



**CENTRO UNIVERSITÁRIO LUTERANO DE PALMAS**

Recredenciado pela Portaria Ministerial nº 1.162, de 13/10/16, D.O.U. nº 198, de 14/10/2016  
AELBRA EDUCAÇÃO SUPERIOR - GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO S.A.

Marillac Rodrigues Leal Pereira

USO DA TERAPIA CELULAR NO TRATAMENTO DE HIPOPLASIA MEDULAR EM  
CÃO PORTADOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: relato de caso

Palmas – TO

2021

Marillac Rodrigues Leal Pereira

USO DA TERAPIA CELULAR NO TRATAMENTO DE HIPOPLASIA MEDULAR EM  
CÃO PORTADOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: relato de caso

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. Dra. Ana Luiza Guimarães

Co-orientador: Prof. Esp. Isaac Avelino Pacheco

Palmas – TO

2021

Marillac Rodrigues Leal Pereira

USO DA TERAPIA CELULAR NO TRATAMENTO DE HIPOPLASIA MEDULAR EM  
CÃO PORTADOR DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA: relato de caso

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) II elaborado e apresentado como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Psicologia pelo Centro Universitário Luterano de Palmas (CEULP/ULBRA).

Orientador: Prof. a. Dra. Ana Luiza Guimarães

Co-orientador: Prof. Esp. Isaac Avelino Pacheco

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. A. Dra. Ana Luiza Guimarães

Orientadora

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

---

Prof. Prof. Dr. Caio Vitor Bueno Dias - 1º avaliador

Centro Universitário Luterano de Palmas – CEULP

---

Prof. Esp. Isaac Avelino Pacheco – 2º avaliador

Animais Centro Veterinário

Palmas – TO

2021

Dedico esse trabalho ao meu esposo Edimilson Nunes, a minha filha Jennifer Leal e a minha Mãe Maria Hosana. Pessoas fundamentais, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Vocês são o meu alicerce, e sem o apoio de vocês eu não teria conseguido concluir mais esse sonho. Eu amo muito vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças, sabedoria e paciência durante essa jornada. E por ter colocados pessoas incríveis no meu caminho, que me ajudaram a realizar mais esse sonho.

Ao meu esposo Edimilson Nunes por sempre me apoiar nas minhas decisões e por sempre estar comigo. Você como sempre é meu alicerce, me fortalece, me dá bronca e me acalma, sempre que preciso. Não queria que eu tivesse entrado, mas também nunca me deixou desistir. Foi um período muito difícil, você mais uma vez teve que abrir mão de muitas coisas para realizar o meu sonho. Me considero uma mulher privilegiada por ter um companheiro como você. Te amo!

A minha filha Jennifer Leal minha companheira, sempre está ao meu lado, me ajudando e me apoiando. Por várias vezes cuidou da mamãe, me ajudou nos trabalhos (risos), foi minha parceira das madrugadas de estudo e das festas. Mamãe te ama!

A minha mãezinha, que sempre está comigo, me ajudando, me incentivando, me dando broncas. Eu não teria conseguido sem sua ajuda. Amo você minha “véia”!

A minha orientadora Prof.a. Dra. Ana Luiza Guimarães, pelo valioso ensinamento que transmitiu ao longo dos cinco anos de curso, por sempre estar disposta a ajudar, pela paciência, principalmente na entrega desse TCC (risos). Não é à toa que é uma das professoras mais querida pelos alunos.

A todos os meus professores que fizeram parte da minha formação, por todo o conhecimento que passaram, pela dedicação e paciência que tiveram comigo.

Ao Dr. Isaac Avelino Pacheco por ter me dado a oportunidade de estagiar em sua clínica, por todo conhecimento que adquiri e por toda confiança depositada em mim. Eu cresci muito! E sei que tenho muito aprender ainda com você. Serei eternamente grata por essa oportunidade.

Ao “estrangeirinho” Dr. Johan, a Dra. Adriana, a Dra Andressa e ao Lucas, pessoas que considero de coração. Aprendi muito também com todos vocês. E a todos os outros médicos e funcionários da Animais Centro Veterinário. Fiz boas amizades, são pessoas muito queridas. Sou muito feliz por fazer parte dessa equipe!

Aos meus amigos que fiz ao longo do curso, Iandra Araújo, Gabriel Matias e Izabela Zully, pela amizade, pelas alegrias, brigas e bagunças. Agora ficará só as boas

lembranças do que vivemos. Agora deixaremos de ser universitários irresponsáveis (risos), para nos tornamos grandes profissionais. Vocês me ajudaram muito!

A todos os meus familiares e amigos, que me apoiaram e torceram por mim. Em especial aos meus amigos do Pará, família Medeiros, sou eternamente grata por todo o apoio e confiança, eu não estaria concluindo essa faculdade agora, se não fosse pela ajuda de vocês.

E agradeço ao meu pai, que não está mais presente, mas que sempre será lembrado, pois sei que se estiver me olhando, estará feliz por mais essa vitória.

“A compaixão pelos animais está intimamente ligada a bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.”

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

PEREIRA, Marillac R. Leal. **Uso da terapia celular no tratamento de hipoplasia medular em cão portador da leishmaniose visceral canina: relato de caso** - 2021. 68 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Centro Universitário Luterano de Palmas, Palmas/TO, 2021.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença de distribuição mundial, sendo essa a forma mais severa dentre as leishmanioses. É uma doença de grande importância para a saúde pública pois é de caráter zoonótica, podendo ser transmitida ao ser humano, sendo conhecida popularmente como Calazar. A forma visceral da leishmaniose é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania sp.*, e no Brasil, o cão é a espécie de maior prevalência da doença, e possui um papel importante na distribuição da infecção no local. O aspecto clínico da leishmaniose pode variar de um estado aparentemente sadio a um estado severo, levando o animal a morte. O que vai determinar a gravidade dessas manifestações será a resposta imunológica do infectado, à virulência do parasita, o estado nutricional e a baixa idade do paciente. O diagnóstico da doença é difícil, pois as manifestações clínicas são compatíveis com outras doenças devido as variedades de sinais clínicos que o portador de leishmaniose pode apresentar. Existem uma variedade de testes que ajudam a diagnosticar a doença, como os testes parasitológicos, moleculares e sorológicos. Além desses, o mielograma tem sido muito utilizado para avaliação da medula óssea quando existe anormalidades no sangue, e para achados de hemoparasitoses. O mielograma é um exame utilizado para a avaliação microscópica da medula óssea, e para averiguar a funcionalidade da hematopoiese e das características medulares. É um método muito eficiente para o diagnóstico da LVC, e usado como fonte de pesquisa para avaliar parâmetros que apontam a gravidade da doença. No Brasil, diferentes protocolos de tratamentos vêm sendo utilizados nos cães que testam positivos para leishmaniose visceral, e muitos com bases em estudos realizados na Europa. Uma terapia que tem sido implementada na medicina veterinária é a utilização células-tronco. O objetivo do presente relato é avaliar o uso da terapia com células-tronco no tratamento da hipoplasia medular de um cão portador de leishmaniose visceral canina.

Palavras-chave: LVC, hipoplasia medular, mielograma e células-tronco.



## ABSTRACT

PEREIRA, Marillac R. Leal. **Verwendung von Zelltherapie bei der Behandlung von medullärer Hypoplasie bei Hunden mit viszeraler Leishmaniose bei Hunden: Fallbericht** - 2021. 68 f. Kursabschlussarbeit (Abschluss) - Veterinärmedizinkurs, Lutheran University Center of Palmas, Palmas/TO, 2021.

Canine Viszerale Leishmaniose (CVL) ist eine weltweite Verbreitungskrankheit, die die schwerste Form der Leishmaniose ist. Es ist eine Krankheit von großer Bedeutung für die öffentliche Gesundheit, da sie zoonotischen Charakter hat und auf den Menschen übertragen werden kann, der im Volksmund als Calazar bekannt ist. Die viszerale Form der Leishmaniose wird durch den Protozoen der Gattung *Leishmania* sp. verursacht, und in Brasilien ist der Hund die Art mit der höchsten Prävalenz der Krankheit und spielt eine wichtige Rolle bei der Verteilung der Infektion am Standort. Der klinische Aspekt der Leishmaniose kann von einem scheinbar gesunden Zustand bis zu einem schweren Zustand reichen, der das Tier zum Tod führt. Was die Schwere dieser Manifestationen bestimmen wird, ist die immunologische Reaktion der Infizierten, die Virulenz des Parasiten, der Ernährungszustand und das geringe Alter des Patienten. Die Diagnose der Krankheit ist schwierig, da die klinischen Manifestationen aufgrund der Vielfalt der klinischen Symptome, die der Patient mit Leishmaniose aufweisen kann, mit anderen Krankheiten kompatibel sind. Es gibt eine Vielzahl von Tests, die helfen, die Krankheit zu diagnostizieren, wie parasitologische, molekulare und serologische Tests. Darüber hinaus wurde das Myelogramm häufig zur Beurteilung des Knochenmarks bei Anomalien im Blut und für Befunde der Hämoparasitose verwendet. Myelogramm ist eine Untersuchung zur mikroskopischen Beurteilung des Knochenmarks und zur Überprüfung der Funktionalität der Hämatopoese und der medullären Merkmale. Es ist eine sehr effiziente Methode zur Diagnose von CVL und wird als Forschungsquelle zur Bewertung von Parametern verwendet, die die Schwere der Erkrankung anzeigen. In Brasilien wurden verschiedene Behandlungsprotokolle bei Hunden angewendet, die positiv auf viszerale Leishmaniose getestet wurden, und viele basieren auf in Europa durchgeführten Studien. Eine Therapie, die in der Veterinärmedizin eingesetzt wurde, ist die Verwendung von Stammzellen. Ziel dieses Berichts ist es, den Einsatz der Stammzelltherapie bei der Behandlung der medullären Hypoplasie bei einem Hund mit viszeraler Leishmaniose bei Hunden zu bewerten.

Schlüsselwörter: CVL, medulläre Hypoplasie, Myelogramm und Stammzellen.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> - Mapa representando as áreas de risco da leishmaniose visceral em diferentes regiões brasileiras.....	16
<b>FIGURA 2</b> - Forma promastigota de <i>L. infantum</i> que podem ser encontradas no tubo digestivo do vetor.....	17
<b>FIGURA 3</b> - Forma amastigota de <i>L. infantum</i> que podem ser encontradas nos tecidos dos cães.....	17
<b>FIGURA 4</b> - Fêmea do mosquito flebotomíneo <i>Lutzomyia longipalpis</i> .....	18
<b>FIGURA 5</b> - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> .....	19
<b>FIGURA 6</b> - Resposta imunológica da Lv: células dendríticas fagocitam o parasita e apresentam para as células Th1 e Th2; Th1 atua na eliminação do parasita e Th2 atua na suscetibilidade da doença.....	21
<b>FIGURA 7</b> - Esquema do processo de divisão e diferenciação células sanguíneas e seus precursores na hematopoese. Para que esse processo ocorra é necessário a ação da eritropoietina, hormônio que atua sobre as células-tronco, através da indução e da diferenciação dos progenitores da linhagem eritrocitária (UFC – E) .....	23
<b>FIGURA 8</b> - Imagens na sequência: (a) dermatite esfoliativa; (b e c) lesões ulcerativas; (d) alopecia periocular; (e) onicogrifose; (f) caquexia.....	25
<b>FIGURA 9</b> - Desenho apresentando os sítios de coletas da medula óssea. (a) região corpo do íleo; (b) região fossa trocântérica do fêmur; (c) região tubérculo do úmero proximal; (d) região de tíbia proximal.....	32
<b>FIGURA 10</b> - Material utilizado para o preparo e aplicação das células-tronco.....	44
<b>FIGURA 11</b> - Ordem da esquerda para direita: (a) células-tronco após o descongelamento; (b) processo de centrifugação; (c) procedimento de lavagem das células; (d) presença do pellet após lavagem, para serem aplicadas; (e) acesso do canal medular; (f) aplicação das células-troncos na região de úmero proximal do membro direito e esquerdo.....	45

