periférica de supressão medular (Hoffman, 2014;
 1649 Dusse e Freitas, 2015; Corpataux *et al.*, 2020).

1650 Ao realizar a avaliação dos resultados relativos e absolutos de acordo com as
 1651 concentrações circulantes plaquetárias e celularidade megacariocítica medular (Tab.3),
 1652 nota-se que os valores sanguíneos de plaquetas jovens se encontram aumentados nos cães
 1653 infectados com normoplaquetose periférica e normocelularidade de megacariócitos.

1654 Esses dados sugerem que houve um pico de produção recente para manutenção
 1655 das concentrações basais circulantes na ausência de alta demanda periférica, seja por

1656 consumo/destruição ou sequestro esplênico (Ault e Knowles, 1995; Jung *et al.*, 2010;
1657 Stockham e Scott, 2011; Hoffman, 2014). A maior proporção de plaquetas reticuladas
1658 medulares, que se assemelharam ao grupo controle ($p>0,05$), aproximadamente três vezes
1659 superior em relação à do sangue periférico, corrobora essa interpretação.

1660 Na plaquetopenia e hipocelularidade megacariocítica, apesar de serem observados
1661 valores relativos aumentados ($p<0,05$), nota-se que as concentrações absolutas
1662 sanguíneas se assemelharam ao grupo controle (Tab.3), com correlação moderada em
1663 relação às porcentagens de plaquetas reticuladas medulares (Fig.4). Assim como para
1664 reticulócitos, na identificação de resposta adequada à citopenia periférica é necessária que
1665 as concentrações de plaquetas reticuladas sejam superiores às basais, demonstradas no
1666 grupo controle em nosso estudo (Stockham e Scott, 2011; Thrall *et al.*, 2012).

1667 Em condições de normalidade, baixa quantidade de formas jovens pode ser
1668 encontrada na circulação. Quando há demanda plaquetária aumentada por diminuição do
1669 tempo de vida, ocorre elevação da megacariopoiese e conseqüente maior liberação, na
1670 circulação, de formas imaturas que ainda contém RNA, elevando-se as concentrações de
1671 plaquetas reticuladas. Nas reduções periféricas devido à hipocelularidade
1672 megacariocítica, os valores de plaquetas jovens tendem a estar normais ou diminuídos,
1673 indicando comprometimento medular (Hoffman, 2014; Dusse e Freitas, 2015; Buttarello
1674 *et al.*, 2020).

1675 Ao analisar a tabela 3, nossos resultados sugerem que não há resposta regenerativa
1676 nos cães com LV, apesar de existirem altas porcentagens de formas imaturas circulantes.
1677 Além disso, chama a atenção o uso dos valores absolutos na plaquetopenia,
1678 principalmente porque foram acompanhados da redução das porcentagens de plaquetas
1679 reticuladas em medula óssea (Fig.3B e 4), um indício de diminuição de produção
1680 (Hoffman, 2014; Buttarello *et al.*, 2020).

1681 A escolha entre valores relativos ou absolutos para a interpretação da dinâmica
1682 plaquetária é controversa nas medicinas. Em trabalhos humanos e veterinários são
1683 utilizadas porcentagens, contagens absolutas ou ambas (Stohlawetz *et al.*, 1999; Jung *et al.*
1684 *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012; Żmigrodzka *et al.*, 2014; Oellers *et al.*, 2016). Contudo,
1685 respostas medulares inadequadas podem ser observadas ao analisar os resultados
1686 absolutos na plaquetopenia mesmo na presença de altos dados relativos (Richards e
1687 Baglin, 1995; Silva *et al.*, 2012), assim como constatado em nosso estudo.

1688 O uso de valores absolutos é recomendado por representarem as concentrações
1689 celulares presentes por volume sangue e os dados relativos podem ser enganosos por não

1690 considerarem as oscilações celulares (Thrall *et al.*, 2012). A presença de porcentagens
 1691 aumentadas nem sempre indica regeneração à anemia, por exemplo, pois elevações
 1692 relativas podem ocorrer devido à redução de eritrócitos maduros e não ao aumento de
 1693 reticulócitos (Stockham e Scott, 2011).

