



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

Dr.ª Alda Izabel de Souza (Presidente) _____

AVALIAÇÃO

(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 Magistério 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

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

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

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

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

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

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

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

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GERAL

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

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

1.3. REVISÃO DE LITERATURA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.2. MEGACARIOPOIESE E PLAQUETOPOIESE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.3. HEMOSTASIA

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

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

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

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

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

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

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

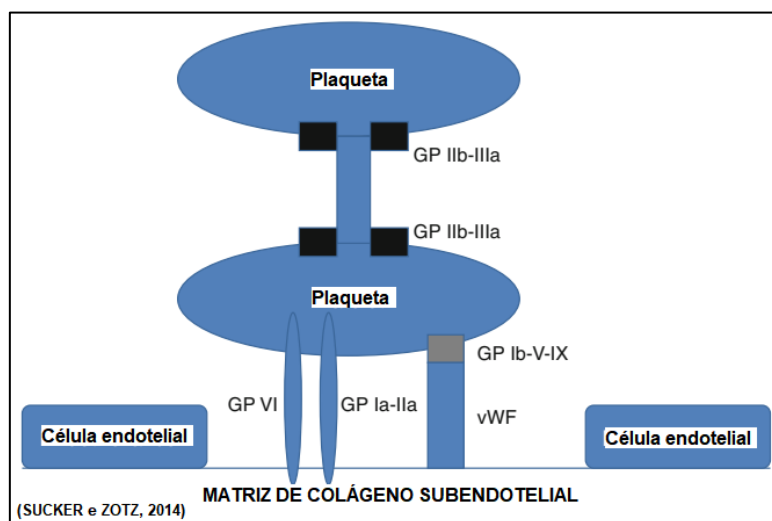


Figura 1. Ilustração esquemática da adesão e agregação plaquetária. Após a lesão endotelial, as plaquetas se aderem ao colágeno pela interação da glicoproteína receptora (GP) Ib / V / IX com o fator de von Willebrand que está ligado ao colágeno. Esta adesão é estabilizada pela interação direta dos receptores 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).

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

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

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

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

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

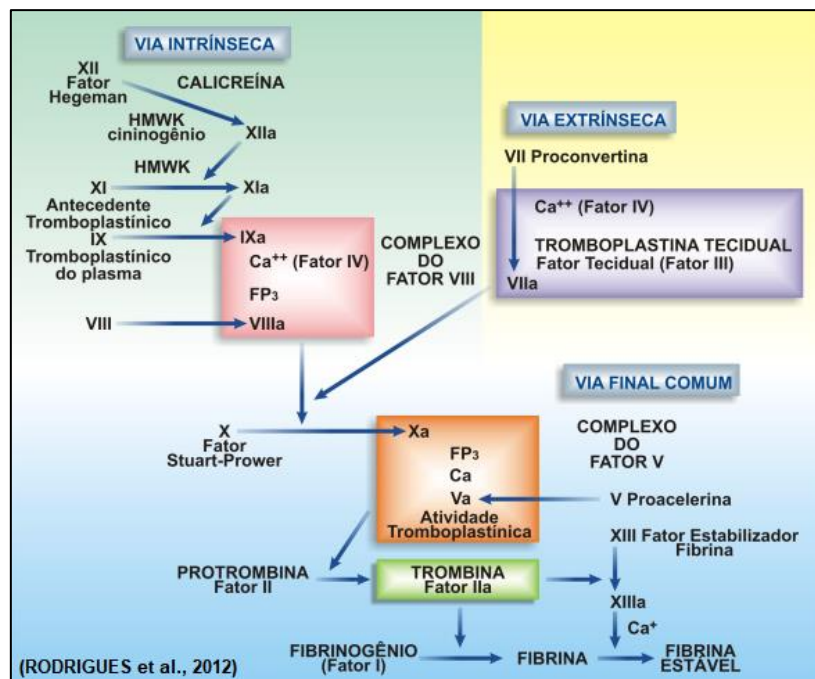


Figura 2. Cascata da coagulação. A cascata da coagulação começa com a ativação das vias do fator tecidual (extrínseca) ou induzida pela superfície (intrínseca). **Via extrínseca:** é iniciada pelo fator tecidual liberado de, ou exposto a, tecido lesado ou monócitos, macrófagos e possivelmente células endoteliais ativadas. O fator tecidual da membrana celular liga-se ao fator VII (e VIIa) 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 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 fosfolipídica 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 clivando os locais de ligação do plasminogênio da fibrina (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