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Hemograma (1), realizado dia 29/06/2019.....	40
<b>Quadro 2</b> - Hemograma (2), e perfil bioquímico realizados em janeiro de 2021.....	41
<b>Quadro 3</b> - Mielograma (2), solicitado para avaliação da produção celular na medula óssea, realizado em março de 2021.....	43
<b>Quadro 4</b> - Hemograma (3), realizado dia 14 de abril de 2021, para avaliar se houve melhora no quadro do paciente após a aplicação da primeira sessão de terapia com células-tronco.....	47
<b>Quadro 5</b> - Mielograma (3), realizado dia 08/05/2021, para avaliar se houve alguma alteração nas células da medula óssea após a segunda aplicação da terapia com células-tronco.....	47
<b>Quadro 6</b> - Hemograma (4), realizado no dia 28/05/2021, representando a evolução do tratamento após a terapia com células-tronco.....	49
<b>Quadro 7</b> - Hemograma (5), realizados no mês 06 e 07 de 2021, para acompanhamento do paciente após o tratamento com células tronco.....	49
<b>Quadro 8</b> - Representação dos resultados obtidos nos hemogramas, comparando a quantidade de células eritrocitárias, hematócrito e hemoglobina, nas fases assintomáticas e sintomáticas do paciente.....	51
<b>Quadro 9</b> - Resultados comparativo dos exames de hemograma, realizado no período inicial e final do tratamento, comprovando a eficácia do tratamento de células-tronco na hipoplasia medular.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHIM - Anemia hemolítica imune mediada  
ALT - Alanina aminotransferase  
AST - Aspartato aminotransferase  
CEMM - Células-tronco mesenquimais multipotentes  
CID - Classificação internacional de doenças  
CTE - Células-tronco embrionária  
CTH - Células-tronco hematopoiética  
CTMs - Células-tronco mesenquimais  
CTTA - Células-tronco tecido adiposo  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática  
FA - Fosfatase alcalina  
HCT - Hematócrito  
HGB - Hemoglobina  
IFN $\gamma$  - Interferon-gama  
IgG - Imunoglobulina G  
IL - Interleucina  
IV - Intravenoso  
L - *Leishmania*  
LPG - Lipofosfoglicano  
LV - Leishmaniose Visceral  
LVC - Leishmaniose Visceral Canina  
RM:E - Relação Mielóide: Eritróide  
MCH - Mean Corpuscular Hemoglobin  
MCHC - Concentração de hemoglobina corpuscular média  
MHC - Hemoglobina corpuscular média  
MVC - Volume corpuscular médio

NaCl - Cloreto de sódio

NK - Natural Kiler

PCR - Reação em Cadeia polimerase

qPCR - Reação em cadeia polimerase quantitativo em tempo real

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

SP - São Paulo

TNF – Fator de Necrose Tumoral

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Leishmaniose Visceral Canina .....	15
2.1.1 Etiologia .....	16
2.1.2 Transmissão .....	18
2.1.3 Resposta imunológica contra o parasita.....	20
2.1.4 Leishmaniose visceral e a medula óssea .....	22
2.1.5 Manifestações Clínicas .....	24
2.1.5.1 Aplasia Medular – Pancitopenia – Hipoplasia Eritrocitária .....	26
2.1.6 Diagnóstico.....	28
2.1.6.1 Mielograma.....	30
2.1.6.2 Anemia Hemolítica Imunomediada (AHIM) - Diagnóstico Diferencial.....	33
2.1.7 Alterações hematológicas e bioquímicas .....	33
2.1.8 Tratamento .....	34
2.1.8.1 Terapia com Células Tronco .....	35
2.1.8.2 Fonte das CTMs e Vias de Aplicação.....	37
2.1.8.3 Terapia com CTMs na Aplasia Medular .....	38
<b>3. RELATO DE CASO.....</b>	<b>40</b>
3.1 DISCUSSÃO.....	50
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença crônica e de caráter zoonótico, que acomete o homem, além de outras espécies de animais, afetando principalmente o cão. Ela é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, e sua transmissão ocorre através da picada dos flebotomíneos do gênero *Lutzomya*. (VEIGA, 2020).

É uma doença endêmica em várias partes do mundo, estando entre as 6 endemias de maiores prioridades no mundo, e também a mais negligenciada na atualidade. Ela pode se apresentar na forma assintomática no início da doença, e evoluir depois para sua forma mais grave, levando o paciente a óbito. Dentre as manifestações clínicas mais comumente, podemos citar: dermatites, ulcerações, alopecia, hiperqueratose, anorexia, apatia, diarreia, linfadenomegalia, onicogribose e insuficiência renal (QUEIROZ, 2009 e JERICÓ, 2015).

A LVC também pode levar a quadros de doenças aplásicas, pois essas alterações estão associadas a processos inflamatórios e a infecção crônica. Além disso, ela tem a capacidade de modificar a homeostasia da medula óssea, causando perda da função nas células sanguíneas e na sua capacidade de regeneração, provocando disfunções medulares (ALONSO, 2012).

Para o diagnóstico da LVC podemos utilizar os testes parasitológicos, os moleculares, o sorológico e o mielograma. O mielograma é um exame utilizado para a avaliação microscópica da medula óssea, e para averiguar a funcionalidade da hematopoiese e das características medulares. Indicado para o diagnóstico de aplasias, hipoplasias e pancitopenias medulares, e também para achados de hemoparasitoses como a presença de *Leishmanias* na medula óssea (MIRANDA, 2020).

A terapia com células-tronco tem sido muito utilizada para fins terapêuticos de diversas doenças, principalmente das disfunções medular. Essas células possui a capacidade de auto-renovação e diferenciação de células especializadas e também de regeneração de diferentes tecidos. Para terapia as células mais utilizadas são as CTMs, encontradas em tecidos adultos, que podem ser adquiridas através da medula óssea, tecido adiposo e do cordão umbilical.

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar o uso da terapia com células-tronco no tratamento da hipoplasia medular de um cão portador de leishmaniose visceral canina.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

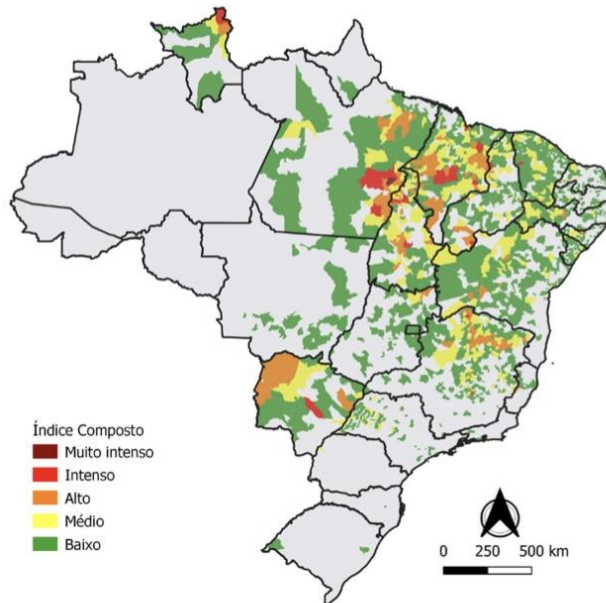
### 2.1 Leishmaniose Visceral Canina

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é uma doença de distribuição mundial, sendo essa a forma mais severa dentre as leishmanioses. Ela pertence ao grupo de enfermidades parasitárias de caráter grave e crônico, podendo ser fatal. É uma doença de grande importância para a saúde pública pois é de caráter zoonótica, podendo ser transmitida ao ser humano, sendo conhecida popularmente como Calazar. Além disso, ela acomete outras espécies como cães, felinos, raposas, equídeos e gambas (MOMO, 2013).

Atualmente a LV tem sido considerada uma doença emergente e reemergente, afetando áreas rurais e urbanas, principalmente em regiões com grande densidade populacional e com péssimas condições sanitárias. No Brasil, o cão é a espécie de maior prevalência da doença, e possui um papel importante na distribuição da infecção no local, pois é o maior hospedeiro doméstico e a principal fonte de disseminação da enfermidade. Os cães servem como fonte de alimentação e de infecção para os insetos, que subsequente transmitem a doença para o ser humano e assim torna-se uma nova fonte de infecção para o vetor, formando um ciclo de transmissão da doença (LAURENTI, 2010; BARROS, 2011).

Segundo o último levantamento do Ministério da Saúde, em 2019, o Brasil apresentou 2.529 casos confirmados de LVC distribuídos em 24 Unidades Federativas de 5 regiões, onde o Nordeste prevalece como o maior registro de casos no Brasil (49,1%). Porém, o único município que foi classificado como transmissão muito intensa fica localizado no Eldorado dos Carajás – Pará. As demais regiões de maiores incidência como, Roraima, Tocantins, Maranhão, Pará, Ceará, Piauí, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, receberam a classificação de intensa (Figura 1) em relação a taxa de incidência e ao número absoluto de casos, nos últimos 3 anos (Ministério da Saúde, 2021).

FIGURA 1 - Mapa representando as áreas de risco da leishmaniose visceral em diferentes regiões brasileiras



FONTE: Ministério da Saúde (2021).

O Tocantins possui altos índices de prevalência da LVC no Brasil. Isso ocorre devido suas características climáticas e ambiental, que são favoráveis para o desenvolvimento do vetor.

### 2.1.1 Etiologia

A forma visceral da leishmaniose é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania sp.*, da classe *Zoomastigophorea*, da ordem *Kinetoplastida* e da família *Trypanosomatidae*. Nos países das Américas as espécies mais encontradas são a *Leishmania infantum* e a *Leishmania chagasi*. Porém, através de análises bioquímicas, foi identificado uma similaridade das espécies *L. infantum* e *L. chagasi*, e dessa forma ficou concluído que as duas espécies são sinônimas (FREITAS, 2019). O microrganismo da leishmaniose possui um desenvolvimento intracelular obrigatório, com características de heteróxico, unicelular, com presença de núcleo e DNA mitocondrial (GRAMICCIA, 2011).

O ciclo biológico das *leishmania*, consiste em uma fase nos hospedeiros invertebrados, chamadas de formas promastigotas (Figura 2), cuja multiplicação ocorre por divisão binária no tubo digestivo das fêmeas dos flebotomíneos e sendo inoculado através da saliva do mosquito durante o repasto sanguíneo. A outra fase se realiza nos hospedeiros vertebrados, que são os reservatórios, e a forma amastigotas (Figura 3) vivem e se multiplicam nos vacúolos parasitóforos dos macrófagos, também por divisão binária (GRAMICCIA, 2011).

FIGURA 2 - Forma promastigota de *L. Infantum* que podem ser encontradas no tubo digestivo do vetor

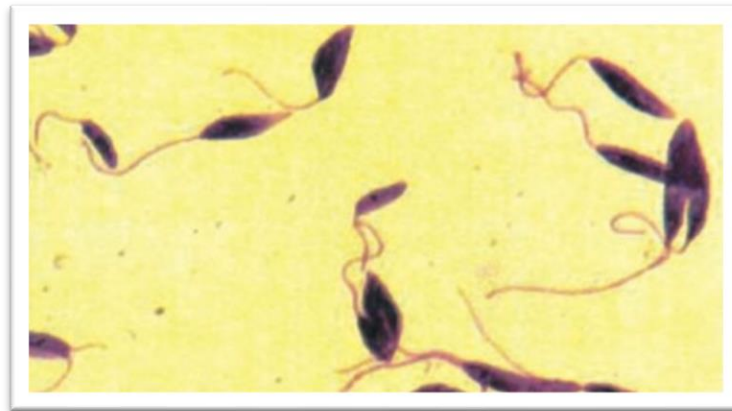
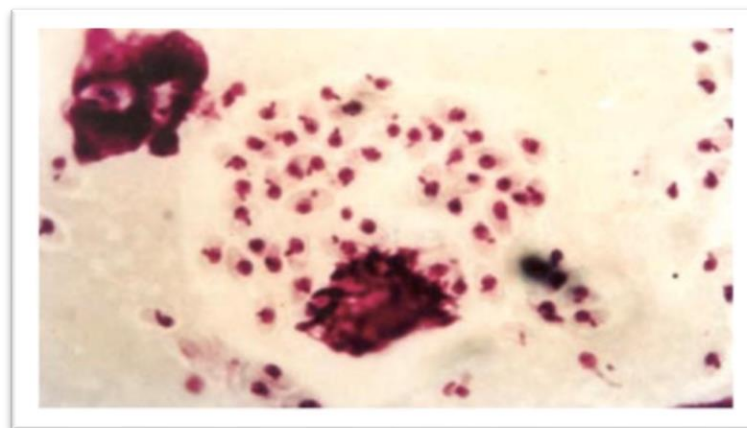


FIGURA 3 - Forma amastigota de *L. infantum* que podem ser encontradas nos tecidos dos cães



Fonte: GRAMICCIA (2011).

### 2.1.2 Transmissão

A transmissão do parasita para o ser humano e outros hospedeiros ocorre através da picada de fêmeas dos mosquitos flebotomíneos. Os mosquitos são artrópodes dípteros da família *Psychodidae*, do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. Somente as fêmeas são transmissoras do parasita, sendo elas hematófagas obrigatórias com uma longevidade estimada em 20 dias. No Brasil a principal espécie de transmissão da LV é a *Lutzomyia longipalpis* (Figura 4). São conhecidos popularmente por mosquito palha, asa-dura, birigui, tatuquiras, cangalhinha e mosquito polvora. São pequenos insetos que medem de 2 a 3 mm, com coloração cor de palha ou castanho claro. Possuem hábitos crepusculares, e as fêmeas se alimentam de sangue para a maturação dos ovos. Os mosquitos tem uma maior incidência em locais de matas, serras, florestas, abrigos de animais, peridomicílios, rios e cavernas. Se desenvolvem em lugares úmidos e com baixa luminosidade e rico em matérias orgânicas (JERICÓ, 2015).