1694 De acordo com Richards e Baglin (1995), a análise das porcentagens de plaquetas
 1695 reticuladas é restringida às reduções das concentrações plaquetárias circulantes. Uma
 1696 porcentagem de 15% pode indicar regeneração adequada e inadequada diante de 70 mil
 1697 e 10 mil plaquetas respectivamente (Richards e Baglin, 1995). Deste modo, os resultados
 1698 das análises laboratoriais na plaquetopenia devem ser interpretados com cautela.

1699

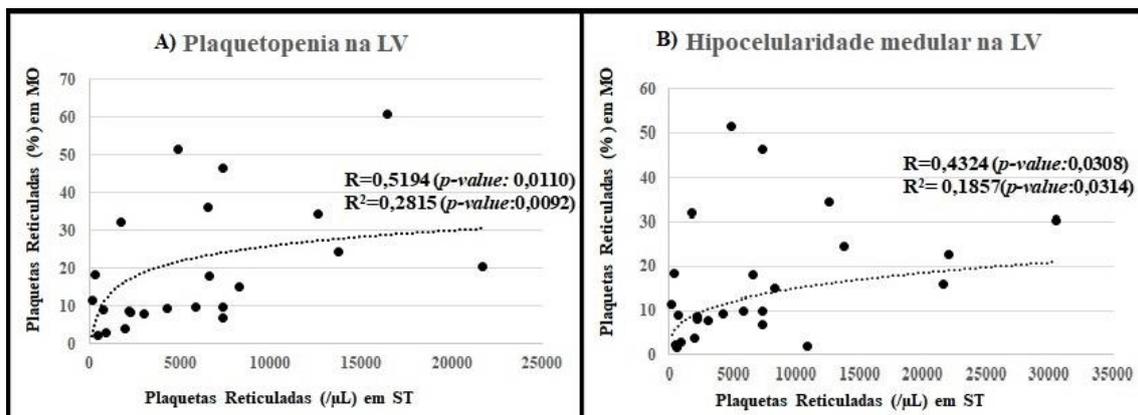
1700 **Tabela 3.** Médias e desvios-padrões dos resultados das análises laboratoriais estudadas
 1701 em amostras de cães negativos (grupo controle) e positivos para Leishmaniose Visceral
 1702 (grupo LV) estratificados de acordo com as concentrações plaquetárias sanguíneas e
 1703 celularidade megacariocítica.

Parâmetros Laboratoriais	GRUPOS				
	CONTROLE $\bar{x} \pm SD$	LV			
		[PLT] DIR $\bar{x} \pm SD$	Plaquetopenia $\bar{x} \pm SD$	Normocelular $\bar{x} \pm SD$	Hipocelular $\bar{x} \pm SD$
PR (%) ST	2,22 ^{Aa} ± 0,65	7,03 ^{Ab} ± 4,57	7,58 ^{Ab} ± 6,84	8,42 ^{Ab} ± 6,24	6,35 ^{Ab} ± 5,51
PR (10 ³ /μL)	5,85 ^a ± 3,15	20,78 ^b ± 15,17	5,95 ^a ± 5,62	21,65 ^b ± 15,36	7,12 ^a ± 7,82
PR (%) MO	32,33 ^{Ba} ± 15,83	21,38 ^{Ba} ± 17,49	19,44 ^{Bb} ± 16,43	25,66 ^{Bab} ± 19,63	16,10 ^{Bb} ± 13,71

1704 Abreviações: \bar{x} : média; SD: desvio padrão; PLT: plaquetas; PR: plaquetas reticuladas; ST: sangue total; MO: medula óssea. Médias
 1705 seguidas de letras maiúsculas diferentes entre linhas indicam diferença estatística pelo teste t de Student ($p < 0,05$) e letras minúsculas
 1706 iguais entre colunas indicam ausência de diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn ($p > 0,05$).

1707

1708



1709

1710 **Figura 4.** Gráficos de dispersão entre concentrações absolutas (μL) em sangue total (ST) e valores
 1711 relativos (%) de plaquetas reticuladas em medula óssea (MO). Nota-se correlação moderada positiva
 1712 em cães infectados por *Leishmania (L.) infatum chagasi* com plaquetopenia (R=0,5194) e hipocelularidade
 1713 megacariocítica (0,4324) ($p < 0,05$).

1714

1715 A avaliação de plaquetas reticuladas na plaquetocitose de cães infectados não foi
 1716 discutida neste estudo uma vez que a elevação nas concentrações circulantes infere à
 1717 megacariopoiese aumentada, seja por resposta fisiológica ou patológica (leucêmica)
 1718 (Hoffman, 2014; Dusse e Freitas, 2015; Corpataux *et al.*, 2020).