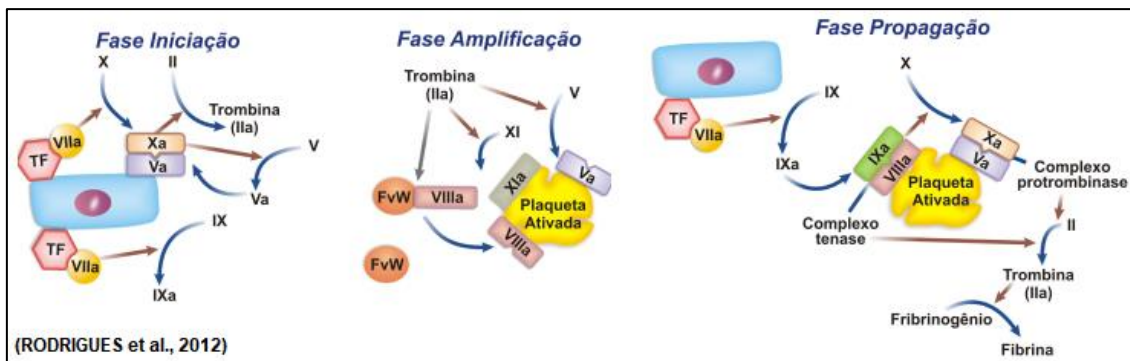


Figura 3. Novo modelo da cascata de coagulação baseado em superfícies celulares. O processo ocorre em uma série de etapas simultâneas. Na fase de **iniciação** células endoteliais, micropartículas ou monócitos expõem o fator tecidual (FT) que se associa ao fator VIIa presente no sangue, formando o complexo 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 hemostasia 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

1.3.4.1. PLAQUETOGRAMA

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

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

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

Em relação à interpretação, quantidades plaquetárias diminuídas (plaquetopenia) decorrem de redução do tempo de vida (consumo e/ou destruição), redistribuição anormal (sequestro esplênico, por ex.) ou diminuição de produção (hipoplasia ou aplasia medular). Já valores aumentados (plaquetocitose) são encontrados quando há elevação de produção, seja fisiológica (correção de plaquetopenia; resposta ao estresse) ou patológica (leucemia) (STOCKHAM e SCOTT, 2011; THRALL et al., 2012). As alterações 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 consequente alteração desse parâmetro.
489 Portanto, plaquetas grandes ou pequenas podem ser detectadas em

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.4.2. COAGULOGRAMA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.3.4.3. MIELOGRAMA: LINHAGEM MEGACARIOCÍTICA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 2. Células da linhagem megacariocítica reconhecidas 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.
--	---

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

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.

Cowell et al., (2009).

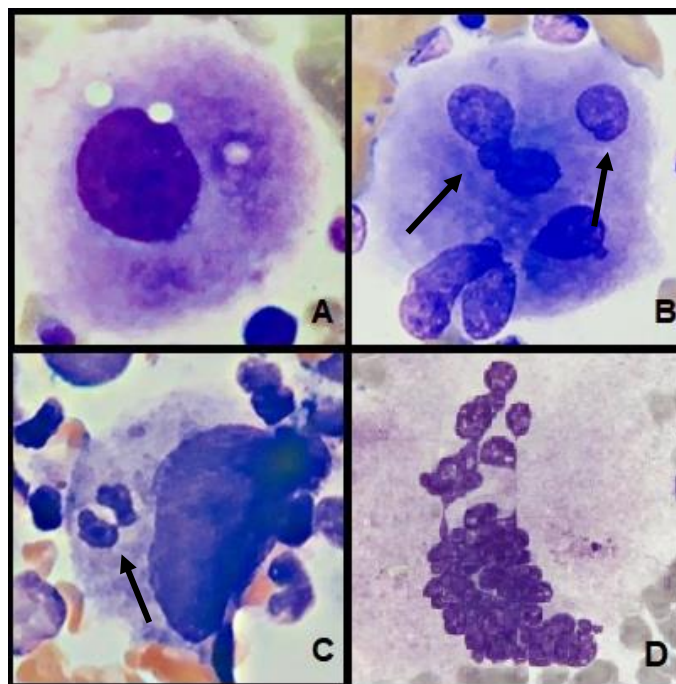


Figura 4. Displasias megacariocíticas. A) Micromegacariócito mononuclear (hipolobulado). **B)** Núcleos múltiplos, arredondados e soltos (setas). **C)** Emperipolese de neutrófilo (seta) (OLIVEIRA et al., 2016). **D)** Hiperlobulação. (VACARI, 2020).