FIGURA 4 - Fêmea do mosquito flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*



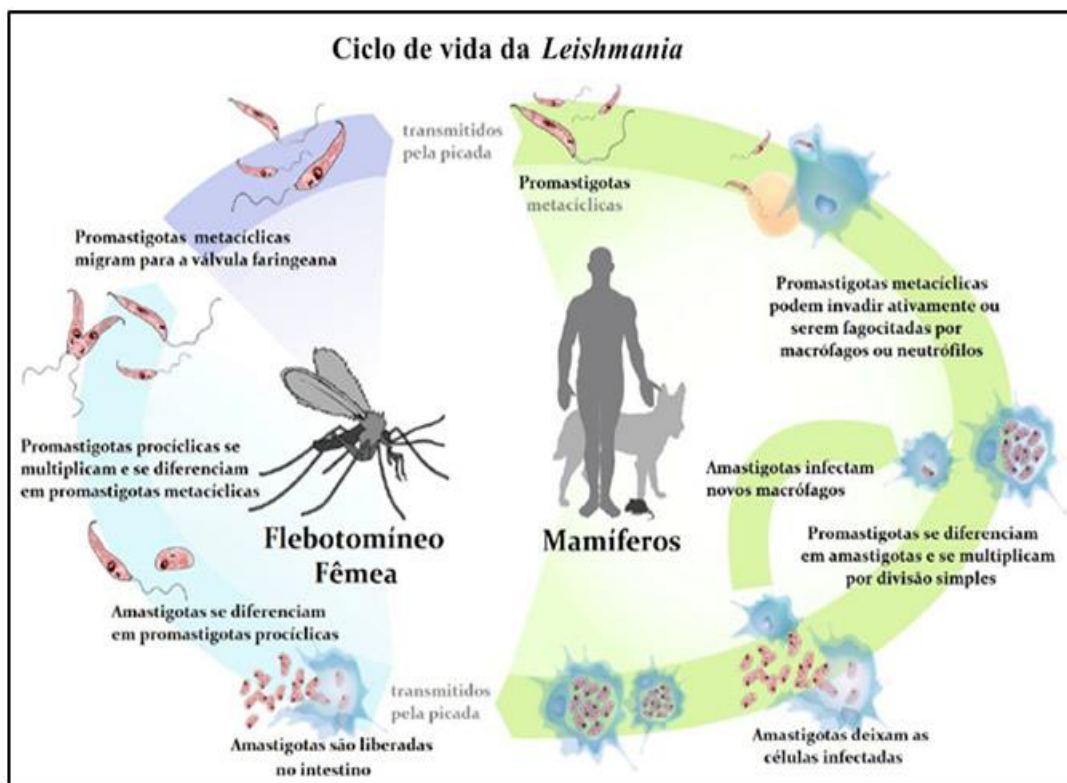
FONTE: GRAMICCIA (2011).

O ciclo biológico *L. longipalpis* ocorre num ambiente terrestre, e possui quatro estágios de desenvolvimento que são: ovo, larvas (4 estádios), pupa e adultos. Realizada a cópula, as fêmeas procuram lugares com presença de substratos úmidos presentes no solo, com alto teor de matéria orgânica, para a deposição de seus ovos.

Num período de 7 a 10 dias após a postura, esses ovos eclodem, liberando as larvas. As larvas se alimentam e se desenvolvem por um período de 20 a 30 dias, passando por 4 estádios, se transformando em pupas. Durante o período de uma a duas semanas, permanecem nesse período pupal, e não se alimentam. Passado esse período, essas pupas dão origem aos mosquitos adultos (BRASIL, 2014).

A infecção inicia (Figura 5) quando a fêmea do flebótomo suga o sangue do vertebrado infectado para realizar o repasto sanguíneo e assim ingere macrófagos infectados nas formas amastigotas. Quando atingem o trato digestório anterior, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas que, por sua vez, se diferenciam em promastigotas e se multiplicam no sangue por sucessivas divisões binárias. Após a digestão, as promastigotas são liberados e vão colonizar diferentes regiões do tubo digestivo do vetor, como esôfago e a faringe. Por fim, se diferenciam para o estágio infectante – promastigotas metacíclicas (LAURENTI, 2010).

FIGURA 5 - Ciclo de vida da *Leishmania*



FONTE: VEIGA (2020).

No hospedeiro, a infecção ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada pica a pele do mamífero e regurgita as formas promastigotas infectantes, junto com a saliva do vetor. Essas formas são fagocitadas pelo sistema de defesa do hospedeiro, através da ação dos macrófagos, e se alojam no interior dos vacúolos parasitóforos, se transformando em formas amastigotas. Em seguida, inicia o processo de multiplicação até o rompimento da célula e, assim, amastigotas são liberadas e fagocitadas por novos macrófagos, promovendo a disseminação para outros tecidos como linfonodos, medula óssea, fígado e baço (BRASIL, 2014).

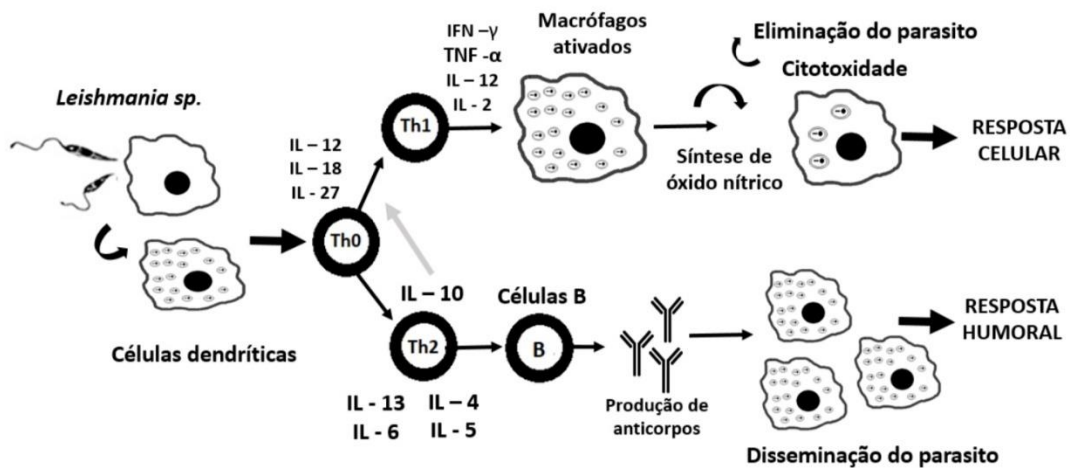
### 2.1.3 Resposta imunológica contra o parasita

Após a entrada no organismo do hospedeiro, os parasitas *Leishmania* vão se deparar com a primeira linha de defesa do organismo, realizado pela resposta imune inata. Uma vez inoculada no organismo, os parasitas na sua forma promastigotas são recrutadas pelos macrófagos, dando início a uma sequência de eventos, com a formação dos fagolisossomos. Entretanto, esses parasitas possuem a capacidade de escaparem do mecanismo de defesa, diferenciando-se para sua forma amastigota e promovendo sua multiplicação dentro dos fagolisossomos. Dessa forma, ele produz compostos como os glicofosfoglicanos (LPG), que são capazes de inibirem a maturação dos fagossomos através da inibição do óxido nítrico, impedindo assim a fagocitose (GREENE, 2015).

No mecanismo de defesa (Figura 6), as células dendríticas fagocitam o parasita e estimulam a liberação das citocinas IL-12. Essas citocinas estimulam a diferenciação das células T CD4+ do tipo 1 (Th1), CD8+ e as células NK a liberarem os IFN- $\gamma$ . Os macrófagos após a fagocitose, liberam a TNF- $\alpha$  que em ação com o IFN- $\gamma$  ativa a enzima óxido nítrico que estão presentes nos macrófagos. Essa enzima é uma substância que promove a morte das células que fagocitaram os parasitas na sua forma amastigota. Em contrapartida, a resposta imune do tipo 2 (Th2) também são ativadas. Essas células tem a função de liberarem as IL- 4 e IL- 10, sendo responsáveis pela suscetibilidade da doença. Durante o processo de infecção, ocorre um aumento nas IL-4. Essas citocinas fazem com que ocorra uma diminuição na

captação dos receptores de IL-12. Com isso, ocorre uma diminuição na produção do IFN- $\gamma$ , e conseqüentemente uma interferência na ação dos macrófagos. Além disso, o aumento das IL-4 faz com que os animais infectados desenvolvam sinais clínicos mais pronunciados. As IL-10 são responsáveis por inibir a síntese de citocinas do Th1 (IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) e como conseqüência inibi também a ativação dos macrófagos (ALBUQUERQUE, 2013 e JERICÓ, 2015).

FIGURA 6 - Resposta imunológica da LV: Células dendríticas fagocitam o parasita e apresentam para as células Th1 e Th2; Th1 atua na eliminação do parasita e Th2 atua na suscetibilidade da doença



FONTE: VEIGA (2020).

Miranda (2018) cita em seu trabalho que o desenvolvimento da doença no hospedeiro está relacionado com a resposta imunológica do indivíduo e com a resistência e proliferação do parasita. E que a resposta imune inata vai agir para a manutenção do parasita no organismo, e a resposta adaptativa vai agir controlando a infecção.

O tipo de resposta imunológica que será produzida (Th1 ou TH2), dependerá da produção de citocinas que foram produzidas após o parasita entrar em contato com algumas células do sistema de defesa como, os macrófagos, os monócitos, linfócitos T CD8+ e células NK. As células NK atuam na resistência da infecção do hospedeiro.

Na pele, essas células produzem o IFN- $\gamma$  e a IL-12, cuja a função é induzir a produção de óxido nítrico pelos macrófagos (JERICÓ, 2015).

#### 2.1.4 Leishmaniose visceral e a medula óssea

A medula óssea é um órgão dinâmico e auto-renoável e tem como função oferecer suporte estrutural e nutricional, para a produção, diferenciação, proliferação, maturação e para o desenvolvimento das diferentes células sanguíneas. A medula óssea localiza-se nos ossos longos e chatos em animais jovens, e nos adultos estão presentes nos ossos chatos e nas extremidades dos ossos longos (ORKIN; ZON, 2008). Para que a hematopoiese ocorra é necessário a ação de citocinas hematopoiéticas, derivada das células do estroma e da matriz extracelular, dos macrófagos e de outras células. Deste modo, caso aconteça uma mudança nessas citocinas pode ocorrer uma interferência na produção celular local, resultando a uma displasia e refletindo diretamente nos outros órgãos linfoides (MOMO, 2013).

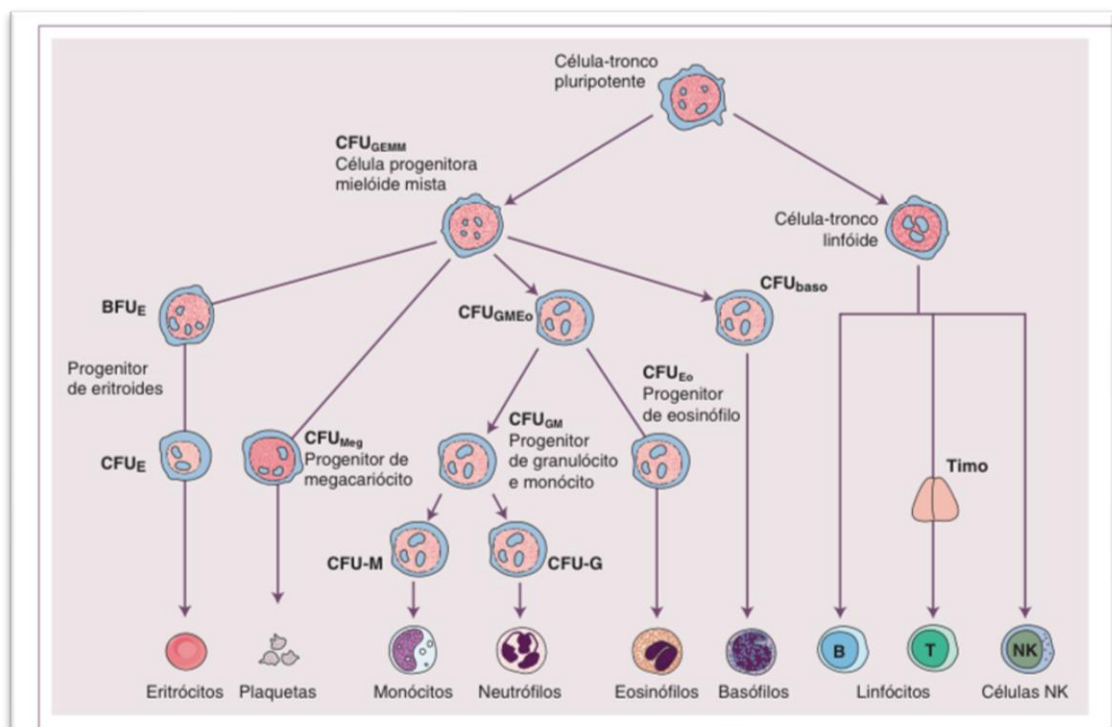
A medula óssea histologicamente é dividida em medula óssea vermelha e medula óssea amarela. O tecido vermelho é tecido altamente vascularizado, que fornece sustentação as células hematopoiéticas. Já o tecido amarelo é constituído por células mesenquimais repletas de lipídios, e perdem a capacidade hematopoiética conforme o animal vai envelhecendo. Porém, caso exista a necessidade de uma nova produção de células sanguíneas, a medula óssea amarela pode voltar a ser medula óssea vermelha. Quando a medula amarela atinge a fase senil, ela se torna uma medula fibrosada, e sua expansão se torna difícil e vagarosa, dificulta uma resposta rápida, caso o animal tenha um processo de anemia. (SANTANA, 2017; MIRANDA, 2018).