1719 Em relação à intensidade parasitária medular, não foi possível determinar se
 1720 quantidade de amastigotas neste tecido pode influenciar nas concentrações de plaquetas
 1721 reticuladas circulantes e medulares já que os valores de *p-value* não foram significativos
 1722 para os coeficientes de correlação obtidos (Tab.4).

1723

1724 **Tabela 4.** Análises de correlação entre intensidade parasitária medular e concentrações
 1725 de plaquetas reticulas em sangue total e medula óssea em cães com leishmaniose visceral.

AMOSTRA	INTENSIDADE PARASITÁRIA							
	Zero	1+	2+	3+	4+	5+	6+	
ST	0.02	-0.80	0.43	-0.60	-0.14	0.01	0.36	R*
	0.95	0.10	0.33	0.28	0.78	0.35	0.33	<i>p-value</i>
MO	-0.20	0.30	0.05	-0.30	0.14	0.60	-0.16	R*
	0.95	0.62	0.90	0.62	0.78	0.11	0.67	<i>p-value</i>

1726 Abreviações: ST: sangue total; MO: medula óssea. *Coeficiente de correlação de Spearman, nível de
 1727 significância de 5%.

1728

1729

CONCLUSÕES

1730 A presença de micromegacariócitos e hiperlobulações pode ocorrer em infecções
 1731 parasitárias medulares mais intensas na LVC. A análise de plaquetas reticuladas permitiu
 1732 avaliar a dinâmica plaquetária nos cães naturalmente infectados por *Leishmania (L.)*
 1733 *infantum chagasi* e revelou, após a observação dos dados absolutos, resposta medular
 1734 inadequada à plaquetopenia devido comprometimento medular. A interpretação das
 1735 porcentagens de plaquetas imaturas circulantes requer atenção por ser limitada as
 1736 concentrações das formas maduras circulantes, especialmente quando diminuídas.

1737

1738

AGRADECIMENTOS

1739 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento
 1740 de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da
 1741 Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de
 1742 Mato Grosso do Sul – Brasil (FUNDECT) – Código de Financiamento:
 1743 FUNDECT/CNPq n.14/2015 PPP/MS-Processo 59/300.037/2015

1744

REFERÊNCIAS

- 1745
- 1746 ALEXANDER, W.S. Thrombopoietin. *G. Factors*, v. 17, p. 13–24, 1999.
- 1747 ALMEIDA, V.; LIMA, I.; FRAGA, D. *et al.* Hematological Changes in Dogs with
1748 Visceral Leishmaniasis Are Associated with Increased IFN- γ and TNF Gene Expression
1749 Levels in the Bone Marrow. *Microorganisms*, v.9, n.8, p.1-11, 2021.
- 1750 AULT, K.A.; KNOWLES C. In vivo biotinylation demonstrates that reticulated platelets
1751 are the youngest platelets in circulation. *Exp. Haematol.*, v. 23, p. 996-1001, 1995.
- 1752 AULT, K.A.; RINDERM H.M.; MITCHELL, J. *et al.* The significance of platelets with
1753 increased RNA content (reticulated platelets). A measure of the rate of thrombopoiesis.
1754 *Am. J. Clin. Pathol.*, n.98, v.6, p. 637-646, 1992.
- 1755 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
1756 Vigilância Epidemiológica. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*.
1757 1ed., 5 reimpr., Brasília: Ministério da Saúde, p.120, 2014.
- 1758 BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
1759 Vigilância Epidemiológica. *Guia de vigilância em saúde*. 1ed., Brasília: Ministério da
1760 Saúde, 542 p., 2016.
- 1761 BUTTARELLO, M.; MEZZAPELLE, G.; FREGUGLIA, F.; PLEBANI, M. Reticulated
1762 platelets and immature platelet fraction: Clinical applications and method limitations. *Int.*
1763 *J. Lab. Hematol.* v. 42, p.363–370, 2020.
- 1764 CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L. *et al.* Altered platelet aggregation
1765 and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by
1766 *Leishmania infantum*. *Vet. J.*, v.169, n.3, p.465-467, 2005.
- 1767 CHULAY, J. D.; BRYCESON, A.D.M. Quantification of amastigotes of *Leishmania*
1768 *donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am. J.*
1769 *Trop. Med. Hyg.*, v. 32, n. 3, p. 475-479, may 1983.
- 1770 COMAR, S.R.; SILVA, P.H. Determinação laboratorial e aplicação clínica dos
1771 parâmetros de volume plaquetário. *RBAC*, v. 41, n.4, p.257-265, 2009.
- 1772 CORPATAUX, N.; FRANKE, K.; KILLE, A. *et al.* Reticulated Platelets in Medicine:
1773 Current Evidence and Further Perspectives. *JCM*, v.9, n.11, p.2-11, 2020.
- 1774 CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive
1775 tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-
1776 specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.98, p.12-17, 2004.