1.4. MATERIAL E MÉTODOS

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

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 eram positivos para *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Já na segunda etapa investigou-se amostras sanguíneas e de medula óssea de 50 cães, sendo 5 hígidos e 45 portadores da LVC. As respectivas metodologias das duas etapas são descritas nos próximos capítulos.

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

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

hematológicas e hemostáticas que podem se transformar em emergências médicas.

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

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

1.6. REFERÊNCIAS

- ADRIOLO, A. BALLARATI, C.A.F.; GALORO, C.A.O.; MENDES, M.E.; MELO, M.R.; SUMITA, N.M. Mielograma. In: **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML): Coleta e Preparo da Amostra Biológica**. Barueri-SP: Manole, p. 165-172, 2014.
- ALENCAR, N.X.; KOHAYAGAWA, A.; CAMPOS, K.C.H.; TAKAHIRA, R.K. Mielograma. Parte I: indicações e colheita do material. **Rev. Educ. Cont. CRMV-SP**, v. 05, fascículo 2, p.157-163, 2002.
- ALEXANDER, W.S. Thrombopoietin. **G. Factors**, v. 17, p. 13–24, 1999.
- ALVES, A. C. Histologia da Medula Óssea. **Rev. Bras. de Hematol. e Hemot.**, 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.; RINDERMAN 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.; DHENG, 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.

Perfil hemostático de cães com Leishmaniose Visceral

[Hemostatic profile of dogs with Visceral Leishmaniasis]

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

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

*Autor para correspondência: tamires_ramborger_antunes@hotmail.com

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

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

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

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

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

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

RESUMO

A análise de componentes hemostáticos é necessária para investigar quadros hemorrágicos que ocorrem na leishmaniose visceral. O objetivo com este estudo foi avaliar o perfil hemostático de cães infectados naturalmente por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. Quando comparado com o grupo controle, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) para todos os parâmetros estudados. 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.

Palavras-chave: canino, coagulação, *Leishmania*

ABSTRACT

The analysis of hemostatic components is necessary to investigate hemorrhagic conditions that occur in visceral leishmaniasis. The aim of this study was to evaluate the hemostatic profile of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. When compared with the control group, no statistically significant differences ($p > 0.05$) were observed for all parameters studied. The analysis of hemostatic 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*

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabela 2. Medianas e quartis dos resultados das análises laboratoriais estudadas em 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)

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

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

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

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

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

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

Tabela 3. Medianas e quartis dos resultados das análises laboratoriais estudadas em 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)

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

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

Analitos Séricos	PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS		
	TP R (p-value)	TTPa R (p-value)	Fibrinogênio R (p-value) ¹
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)

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

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

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

CONCLUSÕES

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.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

1266 BANETH, G.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEG0, 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-GALLEGU, 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 Koogan, 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.