Na hematopoiese é aonde ocorre o processo de divisão e diferenciação das células tronco nas demais células sanguíneas (Figura 7). No início da vida ela se desenvolve ainda no embrião, e ocorre no fígado, baço e medula óssea. Nos animais jovens, ela ocorre no timo, linfonodos, fígado, estômago, rins e intestino. Com o passar do tempo ela passa a se desenvolver primariamente na medula óssea vermelha. Nos cães, a produção, a diferenciação e a maturação são reguladas através da eritropoietina e a trombopoetina, citocinas responsáveis pela produção dos eritrócitos,



plaquetas e pelo fator de crescimento que estimula a colônia granulocítica (G-CSF) a regular a produção dos leucócitos (ALMEIDA, 2017).

FIGURA 7 - Esquema do processo de divisão e diferenciação células sanguíneas e seus precursores na hematopoiese. Para que esse processo ocorra é necessário a ação da eritropoietina, hormônio que atua sobre as células-tronco, através da indução e da diferenciação dos progenitores da linhagem eritrocitária (UFC – E).



FONTE: GOTIJO (2017)

A hematopoiese é o sistema responsável pela produção das células sanguíneas. Para que ocorra o processo de proliferação, diferenciação e maturação das células é necessário que haja uma interação molecular das células com a medula óssea. As células tronco hematopoiéticas são necessárias para reabastecer as células progenitoras, pois as células sanguíneas maduras possuem um tempo curto de vida. As células tronco são raras e residentes na medula óssea em animais adultos e são produtoras dos precursores das células sanguíneas. Sendo responsáveis pela diferenciação de linhagem única e da produção das células maduras (GOTIJO, 2017).

Doenças infecciosas tem a capacidade de modificarem a homeostasia da medula óssea, provocando alterações na hematopoiese, causando perda da função nas células sanguíneas e também na sua capacidade de regeneração. Essas alterações estão relacionadas com o tropismo do patógeno em relação as células da medula óssea e da resposta imunológica do animal infectado, podendo levar o animal ao quadro de hipoplasia medular (GIRARDI, 2014).

A eritropoiese é o processo de formação dos eritrócitos maduros. Em períodos normais, esse processo ocorre na medula óssea, através da diferenciação e multiplicação das células-tronco. Essas células permanecem na medula até sua fase de metarrubricitos. Antes de atingir sua fase de eritrócitos, essas células passam por diferentes fases de diferenciação. E toda essa produção é controlada pelo hormônio eritropoetina (BAETA, 2015). A eritropoetina é um hormônio produzido pelos rins, e em menor quantidade pelo fígado (LOPES, 2007).

Em cães com LVC foram observadas alterações na medula óssea através de exames citológicos, atingindo as linhagens eritrocitárias, trombocitárias e leucocitária, favorecendo ao surgimento de distúrbios hemostáticos. A doença contribui para o desenvolvimento de uma inflamação granulomatosa na medula óssea, e um aumento na quantidade dos linfócitos e plasmócitos, apresentando um quadro de hipoplasia medular (ALMEIDA, 2017).

Uma pesquisa realizada por Momo (2014), ele apresenta que as principais alterações encontradas na medula óssea de cães infectados por LVC foram presença de granulomas, aplasia medular e displasia megacariocítica. E que essa displasia pode estar relacionada pela presença de muitos macrófagos parasitados e ativados no determinado órgão.

#### 2.1.5 Manifestações Clínicas

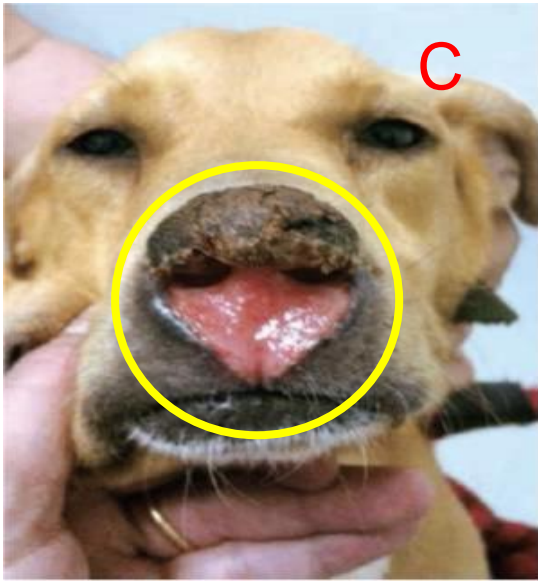
O aspecto clínico da leishmaniose pode variar de um estado aparentemente sadio a um estado severo, levando o animal a morte. O que vai determinar a gravidade dessas manifestações será a resposta imunológica do infectado, virulência do parasita, estado nutricional e a idade do paciente. (BARBOSA, et.al., 2013).

A Leishmaniose visceral canina apresenta diversas alterações sistêmicas e sinais inespecíficos. As alterações dermatológicas acometem a maioria dos animais infectados sintomáticos, afetando todas as camadas que compõem a pele. Os animais vão apresentar quadros de dermatite esfoliativa (Figura 8A) sem a presença de prurido (JERICÓ, 2015). Podem apresentar lesões cutâneas formando pequenas úlceras (Figura 8B e C) com descamação e alopecia periorcular (Figura 8D), espelho nasal, orelha, focinho, cauda e articulações. Apresentam lesões com difícil cicatrização e algumas manifestações atípicas como, hiperqueratose nasal e nos dígitos, presença de despigmentação e pelos opacos e quebradiços (BRASIL, 2014).

Além disso, podem apresentar alterações histopatológicas como, ortoqueratose, edemas, crostas, dermatites perivasculares, intersticial e nodulares; hiperplasia epidermal, adenite sebáceas, perifoliculites e paniculites. Na fase mais avançada da doença, o infectado pode apresentar linfadenomegalia, onicogribose (Figura 8E), esplenomegalia, ceratoconjuntivite, uveíte, apatia, anemia, vômito, diarreia, febre irregular e de longo período, hiperqueratose e melena (VEIGA, 2020). Na fase final da doença, o animal apresenta um emagrecimento progressivo levando a um quadro de caquexia (Figura 8F), pneumonia, comprometimento do sistema hepático e urinário, alterações neurológicas e morte (QUEIROZ, 2009).

FIGURA 8 - Imagens na sequência: (A) dermatite esfoliativa; (B e C) lesões ulcerativas; (D) alopecia periorcular; (E) onicogribose; (F) caquexia.





Fonte: JERICÓ (2015).

#### 2.1.5.1 Aplasia Medular – Pancitopenia – Hipoplasia Eritrocitária

A aplasia medular é um distúrbio que pode ocorrer de forma congênita, ou adquirida. Tem como característica a deficiência na medula óssea, sendo provocada por alguma disfunção medular, podendo ser de moderada a grave. O termo aplasia é definido quando todas as células do sistema hematopoiéticos são reduzidas ou se

tornam ausentes, o que seria incompatível com a vida. Na verdade, a anemia aplásica se trata de uma hipoplasia medular, sendo caracterizada como uma deficiência na produção das células sanguíneas na medula óssea. São geralmente classificadas como uma anemia normocítica, normocrômica arregenerativas. Nos achados das doenças são comuns a presença de neutropenia e trombocitopenia. A relação mielóide/eritróide pode ser variada. A presença de hipocelularidade medular ou proliferação de células anormais também são comuns de encontrar (ALONSO, 2012; SANTANA, 2017).

Há diversos fatores que podem levar ao desenvolvimento da aplasia medular, dentre elas podemos citar: as de origem infecciosas, medicamentosas, toxinas e radiação, por causas idiopáticas e alguns agentes quimioterápicos que atuam em tecidos neoplásicos. A forma aguda é quando ocorre a destruição das células progenitoras e das células proliferativas, levando a um quadro de leucopenia e trombocitopenia que aparecem em torno de 2 semanas após ocorrer a injúria na medula óssea. Com o passar dos dias, surge também o quadro de neutropenia. O animal vai apresentar sinais de anemia que podem ser leves ou ausentes. Na anemia crônica ocorre lesões nas células tronco; o animal pode apresentar quadro de neutropenia e trombocitopenia, com sinais de anemia de moderada a intensa (MORAES; TAKAHIRA, 2010).

Costa; et.al (2019), define aplasia medular como uma pancitopenia periférica, com diminuição nas células eritróides, mielóide e das células megacariócitos. É uma hipoplasia na medula óssea provocando uma substituição do tecido hematopoiético por tecido adiposo, podendo ocorrer de forma aguda ou crônica.

A pancitopenia é uma palavra de origem grega, e *pan* significa todo. Não se trata de uma doença e sim de uma diminuição de três linhagens de células presentes no sangue, provocando uma aplasia medular. As linhagens de células sanguíneas que sofrem essa alteração são os eritróides, mielóides e megacariocítica, levando ao quadro de anemia, trombocitopenia e leucopenia. Essa alteração nessas linhagens é designada como aplasia medular (GIRARDI, 2014).

Um dos fatores que levam ao quadro de pancitopenia é o hiperesplenismo, que é quando ocorre uma hiperplasia do sistema fagocitário mononuclear associado da

anemia, trombocitopenia, leucopenia e hiperplasia medular. Outro fator predisponente à pancitopenia é a mielodisplasia e a hemofagocitose. (PINHO, 2014).

Na LVC o desenvolvimento dessa hipoplasia, está relacionada com a anemia da inflamação, conhecida também por anemia das doenças inflamatórias. Esse tipo de hipoplasia está associado a processos inflamatórios, infecções crônicas, fraturas, lesões tissulares e neoplasias. Na medula óssea, a linhagem eritróide é afetada pela falta de eritropoietina, devido a mediadores inflamatórios que inibem a eritropoiese, impedindo a sua produção. Essa diminuição eritrocitária provoca uma hiperatividade do sistema mononuclear fagocítico, e com isso promove uma remoção dos eritrócitos circulantes, diminuindo a sobrevivência das hemácias (ALONSO, 2012; HONSE, 2014).

Para o diagnóstico da aplasia medular o ideal é realizar uma avaliação da medula óssea, podendo ser realizado através da punção da medula ou através de exames histopatológicos, sendo o mielograma o exame mais utilizado (MIRANDA, 2010).

#### 2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da doença é difícil, pois as manifestações clínicas são compatíveis com outras doenças devido as variedades de sinais clínicos que o portador de leishmaniose pode apresentar. Sendo assim, pode levantar as suspeitas de outras doenças, como erliquiose e babesiose. Além disso, a leishmaniose leva a imunossupressão do animal, gerando outras infecções oportunistas. Desta forma, é importante ser analisados todos os parâmetros, avaliando os achados clínicos, epidemiológicos e os exames laboratoriais (ALVES; et.al, 2015)

Os exames laboratoriais são importantes para criar um papel hematológico e avaliar a evolução da doença. Existem uma variedade de testes que ajudam a diagnosticar a doença, como os testes parasitológicos, moleculares e sorológicos (FARIA; ANDRADE 2012).

Os testes parasitológicos são realizados através da análise citológicas, permitindo a identificação do parasita na sua forma amastigota através de uma amostra do tecido do animal. O método de PAAF consiste na punção de órgãos como aspirado (linfonodos, medula óssea e baço) e na biopsia hepática ou de pele, sendo



a punção de medula óssea e linfonodo o método mais utilizado. O material coletado é colocado sobre uma lâmina, onde se realiza esfregaço ou imprints. Em seguida é corado com corantes de Giemsa, Panótico e Wright. Embora esse método é muito utilizado, em animais assintomáticos o resultado pode dar falso-negativo, quando há formas amastigotas presentes (FARIA; ANDRADE 2012). Essa pesquisa direta do parasita apresenta uma especificidade de 100%, porém sua sensibilidade é baixa (50 a 80%). Isso ocorre devido a distribuição tecidual não ser homogênea (BARROS, 2011).