1777 COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. Leishmania donovani infection
1778 of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a
1779 mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood*, v.95, p.1642-1651, 2000.

1780 DALE, G.; FRIESE, P.; HYNES, L.; BURSTEIN, S. Demonstration that thiazole-orange-
1781 positive platelets in the dog are less than 24 hours old. *Blood*, v. 85, 1822–1825, 1995.

1782 DUSSE, L.M.S.; FREITAS, L.G. Clinical applicability of reticulated platelets. *C. Chim.*
1783 *Acta*, v. 439, p. 143-147, 2015.

1784 ERDOGAN, H.; URAL, K.; PASA, S. Relationship between mean platelet volume, low-
1785 grade systemic coagulation and vitamin D deficiency in canine visceral leishmaniasis.
1786 *Med. Weter*, v.75, n.8, p.493-496, 2019.

1787 GRINDEM, C.B.; TYLER, R.D.; COWELL, R.L. A medula óssea. In: COWELL, R.L.;
1788 TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. *Diagnóstico citológico e*
1789 *hematologia de cães e gatos, terceira edição*. São Paulo: Med.Vet, p. 423-451, 2009.

1790 HARVEY, J. W. Bone Marrow. In: *Atlas of Veterinary Hematology – Blood and Bone*
1791 *Marrow of Domestic Animals*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p. 86-190, 2001.

1792 HOFFMANN, J.J. Reticulated platelets: analytical aspects and clinical utility. *Clin.*
1793 *Chem. Lab. Med.*v. 52, n.8, p. 1107-1117, 2014.

1794 HUMBLE, J.G.; JAYNE, W.H.; PULVERTAFT, R.J. Biological interaction between
1795 lymphocytes and other cells. *Br. J. Haematol.*, v.2, n.3, p.283-294, 1956.

1796 JACINTHO, A.P.P. Alterações morfológicas da medula óssea de cães com leishmaniose
1797 visceral. 2010. 32p.Monografia (Aprimoramento em Patologia Animal) – Secretaria do
1798 estado da saúde e coordenadoria de recursos humanos, Fundação do Desenvolvimento
1799 Administrativo (FUNDAP) e Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP),
1800 Jaboticabal, 2010.

1801 JUNG, H.; JEON, H.K.; KIM, H.J.; KIM, S.H. Immature platelet fraction: establishment
1802 of a reference interval and diagnostic measure for thrombocytopenia. *Korean. J. Lab.*
1803 *Med.*, v. 30, n. 5, p. 451-9, 2010.

1804 KAUSHANSKY, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J. Clin.*
1805 *Invest.*, v.115, n.2, p.3339-3347, 2005.

1806 KUHL, C. ATZBERGER, A.; IBORRA, F. *et al.* GATA1-Mediated Megakaryocyte
1807 Differentiation and Growth Control Can Be Uncoupled and Mapped to Different
1808 Domains in GATA1. *Mol. Cell. Biov.*, 25. n.19, p. 8592–8606, 2005.

1809 LEWIS, D.C.; MEYERS, K.M. Canine Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *J. Vet.*
1810 *Int. Med.*, v. 10, n.4, p.207-2018, 1996.

1811 MACHLUS, K. E.; ITALIANO JR, J.E. The incredible journey: From megakaryocyte
1812 development to platelet formation. *J. Cell Biol.*, v. 201, n.6, p. 785–796, 2013

1813 MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum*
1814 Infection in the Dog. *J. T. Medicine*, v.2012, p.1-7, 2011.

1815 MANZILLO, V.F.; RESTUCCI, B.; PAGANO, A. *et al.* Pathological changes in the bone
1816 marrow of dogs with leishmaniosis. *Vet. Rec.*, v.158, n.20, p. 690-694, 2006.