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

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

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

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

*Autor para correspondência: tamires_ramborger_antunes@hotmail.com

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

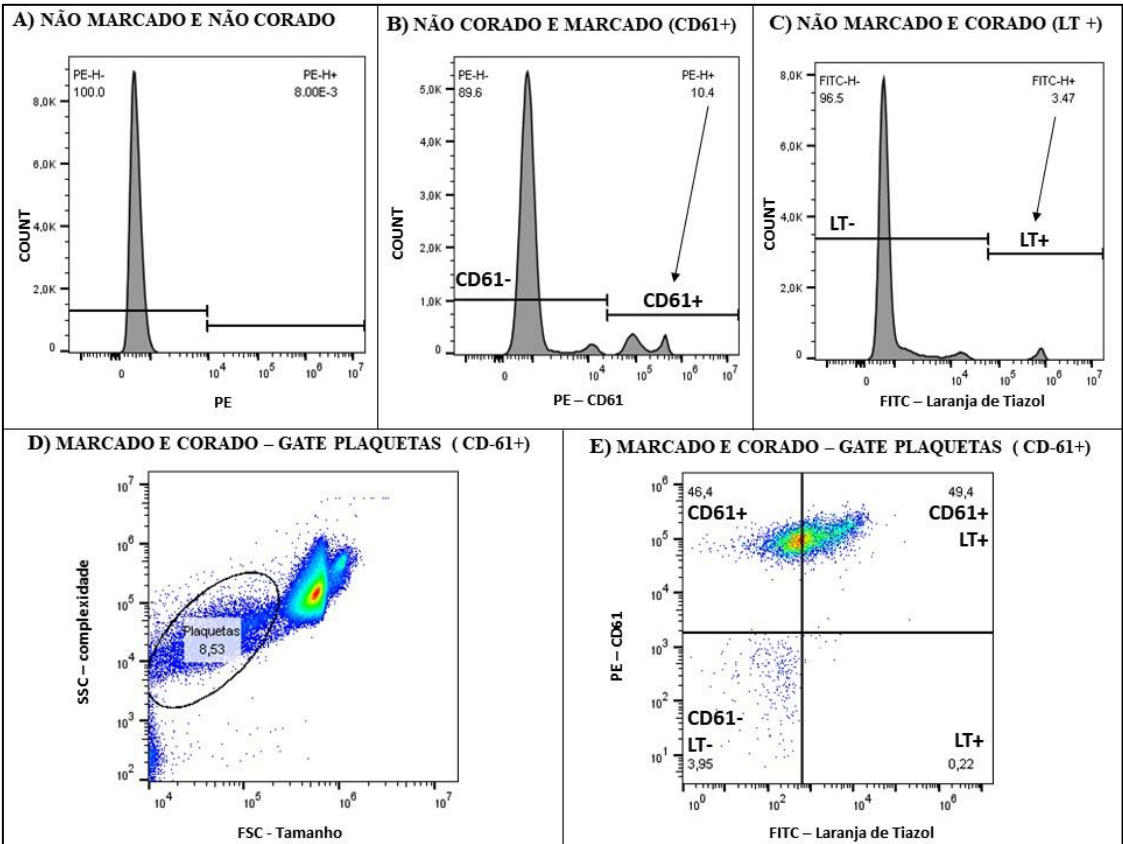


Figura 1. Identificação das populações de plaquetas e suas formas imaturas (reticuladas) em amostra canina. Nota-se formação de picos a partir de 10^4 da escala logarítmica (seta) (B) indicando a presença de emissão de fluorescência nas amostras somente marcadas com anticorpo anti CD61 conjugado ao fluorocromo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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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).

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

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

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

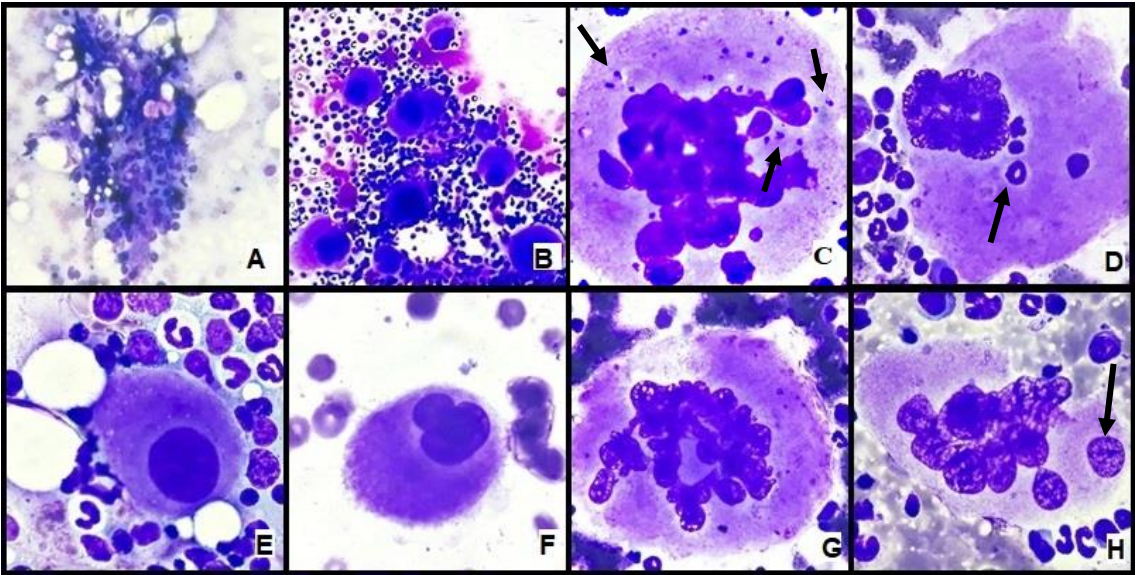


Figura 2. Alterações medulares megacariocíticas encontradas em cães infectados por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Espículas demonstrando hipocelularidade (A) e hipercelularidade (B) megacariocíticas; emperilopese de amastigotas (C) e células (D); micromegacariócitos hipolobulares (E e F); hiperlobulação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

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

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

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

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

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

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

1600

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

MORFOLOGIA	FREQUÊNCIA							
	INTENSIDADE PARASITÁRIA MEDULAR DE AMASTIGOTAS							
	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)