Outra metodologia de pesquisa de Leishmaniose são os testes moleculares, que constituem da reação em cadeia polimerase (PCR) e a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Esses testes tem como finalidade identificar o DNA ou partes do cinetoplasto do parasita. O material para análise é coletado a partir de alguns tecidos como sangue, medula óssea, secreções oculares, linfonodos, urina ou através da biopsia da pele. São testes muito específicos e sensíveis e, dependendo do estágio em que se encontra a doença e do tipo de amostra coletada, podem chegar a 100% de especificidade. O sangue se torna a forma mais fácil de ser adquirida, sendo uma forma menos invasiva. Porém ela apresenta uma baixa sensibilidade por constar pequenas quantidades de parasitos na circulação. Para uma identificação com o PCR é necessária uma carga parasitária maior que 30 parasitos/ml, enquanto que a qPCR necessita de uma carga menor que 0,1 parasitos/ml (FREITAS, 2019).

Os testes sorológicos consistem na detecção dos anticorpos anti-*Leishmania spp.*, pois durante a infecção o organismo apresenta um alto nível de IgG anti-*Leishmania spp.* Os testes mais utilizados são os de ELISA e o teste de RIFI e também os exames imunocromatográfico, chamados testes rápidos. O teste ELISA é utilizado como um teste de triagem das amostras, cuja a finalidade é identificar as negativas. E o teste de RIFI é utilizado para a confirmação das amostras reagentes realizados pelo teste de ELISA. Utiliza-se soro sanguíneo para a realização dos testes sorológicos (QUEIROZ, 2009).

O teste de RIFI é utilizado para diagnosticar outras doenças parasitárias e ele pode apresentar reação cruzada com outras espécies, como o *Trypanossoma cruzi*, e até mesmo outras espécies de *Leishmania spp.* Para que o diagnóstico seja dado

como soro reagente é ideal que ele apresente um título igual ou superior a 1:40 (FREITAS, 2019).

O teste de ELISA é realizado através cultura *in vitro*, sendo feita a partir do soro sanguíneo. Nele é analisado a reação dos anticorpos presentes com os antígenos solúveis da *Leishmania*. O método consiste na adição do antígeno sobre uma microplaca, e em seguida adiciona o soro diluído. Desta forma, os anticorpos presentes no soro vão se fixar aos antígenos. Depois é adicionado uma anti-imunoglobulina marcada com a proteína peroxidase, que se ligara aos anticorpos presentes. O resultado é considerado positivo quando o valor da densidade ótica é igual ou superior a 3 desvios padrões do ponto de corte (*Cut-off*), quando comparado ao resultado do controle negativo (BRASIL, 2014).

O teste imunocomatográfico é um método de triagem rápido e de diagnóstico qualitativo. Até 2011, o diagnóstico padrão era feito primeiro com o ELISA, sendo ele o teste de triagem, e em seguida o RIFI, sendo ele o teste comprobatório de possíveis cães infectados. A partir daí, o Ministério da Saúde modificou o protocolo de diagnóstico para LV, e o teste imunocomatográfico passou a ser o teste de triagem e o ELISA como teste comprobatório (FARIA; ANDRADE, 2012).

#### 2.1.6.1 Mielograma

O mielograma é um exame utilizado para avaliação microscópica da medula óssea quando se deseja averiguar a funcionalidade e as características medulares. Esse exame visa buscar e investigar doenças que podem estar relacionadas ao sistema hematopoiético como as aplasias, hipoplasias e pancitopenias, neoplasias como as leucemias e os linfomas, doenças infecciosas, casos de febres de origem desconhecida, e para achados de hemoparasitose, como bactérias, fungos e protozoários que estão associados a doenças aplásicas (ANDREONI; MIRANDA, 2020).

No geral, esse exame é solicitado após a constatação de anormalidades obtidas no hemograma, e dentre as indicações primárias podemos citar: as anemias arregenerativas, leucopenias, trombocitopenias, elevações inexplicadas no número



de células, células anormais circulantes, estadiamento clínico de neoplasias, hipercalcemia inexplicada (GONZÁLEZ e SILVA, 2008).

O objetivo do mielograma é diferenciar os precursores das células hematopoiéticas e assim determinar a quantidade de células que foram alteradas. É utilizado também para investigar a redução das células da medula óssea comparando com a contagem no sangue periférico. Além disso, é empregado para avaliar a presença de células atípicas e as alterações morfológicas presentes nas células sanguíneas. É um método muito eficiente para o diagnóstico da LVC, e usado como fonte de pesquisa para avaliar parâmetros que apontam a gravidade da doença (MIRANDA, 2018).

A citologia da medula óssea consiste na punção aspirativa, sendo um exame com 100% de especificidade. O método é realizado através do uso de agulhas de modelos e tamanhos variados e o local de coleta e a técnica vai depender da espécie do animal e da preferência do profissional coletor. Em cães o local indicado é nas regiões de úmero proximal, fossa trocantérica do fêmur, áreas trans-íliaca e na crista íliaca (Figura 9). Porém, em cães de pequeno porte as regiões mais indicadas são o úmero proximal e a fossa trocantérica do fêmur. E nos cães de grande porte as regiões mais indicadas são a crista íliaca e o úmero proximal (ANDREONI; MIRANDA, 2020). O material coletado deve ser realizado em condições assépticas, e com o paciente anestesiado. Nas seringas deve ser adicionado o anticoagulante para realizar a sucção da medula (MÜLLER; et.al, 2009).

FIGURA 9 - Desenho apresentando os sítios de coletas da medula óssea. (A) Região corpo do íleo; (B) Região fossa trocantérica do fêmur; (C) Região tubérculo do úmero proximal; (D) Região de tíbia proximal



FONTE: MÜLLER; et.al (2009).

O estudo do mielograma é importante para a avaliação da celularidade, para estimativa da relação mieloide-eritroide (M:E) – que avalia a proporção do número total das células mielóides dividida pelo número total das células eritróides e para análise quantitativa e qualitativa dos tipos celulares que estão presentes na medula óssea. Esse estudo é realizado nas espículas medulares e também serve para avaliar a quantidade de estoque de ferro presentes na medula óssea e possíveis alterações morfológicas nas células (HONSE, 2014).

No mielograma é possível avaliar todos os grupos de células medulares, que são: série mielóides, série eritóide, série linfóide, série monocítica, série megacariocítica. Além disso, é possível fazer uma avaliação qualitativa, através da relação (M:E) mieloide/eritróide (GONZÁLEZ, 2008). A contagem é realizada em cima de 500 células, e o cálculo é baseado no número total de células mielóides, dividido pelo número total de células eritróides, e assim, é comparado o resultado aos valores de referência (0,75:1 - 2,53:1) (STEVEN; SCOTT, 2011).

#### 2.1.6.2 Anemia Hemolítica Imunomediada (AHIM) - Diagnóstico Diferencial

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM), é uma doença de caráter autoimune, sendo uma síndrome clínica que promove a destruição acelerada das hemácias através de mecanismos imunomediados. Ela pode ser classificada em primária, quando os anticorpos são produzidos e liberados direcionando-se para hemácias normais e, secundárias quando hemácias são alteradas por ação de neoplasias, drogas ou doenças infecciosas. Para classificação de AHIM as alterações laboratoriais vão desde uma anemia moderada a intensa, podendo ser classificadas como anemia regenerativas e arregenerativas. Na anemia hemolítica regenerativa está presente uma acentuada policromasia. E na anemia hemolítica arregenerativa ocorre devido a ação dos anticorpos que atacam as células precursoras das hemácias (ALONSO, 2012).

Nos achados laboratoriais é comum a presença de neutrofilia, linfopenia e trombocitopenia. Pode ter alterações no perfil bioquímico, como o aumento da ALT e AST, hipoalbuminemia e presença de CID. Para a confirmação da AHIM o diagnóstico se baseia no teste de Coombs direto, que consiste na mistura da amostra sanguínea com o reagente de Coombs, e caso as células apresentem antígenos que reagem com os anticorpos, o teste é dado como positivo para AHIM (SILVA, 2019).

#### 2.1.7 Alterações hematológicas e bioquímicas

Os exames hematológicos (hemograma e bioquímico) também devem ser realizados, pois são importantes para avaliar o estado clínico do animal e o prognóstico da doença, porém eles não devem ser utilizados como únicos exames para o diagnóstico da doença, pois apresentam resultados limitantes e inespecíficos para a sua conclusão (GREENE, 2015).

Os achados laboratoriais mais comuns estão relacionados ao hematócrito, que se apresentam abaixo do valor de referência. O animal infectado pode apresentar uma anemia arregenerativa, normocítica e normocrômica arregenerativa, podendo ser de leve a moderada. Essa anemia ocorre devido a aplasia medular ou pela insuficiência renal, devido a deficiência de eritropoetina. Além dos quadros de hemorragias, sequestros de hemácias pela produção de autoanticorpos, lise de hemácias e

processos infecciosos induzindo a anemia da inflamação. Outros achados comuns são de leucocitose ou leucopenia e trombocitopatias. As trombocitopenias também podem ocorrer devido ao sequestro pelo baço, o desenvolvimento de vasculite, presença de imunoglobulinas antiplaquetárias e o comprometimento do fígado e rins. No início da doença é comum a presença de leucocitose associado a neutrofilia, e em estágios mais avançados a presença de leucopenia e linfopenia. Em quadros de processos inflamatórios crônicos, é comum a presença de monocitose (GREENE, 2015).

Nos achados bioquímicos é comum apresentar hiperproteinemia e hiperglobulinemia. Esse último está relacionado com o aumento dos anticorpos que tentam neutralizar o parasita, e também com o aumento da proteína total sérica. Além desses, é comum a presença de hipoalbuminemia, que revela um distúrbio na relação de globulina/albumina, promovendo a diminuição da albumina e o aumento da globulina, sendo um sinal característico de lesão renal. As enzimas fosfatase alcalina séricas (FA) e alanina aminotransferase (ALT), fósforo, colesterol, magnésio e bilirrubina também apresentam valores acima dos valores de referência. Esse aumento ocorre devido ao acometimento hepático. Em relação as enzimas renais, a ureia e creatinina também estão aumentadas, devido a injurias que o parasita provoca nos rins (FREITAS, 2019).

Os quadros de azotemia e uremia ocorrem de acordo com a evolução da doença renal. A proteinúria está também ligada ao quadro de doença renal, e ocorre devido ao aumento da permeabilidade capilar do glomérulo e da albumina (FREITAS, 2019).

#### 2.1.8 Tratamento

No Brasil, diferentes protocolos de tratamentos vêm sendo utilizados nos cães que testam positivos para leishmaniose visceral, e muitos com bases em estudos realizados na Europa. Dentre os fármacos os mais utilizados são, anfotericina B encapsulada em lipossomas ou convencional, alopurinol, a pentamidina, miltefosine, sulfato de aminosidina e os antimoniais pentavalentes. Embora o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) liberou o uso do miltefosine, o

Ministério da Saúde proíbe o uso de produtos de humanos e não registrados, como parte do tratamento para os animais. Além disso, outra alternativa que é permitido é a escolha da eutanásia dos cães infectados (FREITAS, 2019).

Os tratamentos disponíveis, não promovem a cura dos cães infectados pelo parasita, porém ele aumenta a expectativa de vida dos animais, e atenua a carga parasitária, diminuindo o risco de transmissão. Todavia, antes de determinar a melhor opção terapêutica, é necessário avaliar com cautela os parâmetros clínicos e patológicos do paciente (MIRANDA, 2018).

#### 2.1.8.1 Terapia com Células Tronco

A terapia com células-tronco tem sido muito utilizada para fins terapêuticos de diversas doenças. Nela são utilizadas diferentes métodos e técnicas com a finalidade de transferir células, com a perspectiva de que essas células proliferem e se diferenciem, para que assim, ocorra a regeneração do tecido (SANTANA, 2017). As pesquisas que envolve o estudo dessas células, tem se fundamentado na avaliação da competência e do potencial em que uma célula tem de se multiplicar por extensos períodos, e se originar em outras células após um determinado estímulo, durante o período da embriologia e da organogênese. Foram analisados que quando as células-tronco são reintroduzidas no organismo, elas podem adquirir a função e a morfologia de células que sofreram injúrias, e assim, reintegram o tecido que foi lesionado (GATTI, et.al, 2014).

As células-tronco são conhecidas também como stem cells, células primordiais e células mãe. São células com características multipotentes e indiferenciadas, e possuem uma alta capacidade de auto-renovação, auto-proliferação e diferenciação de células especializadas, além da regeneração de tecidos que sofreram traumatismos, neoplasias, fraturas, inflamações, necroses e perdas de senilidade. Elas podem ser adquiridas em vários tecidos presentes no organismo como, medula óssea, pele, pâncreas, fígado, baço, músculo, pulmão, coração, polpa dentária, tecido adiposo, placenta, tecidos fetais e cordão umbilical (VISCONDI, et.al, 2013; GATTI, et.al, 2014).