1817 MILLER, M.D.; LUNN, K.F. Diagnostic use of cytologic examination of bone marrow
1818 from dogs with thrombocytopenia: 58 cases (1994-2004). *J. Amer. Vet. Med. Association*,
1819 v 231, p 1540-1544, 2007.

1820 MISCHKE, R.; BUSSE, L.; BARTELS, D. *et al.* Quantification of thrombopoietic
1821 activity in bone marrow aspirates of dogs. *Vet. J.*v.164, n. 3, p. 269-274, 2002.

1822 MOMO, C. Resposta imune na medula óssea e perfil hematológico de cães com
1823 leishmaniose visceral. 2013. 77p. Teste (Doutorado em Patologia Animal Veterinária) –
1824 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal, 2013.

1825 MOMO, C.; JACINTHO, A.P.P.; MOREIRA, P.R.R. *et al.* Morphological Changes in
1826 the Bone Marrow of the Dogs with Visceral Leishmaniasis. *Vet. Med. Int.*, p.1-5, 2014.

1827 MYLONAKIS, M.E.; DAY, M.J.; LEONTIDES, L.S. *et al.* Type of smear may influence
1828 thrombopoietic cell counts in the bone marrow of clinically healthy dogs. *Vet. Clin.*
1829 *Pathology*, v. 34, n.4, p 358-361, 2005.

1830 OELLERS, D.E.; BAUER, N.; GINDER, M. *et al.* Optimized gating and reference ranges
1831 of reticulated platelets in dogs for the Sysmex XT-2000iV. *BMC Vet. Research*, p. 1-11,
1832 2016.

1833 OLIVEIRA, R.A.; PEREIRA, J.; BEITLER, B. *Mielograma e imunofenotipagem por*
1834 *citometria de fluxo em hematologia – prática e interpretação*. Rio de Janeiro: Roca, 2016,
1835 426p.

1836 PETANIDES, T.A.; KOUTINAS, A.F.; MYLONAKIS, M.E. *et al.* Factors associated
1837 with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*).
1838 *J. Vet. Intern. Med.*, v.22, n.4, p.866-872, 2008.

1839 QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.O. *et al.* Tissue cytokine responses in
1840 canine visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, v.183, n.9., p.1421-1424, 2001.

1841 RICHARDS, E.M.; BAGLIN, T.P. Quantitation of reticulated platelets: methodology and
1842 clinical application. *B.J. Haematology*, v. 91, p. 445-451, 1995.

1843 RYAN, D. H.; FELGAR, R. E. Examination of the marrow. In: LICHTMAN, M.;
1844 BEUTLER, E.; KAUSHANSKY, K.; KIPPS, T.; SELIGSOHN, U.; PRCHAL, J.
1845 *Williams Hematology*. 7 ed. New York: McGraw-Hill Professional, p. 21-31, 2005.

1846 SABLE, M.N.; Sehgal, K.; Gadage, V.S.; Subramanian, P.G.; Gujral, S. Megakaryocytic
1847 emperipolesis: a histological finding in myelodysplastic syndrome. *Indian. J. Pathol.*
1848 *Microbiol.*, v. 52, n. 4, p. 599-600, 2009.

1849 SCHULZE, H.; SHIVDASANI, S.A. Mechanisms of thrombopoiesis. *J Thromb.*
1850 *Haemost.*, v. 3, p.1717–1724, 2005.

1851 SHIVDASANI, R.A.; ROSENBLATT, M.F.; ZUCKER-FRANKLIN, D. *et al.*
1852 Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions
1853 of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, v.81, n.5, p.695-704,
1854 1995.

1855 SILVA, L.F.N.; GOLIM, M.A.; TAKAHIRA, R.K. Measurement of thrombopoietic
1856 activity through the quantification of megakaryocytes in bone marrow cytology and
1857 reticulated platelets. *Res. Vet. Science*, v.93, p. 313–317, 2012.

1858 SCHMITT, A.; JOUAULT, H.; GUICHARD. J. Pathological interaction between
1859 megakaryocytes and polymorphonuclear leukocyte in myelofibrosis. *Blood*, v. 96, p.
1860 1342-1347, 2000.

1861 SMITH III, R.; THOMAS, J.S. Quantitation of reticulated platelets in healthy dogs and
1862 in nonthrombocytopenic dogs with clinical disease. *Vet. Clin. Pathology*, v.31, n.1, 2002.