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

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

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

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

Tabela 2. Médias, desvios-padrões, valores mínimos e máximos dos resultados das análises laboratoriais estudadas em amostras de cães negativos (grupo controle) e 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

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

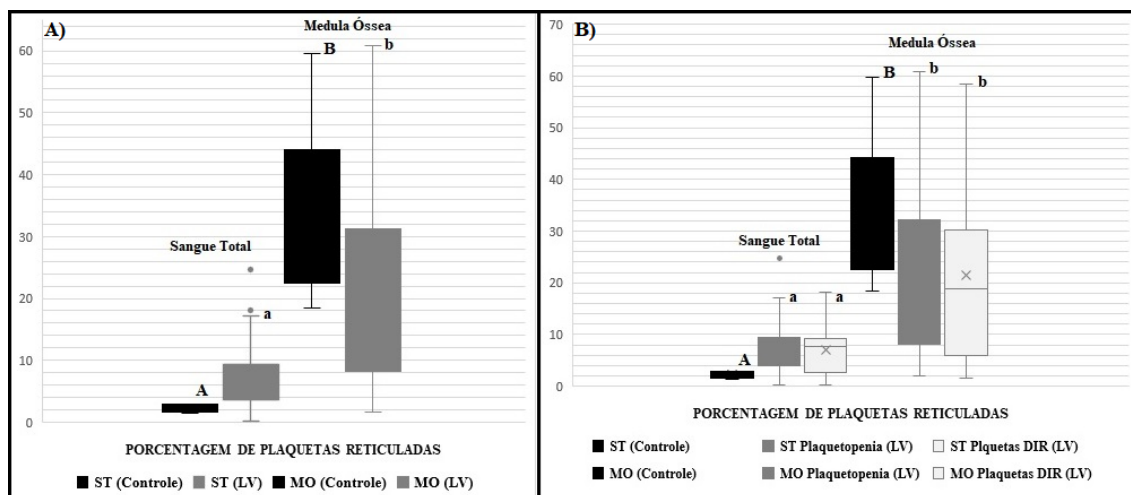


Figura 3. Distribuição da porcentagem de plaquetas reticuladas em sangue periférico e medula óssea de cães hígidos (controle) e infectados (LV) por *Leishmania (L.) infantum chagasi*. Em **A)** nota-se que as proporções relativas em medula óssea (MO) foram superiores às de sangue periférico (ST) tanto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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

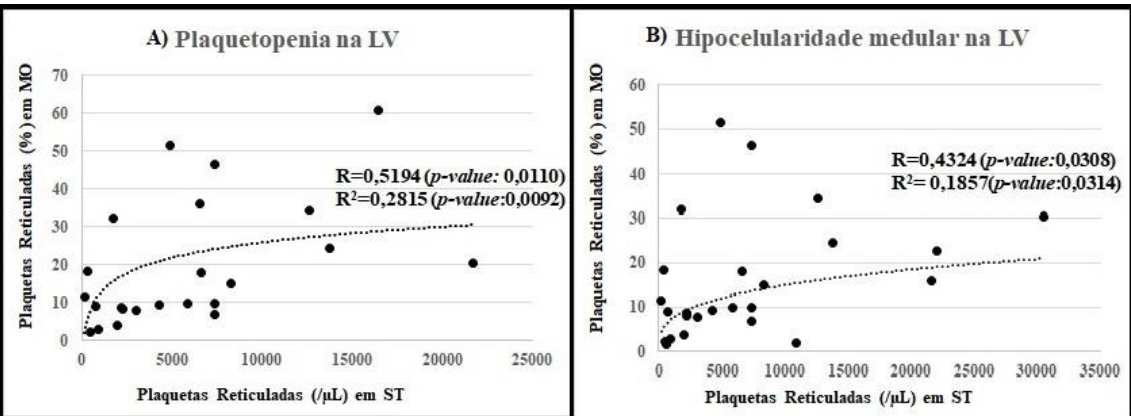


Figura 4. Gráficos de dispersão entre concentrações absolutas (μL) em sangue total (ST) e valores relativos (%) de plaquetas reticuladas em medula óssea (MO). Nota-se correlação moderada positiva em cães infectados por *Leishmania (L.) infatum chagasi* com plaquetopenia ($R=0,5194$) e hipocelularidade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

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

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

Tabela 4. Análises de correlação entre intensidade parasitária medular e concentrações de plaquetas reticuladas 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>

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

CONCLUSÕES

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

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

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FAMEZ
Avenida Senador Filinto Müller 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 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=1