As células-tronco são classificadas de acordo com o local de origem, podendo ser isoladas em diversas etapas de desenvolvimento no nosso organismo. Elas podem ser classificadas como células-tronco embrionárias (CTEs), e células-tronco adultas. As CTEs são originadas na massa interna dos blastocistos sendo classificadas como pluripotentes. Elas possuem uma alta capacidade de regeneração e de se diferenciar em qualquer tipo de célula do organismo. Porém, essas células apresentam um alto risco terapêutico, devido a possibilidade de ocorrer rejeição imunológica, mutações e formação de tumores. Além disso, seu uso envolve questões éticas e morais, pelo fato de ser de origem embrionária, e sua obtenção depender da destruição de um blastocisto. Em relação as células-tronco adultas, essas podem ser divididas em células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e células-troncos mesenquimais (CTMs). As células adultas são classificadas como multipotentes, com capacidade de autorregeneração, e obtidas através de tecidos adultos diferenciados (SANTOS, 2017; FARIA, 2019).

As CTHs estão presentes na medula óssea, baço, timo, nódulos linfáticos e uma pequena quantidade são encontradas na corrente sanguínea. Elas dão origem as células vermelhas, células brancas e as plaquetas, sendo responsáveis pela manutenção do sistema hematopoiético. Essas células são programadas para uma produção de forma contínua e eficiente dos componentes sanguíneos, possuindo uma alta capacidade de autorrenovação. Em cães e gatos, apresentou um potencial para doenças neurológicas, cardíacas, oftálmicas, vasculares e locomotores. Tem se tornado uma terapia de escolha para o tratamento de leucemias e doenças metabólicas. E novos estudos, tem mostrado um grande potencial no tratamento de linfomas, com possibilidades de cura dessa patologia. Apesar das comprovações dos benefícios dessa terapia, ela não tem sido muito utilizada na medicina veterinária, pois apresenta altos custos, e também existem poucas instituições e laboratórios com capacidade de realizar os testes de compatibilidade para seleção dos doadores (SANTOS, 2017; OLSSON, 2020)

As CTMs também são conhecidas como células-tronco mesenquimais multipotentes (CEMM) (SILVA; NOGUEIRA, 2010). São células que pertence a uma linhagem de células-tronco somáticas, e são encontradas em tecidos adultos em regiões perivasculares, como medula óssea, periósteo, órgãos parenquimatosos, tecido muscular e tecido adiposo e atuam na modulação do sistema imunológico do

receptor. Elas agem na reparação do tecido lesionado através do processo de diferenciação e modulação dos mediadores. Essas células possuem a capacidade de liberarem moléculas bioativas que vão operar na modulação da resposta inflamatória, no processo de mitose e angiogênese das células que irão fazer parte do processo de reparação do tecido. As moléculas bioativas que estão envolvidas nesse processo são: as moléculas de adesão, citocinas, proteínas da matriz extracelular e receptores dos fatores de crescimento (SANTOS, 2012).

#### *2.1.8.2 Fonte das CTMs e Vias de Aplicação*

As células-tronco podem ser isoladas na medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical (SANTOS, 2017).

As células de origem do tecido adiposo são classificadas como CTTA, e tem se tornado rotineira seu uso devido ser células de fácil aquisição e de rápida proliferação. É possível se adquirir uma grande quantidade de CTMs, sem alterar o estado clínico do animal. E após a coleta o material já pode ser imediatamente aplicado no paciente ou expandidas e armazenadas (VIDAL; et.al, 2007).

As CTMs de origem do cordão umbilical, é adquirido através do isolamento dessas células pela secção de todo o fragmento do cordão, ou pela separação dos vasos (SARUGASER, 2005).

Para o sucesso do tratamento com as CTMs, além dos fatores que devem ser levados em consideração como, diagnóstico correto, estado clínico do paciente, localização e extensão da lesão e tipo de célula utilizada, as vias de aplicação são de total importância, pois as mesmas podem influenciar no processo de migração e na resposta da injúria. Outros fatores também devem ser levados em consideração, como escolher um processo menos traumático e invasivo possível, com mínimos efeitos colaterais e com maior taxa de sobrevivência das células. Desta forma, existe dois tipos de vias que são utilizadas para a administração das CTMs, que são: endovenosa e a local (SANTOS, 2017).

A via endovenosa é a mais utilizada, sendo a via da veia cefálica a de escolha devido ao seu posicionamento anatômico distinto e de rápido acesso ao sistema venoso. Essa via é considerada pouco invasiva, e de fácil propagação pelo organismo,

e nela é permitido várias aplicações com poucos efeitos colaterais. Porém, a administração por essa via pode gerar alguns efeitos secundários, como febre, queda na pressão, ancoragem da CTMs em outros órgãos, o que pode gerar uma menor resposta terapêutica, devido a diminuição do número de células no local adequado. Além disso, pode ocorrer uma afinidade das células CTMs pelos materiais cirúrgicos, e o uso de cateteres, que são necessários para esses procedimentos, tende a causar a formação de aglomerados celulares, o que podem resultar na formação de trombos. Portanto, deve-se administrar a CTMs por essa via de forma cautelosa, observando a concentração de CTMs e a velocidade de infusão (TRZIL; et.al, 2015; QUIMBY; et.al, 2016).

A via de administração local proporciona a liberação direta das CTMs na área lesionada. Essa via permite uma maior ancoragem celular do local lesionada e uma menor taxa desviada para outros órgãos. O sucesso da terapia vai estar relacionado somente com a manutenção das CTMs na região lesionada, podendo atuar pela ação do seu efeito parácrino ou por diferenciação celular. Porém, é uma via altamente traumática e invasiva, e o médico deve ter um sólido conhecimento da anatomia do local e perícia cirúrgica (BLACK; et.al, 2008).

#### *2.1.8.3 Terapia com CTMs na Hipoplasia Medular*

O uso das CTMs como tratamento para aplasia medular tem se mostrado bastante atrativas, já que vem apresentando resultados positivos na recuperação de pacientes, quando sua única opção era de transfusão sanguínea, que amenizavam os sintomas, mas não curavam os animais. Como tratamento para aplasia medular, as CTMs são aplicadas diretamente na medula óssea ou pela via endovenosa e o que vai determinar o local de escolha, vai ser as condições clínicas em que o paciente se apresenta e a prática do médico veterinário (SANTOS, 2017).

Após a introdução das CTMs na medula óssea do paciente, através da ação parácrina (fatores de crescimento e citocinas anti-inflamatórias), as células irão induzir o processo de mitose e inibir a apoptose e a produção de citocinas pro-inflamatórias. Essas células também irão agir, regulando as funções de quiescência, autorrenovação, proliferação, mobilidade e diferenciação das células presentes na



medula óssea. Além de reduzirem os processos inflamatórios e repopular as células responsáveis por restabelecer a homeostasia no organismo. Essa ação é devida as propriedades imunomoduladoras que as CTMs possuem, elas inibem a ativação e multiplicação dos leucócitos, principalmente os linfócitos T e os macrófagos, e atuam também inibindo a produção de citocinas pro-inflamatórias, e estimulando a produção das citocinas inflamatórias. Desta forma, as CTMs, diminui os danos causados pelas citocinas pro-inflamatórias e auxiliam na recuperação da medula óssea (AMORIM, 2020).

### 3. RELATO DE CASO

O caso relatado é de um cão, macho, castrado, da raça Spitzs Alemão, de 6 anos de idade, pesando 6,200 kg. O paciente é acompanhado pelo Dr. Isaac Pacheco desde os 4 anos de idade, período em que foi diagnosticado com leishmaniose visceral canina. Em uma consulta de rotina foi observado que o paciente apresentava os linfonodos submandibulares levemente aumentados e as mucosas levemente hipocoradas, e os demais parâmetros sem nenhuma alteração. As vacinas e vermifugação estavam em dia, e a tutora fazia o controle de ectoparasitas nos períodos solicitados. Foi observado que o paciente não fazia o uso de coleiras antiparasitárias, e a tutora relatou que não utilizava nenhum tipo de repelentes.

Mediante o histórico e quadro apresentado, foi solicitado os exames laboratoriais (hemograma, perfil bioquímico e teste rápido para erliquiose 4DX e de leishmaniose). No hemograma, o paciente apresentou diminuição nos eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, levando a um quadro de anemia normocítica e normocrômica de caráter arregenerativa; e presença de leucopenia, como mostra no quadro 1. No perfil bioquímico não apresentou nenhuma alteração, estando todos os metabólitos dentro dos valores de referência. No exame de teste rápido para erliquiose, o resultado foi negativo. Em contrapartida, o teste rápido para leishmaniose o resultado foi positivo.

Quadro 1 - Hemograma (1), realizado dia 29/06/2019.

EXAME	RESULTADOS	VALORES DE REFERENCIA
Eritrócito	5.10 M/ $\mu$ L	5.50 – 8.50
HCT	33.1%	37.0 – 55.0
HGB	10.9 g/dl	12.0 – 18.0
MVC	64.9 fL	60.0 – 77.0
MCH	21.4 pg	18.5 – 30.0
MCHC	33.0 g/dL	30.0 – 37.5
Reticulócitos	51.5 K/ $\mu$ L	10.0 – 110.0
Leucócitos	3.94 K/ $\mu$ L	5.50 – 16.90
Neutrófilos	2.08 K/ $\mu$ L	2.00 – 12.0

Linfócitos	1.24 K/ $\mu$ L	0.50 – 4.90
Monocitos	0.45 K/ $\mu$ L	0.30 – 2.00
Eosinófilos	0.16 K/ $\mu$ L	0.10 – 1.49
Basófilos	0.02 K/ $\mu$ L	0.00 – 0.10
Plaquetas	281 K/ $\mu$ L	175 – 500

Fonte: Dados obtidos na Animais Centro Veterinário

Diante desses resultados, foi solicitado o teste sorológico (qPCR), do qual, obteve o resultado positivo.

Três meses após o início do tratamento, como o paciente teve evolução no quadro da doença apresentando lesões dermatológica, localizadas no carpo direito e cotovelo, com formato ovalado, coloração escura e presença de alopecia, sendo uma das manifestações clínicas características da evolução da doença, onde foram solicitados hemograma e bioquímico, e não apresentaram nenhuma alteração nos resultados. O hemograma, apresentou somente um aumento nos reticulócitos. As outras células estavam dentro dos valores de referência. Os exames bioquímicos continuaram sem apresentar nenhuma alteração, mantendo-se dentro dos valores de referência. O tratamento se manteve o mesmo para a leishmaniose, e foi receitado itraconazol 35mg e creme 6<sup>a</sup>, para o tratamento das lesões dermatológicas.

Em janeiro de 2021, o paciente retornou apresentando apatia, fraqueza, intolerância aos exercícios e inapetência. Após avaliação clínica, observou que o paciente apresentava mucosas hipocoradas e desidratação. Ao realizar novamente o hemograma, apresentou anemia microcítica – normocrômica e leucopenia. Em relação ao perfil bioquímico, apresentou um aumento na fosfatase alcalina, que representa alteração no fígado e hiperalbuminemia (Quadro 02).

Quadro - 02 Hemograma (2), e perfil bioquímico realizados em janeiro de 2021.

EXAME	RESULTADOS	VALORES DE REFERENCIA
Eritrócito	6.46	5.50 – 8.50
HCT	35.8	37.0 – 55.0
HGB	12.5	12.0 – 18.0

MVC	55.5	60.0 – 77.0
MCH	19.4	18.5 – 30.0
MCHC	34.9	30.0 – 37.5
Reticulócitos	114.1	10.0 – 110.0
Leucócitos	3.87	5.50 – 16.90
Neutrófilos	2.23	2.00 – 12.0
Linfócitos	1.05	0.50 – 4.90
Monocitos	0.42	0.30 – 2.00
Eosinófilos	0.13	0.10 – 1.49
Basófilos	0.03	0.00 – 0.10
Plaquetas	263	175 – 500
Creatinina	1.1	0.5 – 1.5
TGP (ALT)	50	21 – 102
Fosfatase alcalina	137	10 – 92
Ureia	44.7	21 – 59.9
Proteína Total	6.9	5.4 – 7.1
Albumina	3.9	2.6 -3.3
Globulina	3.0	2.7 – 4.4

Fonte: Dados obtidos na Animais Centro Veterinário

Em fevereiro de 2021, o paciente retornou sem apresentar nenhuma melhora do seu quadro clínico, pois ainda apresentava apatia, fraqueza, mucosas hipocoradas e inapetência. Então foi realizado a punção da medula óssea para o exame de mielograma. Foi realizado a tricotomia na região do úmero proximal do membro torácico direito, para coleta do material. Para sedação e anestesia do paciente, foi administrado acepromazina 0,2%, na dose de 0,25 ml, IV. Depois foi administrado propofol, na dose de 2,5 ml, IV, de forma lenta. No local de aplicação foi realizado antisepsia com clorexidina e álcool. Foi coletado em torno de 1 ml de medula óssea, com o auxílio de seringa de 10ml e agulhas 40x1,2mm (18G) e transferido para o tubo de EDTA. E foi também realizado o esfregaço (*squash*), com o aspirado de medula óssea.