1863 SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. *et al.* LeishVet guidelines for the
1864 practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors*, v.4, p.1-16, 2011.

1865 SPIEGEL, M.R.; STEPHENS, L.J. *Estatística*. Porto Alegre: Bookman, 600p., 2000.

1866 STENBERG, P.E.; LEVIN, J. Mechanisms of platelet production. *B. Cells*, v,15, n.1,
1867 p.23-47, 1989.

1868 STOCKHAM, S.L.; SCOTT, MA. *Fundamentos de patologia clínica veterinária*. 2 ed.
1869 Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2011, 729p.

1870 STOHLAWETZ, P.; SCHULENBERG, A.; STIEGLER, G. *et al.* The proportion of
1871 reticulated platelets is higher in bone marrow than in peripheral blood in haematological
1872 patients. *Eur. J. Haematol.*, v.63, p. 239-244, 1999.

1873 THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.; CAMPBELL, T. *Veterinary Hematology*
1874 *and Clinical Chemistry*. 2nd ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2012, 784p.

1875 TOMMASI, A.S.; OTRANTO, D.; FURLANELLO, T. *et al.* Evaluation of blood and
1876 bone marrow in selected canine vector-borne diseases. *P. Vectors*, v. 7, p.1-10, 2014.

1877 VYAS, P.; AULT, K.; JACKSON, C.W. *et al.* Consequences of GATA-1 Deficiency in
1878 Megakaryocytes and Platelets. *Blood*, v.93, n.9, p. 2867–2875, 1999.

1879 WEISS, D.J. Recognition and Classification of Dysmyelopoiesis in the Dog: A Review.
1880 *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, p.147–154, 2005.

1881 WEISS, J.D.; TOWNSEND, E. Evaluation of reticulated platelets dogs. *C. Haemat.*
1882 *International*, v 8, 166–170, 1998.

1883 WEISS, D.J.; WARDROP, K. J. *Schalm's Veterinary Hematology*, sixth edition. Iowa:
1884 Wiley-Blackwell, 2010,1206p.

1885 WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Leishmaniasis*. 2019. Disponível em:
1886 <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 23 de julho de 2021.

1887 ŻMIGRODZKA, M.; GUZERA, M.; WINNICKA, A. Evaluation of reticulated platelets
1888 in dogs with breed-related thrombocytopenia. *P. J. Vet. Sciences*, v.17, n.1, p. 137–142,
1889 2014.

1890 **4. CAPÍTULO IV - ANEXOS**
1891 **4.1. Anexo I - RESOLUÇÕES DO COLEGIADO DE PÓS-**
1892 **GRADUAÇÃO**



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 17, DE 06 DE ABRIL DE 2017.

A PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Homologar o resultado do processo seletivo da candidata Tamires Ramborger Antunes - protocolo 201718863 - no curso de Doutorado 2017 do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, a qual foi declarada **APROVADA** pela banca de seleção responsável.

ELIANE VIANNA DA COSTA E SILVA.





Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 21 DE 27 DE MARÇO DE 2018.

A PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Aprovar o projeto da aluna do curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, com ingresso em abril de 2017, com base no parecer favorável da Comissão de Avaliação, conforme se segue:

Aluno:	Orientador:	Título:
Tamires Ramborger Antunes	Alda Izabel de Souza	Avaliação de medula óssea e perfil hemostático de cães naturalmente infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum chagasi</i>

ELIANE VIANNA DA COSTA E SILVA.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FAMEZ
Avenida Senador Filinto Muller nº 2443 - Cidade Universitária - Caixa Postal 549 - 3345-3645
79070-900 Campo Grande-MS / <https://www.ufms.br> email: civet.famez@ufms.br





Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 92-CPOS/CIV/FAMEZ/UFMS, DE 15 DE ABRIL DE 2021.

A PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Manifestar-se favoravelmente à solicitação de prorrogação de prazo de curso da doutoranda Tamires Ramborger Antunes, RGA 201736025, sendo o prazo final para conclusão do curso até 15-10-2021.

THYARA DE DECO SOUZA E ARAUJO



Documento assinado eletronicamente por **Thyara de Deco Souza e Araujo, Presidente de Colegiado**, em 15/04/2021, às 15:57, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2515290** e o código CRC **90343F39**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.002794/2021-16

SEI nº 2515290

https://sei.ufms.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=3044680&infra_sistema