No primeiro mielograma, o resultado apresentou uma anemia normocítica normocrômica e leucopenia, confirmando que o paciente apresentava uma anemia

não regenerativa. Além disso, foi encontrada concentração de amastigotas de *Leishmania sp.* intra e extracelular. Porém não foi observado a presença de espículas nas amostras, local aonde se encontra o material medular. Desta forma, o mielograma foi repetido no mês seguinte, e os resultados estão relatados no Quadro 03.

Quadro 3 - Mielograma (2), solicitado para avaliação da produção celular na medula óssea, realizado em março de 2021.

Células	Resultados	Valores de Ref.
<b>Série Mielóide</b>	<b>181</b>	
• Neutrófilo metamielócito	5.3%	5.3 – 8.8
• Neutrófilo bastonete	4%	12.7 – 17.2
• Neutrófilos	15.1%	13.8 – 24.2
• Eosinófilo mielócito	0.2%	0
• Eosinófilo metamielócito	0.4%	2.4
• Eosinófilos	0.8%	0.3
<b>Série Eritóide</b>	<b>222</b>	
• Rubriblastos	4.3%	0.2 – 1.1
• Proubricitos	8.1%	0.9 – 3.9
• Metarrubricitos	6.6%	9.2 – 16.4
<b>Outras Células</b>	<b>128</b>	
• Linfócitos	5.5%	0.2 – 4.9
• Plasmócitos	1.7%	0 – 0.2
• Monócitos	15.4%	0 – 0.2
• Megacariócitos	0.2%	2 – 7
RM:E	0.82%	0.75 – 2.53:1
Displasia nuclear	<6%	
Atipias celulares	Baixa	

Fonte: Dados obtidos na Animais Centro Veterinário

De acordo com os resultados obtidos no segundo mielograma ficou confirmado que o paciente apresentava uma disfunção na medula óssea, com hipoplasia das células medulares. Diante disso, o tratamento proposto foi a terapia com células-

tronco. O paciente realizou 3 aplicações de células-tronco, com intervalo de 25 dias entre as sessões.

As CTMs utilizadas no tratamento, foram fornecidas pelo laboratório CELLTROVET, localizado em Osasco – SP. As células encaminhadas foram derivadas de adipócitos de origem alogênicas. Além das células, o laboratório fornece também todo o material utilizado para o preparo (Figura 10), que consiste em: 4 criotubos contendo as células-troncos, pipetas Pasteur, solução – NaCl e 2 tubos de propileno. Para a aplicação das células-tronco foi utilizado seringa de 10 ml e agulha 40x1,2mm (18G).

Figura 10 – Material utilizado para o preparo e aplicação das células-tronco



Fonte: Foto do autor

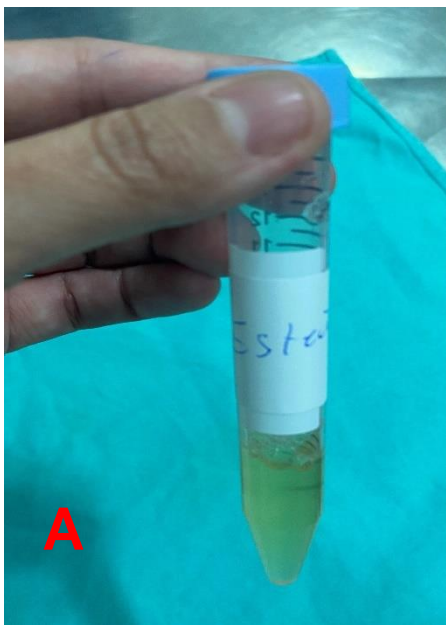
A primeira aplicação de células-tronco foi realizada no dia 30/03/21. O Procedimento iniciou com o preparo do material, as células-tronco foram descongeladas, e prontamente transferidas para o tubo de propileno estéril, e encaminhada para a centrifuga por 5 minutos a baixa velocidade (1100 rpm). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado com o auxílio da pipeta e descartado. Em seguida, iniciou o processo de lavagem, onde foi adicionado solução de NaCl e realizado movimentos de turbilhamento, com o auxílio da pipeta. Depois, foi encaminhada novamente para a centrifuga, por mais 5 minutos na velocidade de 1500

rpm. O processo de lavagem foi repetido por 2 vezes. Após a lavagem, o pellet resultante foi ressuspensionado com 4 ml de solução de NaCl.

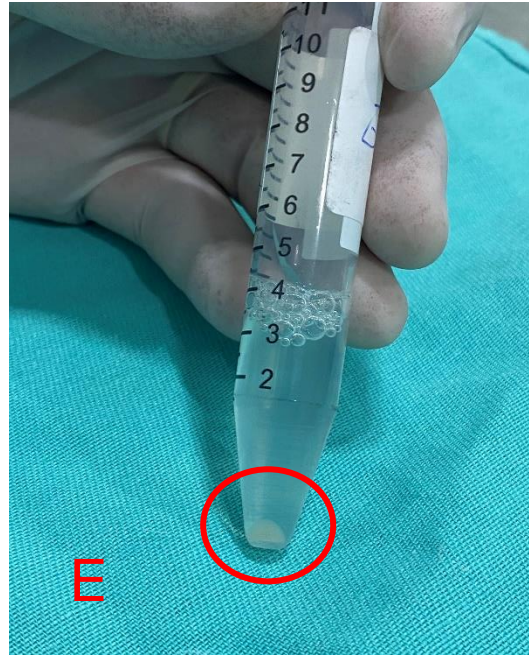
Antes do procedimento, o paciente foi preparado para receber a sedação e anestesia. Foi introduzido um cateter intravenoso 0,9x25mm (22G), na veia cefálica, para poder receber os fármacos. Em seguida foi realizada a tricotomia na região do úmero proximal do membro direito e esquerdo, local escolhido para introdução das células-tronco. Para sedação e anestesia do paciente, foi administrado acepromazina 2%, na dose de 0,31 ml, IV. Depois foi administrado propofol, na dose de 3,1 ml, IV, de forma lenta. No local de aplicação foi realizado antissepsia com clorexidina e álcool.

Para a aplicação, primeiro foi realizado o acesso ao canal medular, com o auxílio da seringa e agulhas 18G. Em seguida, foi administrado 2ml das CTMs, com o auxílio da seringa e agulha 18G, na região do úmero proximal de cada membro (FIGURA 11).

Figura 11 – Ordem da esquerda para direita: (A) células-tronco após o descongelamento; (B) processo de centrifugação; (C) procedimento de lavagem das células; (D) presença do pellet após lavagem, para serem aplicadas; (E) Acesso do canal medular; (F) aplicação das células-troncos na região de úmero proximal do membro direito e esquerdo.







Fonte: Fotos do autor

E após 15 dias foi repetido o hemograma para avaliar se houve alguma evolução no quadro do paciente, e o resultado do exame foram: presença de anemia normocítica e hipocromica - anemia regenerativa, leucopenia por eosinopenia, linfopenia e hemoglobina baixa (Quadro 4).



Quadro 4 - Hemograma (3), realizado dia 14 de abril de 2021, para avaliar se houve melhora no quadro do paciente após a aplicação da primeira sessão de terapia com células-tronco.

EXAME	RESULTADOS	VALORES DE REFERENCIA
Eritrócito	5.39	5.50 – 8.50
HCT	33.0	37.0 – 55.0
HGB	7,8	12.0 – 18.0
MVC	60.2	60.0 – 77.0
MCH	13.8	18.5 – 30.0
MCHC	---	30.0 – 37.5
Reticulócitos	102.7	10.0 – 110.0
Leucócitos	2.87	5.50 – 16.90
Neutrófilos	2.02	2.00 – 12.0
Linfócitos	0.41	0.50 – 4.90
Monócitos	0.39	0.30 – 2.00
Eosinófilos	0.02	0.10 – 1.49
Basófilos	0.03	0.00 – 0.10
Plaquetas	298	175 – 500

Fonte: Dados obtidos na Animais Centro Veterinário

No dia 23/04/21 foi realizado a segunda aplicação das células-tronco. O paciente não apresentou nenhuma melhora significativa no seu quadro clínico, então foi solicitado novo mielograma, que foi realizado no dia 08/05/21, e os resultados estão representados no quadro 5. Diante os resultados apresentados no segundo mielograma, foi decidido acrescentar no tratamento o uso da eritropoetina. Na primeira parte do tratamento foi aplicado no paciente duas doses de eritropoetina, com intervalos de três dias cada. A aplicação foi feita de forma subcutânea, na dosagem de 150 UI/kg.

Quadro 5 - Mielograma (3), realizado dia 08/05/2021, para avaliar se houve alguma alteração nas células da medula óssea após a segunda aplicação da terapia com células-tronco.

Células	Resultados	Valores de Ref.
Série Mielóide	<b>190</b>	
• Neutrófilo metamielócito	2.5%	5.3 – 8.8

• Neutrófilo bastonete	4.9%	12.7 – 17.2
• Neutrófilos	17.5%	13.8 – 24.2
• Eosinófilo mielócito	-	0
• Eosinófilo metamielócito	0.2%	2.4
• Eosinófilos	0.5%	0.3
<b>Série Eritóide</b>	<b>318</b>	
• Rubriblastos	44.7%	0.2 – 1.1
• Proubricitos	6.7%	0.9 – 3.9
• Metarrubricitos	0.2%	9.2 – 16.4
<b>Outras Células</b>	<b>87</b>	
• Linfócitos	7.6%	0.2 – 4.9
• Plasmócitos	0.3%	0 – 0.2
• Monócitos	6.7%	0 – 2
• Megacariócitos	0.0%	2 – 7
RM:E	0.6%	0.75 – 2.53:1
Displasia nuclear	<6%	
Atipias celulares	Moderada	

Fonte: Dados obtidos na Animais Centro Veterinário

No dia 14/05/21 foi realizado a terceira e última aplicação da terapia de células-tronco no paciente. E depois de dois dias, foi repetido o mesmo protocolo de eritropoetina anterior. No dia 28/05/2021 foi realizado o hemograma (quadro 6) e os resultados foram bastantes satisfatórios, pois o paciente obteve um aumento na produção de todas as células sanguíneas, estando todas dentro dos valores de referência. E apresentou um aumento nos reticulócitos, que são as células jovens na medula óssea. Depois disso, o paciente retornou mais dois meses consecutivos para repetir o hemograma, e os resultados estão representados no quadro 7.

Quadro 6 - Hemograma (4), realizado no dia 28/05/2021, representando a evolução do tratamento após a terapia com células-tronco.

EXAME	RESULTADOS	VALORES DE REFERENCIA
Eritrócito	7.18	5.50 – 8.50
HCT	46.8	37.0 – 55.0
HGB	14.7	12.0 – 18.0
MVC	65.1	60.0 – 77.0
MCH	20.5	18.5 – 30.0
MCHC	31,5	30.0 – 37.5
Reticulócitos	308.2	10.0 – 110.0
Leucócitos	8.11	5.50 – 16.90
Neutrófilos	4.87	2.00 – 12.0
Linfócitos	1.87	0.50 – 4.90
Monocitos	0.86	0.30 – 2.00
Eosinófilos	0.44	0.10 – 1.49
Basófilos	0.07	0.00 – 0.10
Plaquetas	342	175 – 500

Fonte: Dados obtidos na Animais Centro Veterinário

Quadro 7 - Hemograma (5), realizados no mês 06 e 07 de 2021, para acompanhamento do paciente após o tratamento com células tronco.

CÉLULAS	RES. MÊS 06/21	RES. MÊS 07/21	VALORES D/E REF.
Eritrócito	8.30	6.55	5.50 – 8.50
HCT	50.8	39.8	37.0 – 55.0
HGB	16.9	14.2	12.0 – 18.0
MVC	61.2	60.8	60.0 – 77.0
MCH	20.4	21.7	18.5 – 30.0
MCHC	33.3	35.7	30.0 – 37.5
Reticulócitos	73.0	228.6	10.0 – 110.0
Leucócitos	7.85	15,18	5.50 – 16.90
Neutrófilos	3.48	8.70	2.00 – 12.0
Linfócitos	3.75	4.78	0.50 – 4.90

Monocitos	0.47	1.13	0.30 – 2.00
Eosinófilos	0.09	0.55	0.10 – 1.49
Basófilos	0.06	0.02	0.00 – 0.10
Plaquetas	429	515	175 – 500

Fonte: Dados obtidos na Animais Centro Veterinário

### 3.1 DISCUSSÃO

A LVC é uma doença de caráter crônico, que causa várias alterações clínicas e hematológicas, sendo que alguns dessas alterações estão relacionadas as disfunções que a doença causa na medula óssea, podendo ser de origem aplásicas. Porém, pouco se sabe sobre as alterações medulares, pois a avaliação da celularidade da medula óssea é algo ainda pouco pesquisado (NICOLATO, 2014). O diagnóstico de hipoplasia medular foi baseado na avaliação clínica e nos resultados dos exames laboratoriais do hemograma e mielograma. E de acordo com estes achados, ficou evidente que a medula óssea apresentava uma disfunção. Diante desse quadro, o tratamento proposto foi o uso da terapia de células-tronco associado a eritropoietina.

O diagnóstico da LVC surgiu após avaliação clínica e exames realizado no dia 26/09/2019, onde os resultados do hemograma (1) apresentaram que o paciente estava com uma anemia leve, normocítica e normocrômica, de caráter arregenerativa; presença de leucopenia, confirmando o início de um processo infeccioso; e um aumento na quantidade de reticulócitos, o que representa que a medula óssea estava aumentando a sua produção para realizar a compensação. Na LVC é comum o animal apresentar quadros de anemia normocítica e leucopenia (SILVA; et.al, 2011).

A anemia pode ocorrer devido a eritropoiese diminuída em casos crônicos da doença, lise de hemácias, perda de sangue, diminuição dos eritrócitos devido ao sequestro esplênico, insuficiência renal e aplasia medular (MEDEIROS; et. al, 2008). Casos de anemia por processos inflamatórios, que são comuns em doenças crônicas, os mediadores inflamatórios agem inibindo a eritropoiese, devido as alterações provocadas na eritropoietina, estando associado a causa de hipoplasias (HONSE, 2014). A leucopenia pode acontecer devido a uma disfunção medular e hematopoiese

diminuída, que ocorre devido a ação parasitária na medula óssea e por causa do recrutamento dos leucócitos para vários órgãos (LACERDA; et.al, 2017).

No hemograma (2), o paciente apresentou uma anemia microcítica e normocrômica, de caráter regenerativa. O que também foi observado em um estudo citado por Honse (2014), que segundo o autor, ela ocorre devido a deficiência de ferro, doenças crônicas e anemias de doenças inflamatórias.

No primeiro momento da doença, o paciente apresentou-se assintomático, e os níveis de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina estavam melhores que quando ele começou a apresentar os sinais clínicos (Quadro 8). Isso ocorre devido a um intenso parasitismo no local, o que leva a um quadro de disfunção da medula óssea, provocando uma diminuição da eritropoiese (REIS; et.al, 2006).

Quadro 8 - Representação dos resultados obtidos nos hemogramas, comparando a quantidade de células eritrocitárias, hematócrito e hemoglobina, nas fases assintomáticas e sintomáticas do paciente.

Células	Res. Tabela 01 Assintomático	Res. Tabela 02 Assintomático	Res. Tabela 04 Sintomático
Eritrócito M/ $\mu$ L	5.10	6.46	5.39
HCT %	33.1	35.8	33.0
HGB g/dl	10.9	12.5	7,8

Fonte: Dados obtidos na Animais Centro Veterinário

A presença de reticulócitose foram observadas em todos os exames de hemogramas realizados, o que seria uma característica das anemias regenerativas. No entanto, de acordo com Stockham e Scott (2011), o percentual alto de reticulócitos nem sempre está de acordo com uma reticulocitose verdadeira, pois em alguns casos o aumento dos reticulócitos pode estar relacionado com a diminuição eritrocitária, e não uma resposta da medula óssea propriamente dita.

Os achados clínicos que o paciente apresentou são bem característicos na LVC. A linfadenomegalia ocorre devido ao aumento da atividade dos linfócitos B, que favorecem a presença de infiltrado plasmocitário, induzindo o aumento dessas células (JORGE; et.al, 2020). A presença de mucosas hipocoradas, os sinais de apatia,

fraqueza e intolerância aos exercícios estão relacionadas ao quadro de anemia. E as lesões dermatológicas podem desenvolver devido a deposição de complexos imunes, ou pela redução das fibras de colágeno, devido a ação do parasita (HONSE, 2014).

Em relação ao mielograma, os resultados da série eritróide foram compatíveis com os hemogramas 1, 2 e 3. No mielograma 1 o paciente apresentou uma anemia normocítica e normocrômica, de caráter não-regenerativo. Sendo um tipo de anemia muito frequente, porém o prognóstico não é favorável (MEDEIROS; et. al, 2008). É comum esse tipo de anemia estar presente nos estágios iniciais de doenças que provocam anemias, mas a persistência desse quadro pode levar a uma anemia não responsiva (SILVA, 2015). Esse processo de não regeneração ocorre devido a ação do parasita na medula óssea, que compromete a produção eritrocitária devido a infiltração que promove nos macrófagos, plasmócitos e linfócitos (COSTA – VAL; et.al, 2007). Animais que apresentam anemias não regenerativas podem apresentar lesões reversíveis e irreversíveis, sendo que o tipo de lesão será determinado pelo comportamento proliferativo ou pelo controle das células-tronco na hematopoiese (GATTI; et.al, 2014).

Na avaliação da série mielóide, o paciente apresentou um aumento nessas células nos dois mielogramas realizados. O que não é considerado um acontecimento comum quando se trata de uma doença de caráter crônico, segundo os estudos realizados por Trópia de Abreu, et.al (2011). Todavia, o mesmo autor acredita que o aumento dessa linhagem de células, podem estar relacionadas com a resposta inflamatória que ocorre nos órgãos afetados. Quinnell et. al (2001), afirma que o aumento dessas células da série mieloide ocorre devido a alta produção de citocinas, que no caso da LVC está relacionada com a expressão de IFN- $\gamma$ .

Quanto aos linfócitos, o paciente apresentou linfocitose nos dois mielogramas realizados. No hemograma (3) o paciente apresentou linfopenia (sangue circulante), quando apresentou sinais clínicos da doença, o que demonstra ser uma alteração comum em cães com LVC, segundo o estudo de Nicolato (2014). De acordo com este autor, é um processo comum que acontece devido a preferência que essas células tem em migrar para os órgãos linfoides infectados na intenção de estabelecerem uma resposta inflamatória contra a LVC. Portanto a linfocitose na medula óssea seria uma resposta compensatória com a finalidade de oferecer linfócitos para os outros órgãos

afetados pelo parasita e por isso, ocorre a diminuição dos níveis de linfócito no sangue.

Os níveis de plasmócitos também apresentaram alterados nos dois mielogramas realizados. Isso é decorrente da intensa estimulação antigênica que acontece devido a infecção causada pelo parasita. E o aumento dessas células estão relacionadas a cronicidade da infecção (HONSE, 2014).

A monocitose também esteve presente nos dois mielogramas realizados. Estando relacionada a resposta imune adquirida em relação aos microrganismos. Os linfócitos T CD4 e CD8 produzem citocinas responsáveis por ativar os macrófagos, sendo estes responsáveis pela fagocitose dos parasitas em sua forma amastigotas (HONSE, 2014).

Em relação aos megacariócitos, o paciente apresentou uma baixa porcentagem de produção no mielograma (2). Seguido da ausência dessas células no mielograma (3). Portanto, os níveis de plaquetas apresentaram dentro dos valores de referência no em todos hemogramas. Esses níveis dentro dos padrões normais, podem estar relacionados a presença de células ainda circulantes na periferia, pois no mielograma (2), a medula óssea ainda apresentava uma produção. Porém, segundo Honse (2014), a hipoplasia ou aplasia dos megacariócitos, podem estar relacionadas a uma hipoplasia das suas precursoras.

A relação M:E no mielograma (2) apresentou dentro dos valores de referência, porém os níveis estavam bem próximos do limite mínimo. No mielograma (3) a relação M:E apresentou diminuída, resultando numa hipoplasia mieloide e hiperplasia eritróide. A relação M:E diminuída representa um aumento da celularidade hematopoiética, que nesse caso foi na série eritróide, com o objetivo de suprir as necessidades periféricas das células que estão sendo destruídas devido ao quadro de anemia (STOCKHAM; SCOTT, 2011)

Com relação ao tratamento, a terapia com células-tronco foi proposta após a avaliação clínica e análise dos exames realizados, ficando comprovado que o paciente apresentava hipoplasia medular. Logo na primeira aplicação o paciente apresentou uma mudança em relação ao seu quadro de anemia, passando de uma anemia normocítica normocromica – arregenerativa (mielograma 1), para uma anemia normocítica hipocromica – regenerativa (hemograma 3). De acordo com Sousa

(2016), isso ocorre quando a medula óssea inicia uma resposta. Esse fator está relacionado, com a capacidade que o transplante de células-tronco tem em restaurar a medula óssea, de se diferenciar em células progenitoras e de promoverem a imunomodulação (CAPLAN; DENNIS, 2006).

O uso da eritropoietina, foi associado ao tratamento como um complemento, com a finalidade de potencializar os resultados. Sua função é estimular a eritropoiese e diminuir os efeitos da anemia. Taner (2016), relata que o uso da eritropoietina deve ser realizado em pacientes que apresentam o hematócrito abaixo de 20%; o que não era o caso desse paciente, pois seu hematócrito estava sempre acima de 30%. Porém, o mesmo autor, relata que o uso da eritropoietina também pode ser realizado em animais que apresentam sinais clínicos ligados a quadros de anemia, como: letargia, perda de apetite, apatia e intolerância aos exercícios. A eritropoietina vai atuar na medula óssea aumentando a estimulação e a proliferação das células-tronco nos eritrócitos, mais especificamente nos eritroblastos.

Ao final do tratamento, o paciente apresentou resultados muito satisfatórios, pois os exames de acompanhamento realizados nos meses seguintes, mostraram um aumento de todas as células sanguíneas, mantendo-se dentro dos valores de referência (Quadro 9), representando uma total restauração da medula óssea.

Quadro 9 – Resultados comparativo dos exames de hemograma, realizado no período inicial e final do tratamento, comprovando a eficácia do tratamento de células-tronco na hipoplasia medular.

CÉLULAS	Mês 04/21	MÊS 05/21	MÊS 06/21	MÊS 07/21	VAL. DE REF.
Eritrócito	5.39	7.18	8.30	6.55	5.50 – 8.50
HCT	33.0	46.8	50.8	39.8	37.0 – 55.0
HGB	7,8	14.7	16.9	14.2	12.0 – 18.0
MVC	60.2	65.1	61.2	60.8	60.0 – 77.0
MCH	13.8	20.5	20.4	21.7	18.5 – 30.0
MCHC	---	31,5	33.3	35.7	30.0 – 37.5
Reticulócitos	102.7	308.2	73.0	228.6	10.0 –110.0
Leucócitos	2.87	8.11	7.85	15,18	5.50 –16.90
Neutrófilos	2.02	4.87	3.48	8.70	2.00 – 12.0
Linfócitos	0.41	1.87	3.75	4.78	0.50 – 4.90



Monocitos	0.39	0.86	0.47	1.13	0.30 – 2.00
Eosinófilos	0.02	0.44	0.09	0.55	0.10 – 1.49
Basófilos	0.03	0.07	0.06	0.02	0.00 – 0.10
Plaquetas	298	342	429	515	175 – 500

Fonte: Dados obtidos na ficha do paciente.

Fazendo uma análise comparativa com outros estudos, foi possível observar que a terapia com células-troncos também respondeu de forma positiva em diferentes casos de disfunções medulares. Santos, Winck e Braga (2017), utilizaram a terapia de células-tronco em felinos com aplasia medular causado pela DRC, e observaram um aumento significativo do hematócrito e os animais ao final do tratamento se mantiveram estáveis e dentro dos valores de referência.

Amorim (2020), realizou um estudo em 6 cães com hipoplasia medular e concluiu que todos os animais apresentaram uma recuperação da medula óssea e um aumento na produção das células do sangue circulante.

Gatti, et.al (2014), realizou o tratamento em um cão com hipoplasia eritróide e os exames demonstraram uma resposta medular com aumento da porcentagem do hematócrito por longos períodos.

#### **4. CONCLUSÃO**

A terapia com células-tronco é uma revolução da medicina humana e cada vez vem ganhando mais espaço na medicina veterinária. A capacidade que essas células têm em se regenerar e se diferenciar em outras células, trazem uma expectativa de cura para muitas doenças graves. O relato de caso apresentado, mostrou uma resposta muito eficiente no uso das células-tronco no tratamento de hipoplasia medular, o que também foi observado em outros estudos, em diferentes casos de disfunções medulares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, T. D. R. de. **Correlação entre a resposta imunológica e as manifestações clínicas na Leishmaniose Visceral Canina.** / Talyta Delfino Rolim de Albuquerque. – Natal, RN, 2013. 65 f.: il.

ALMEIDA, V. dos A. **Alterações na medula óssea e distúrbios hematológicos na leishmaniose visceral canina.** 101 f.il. Tese (Doutorado em Patologia) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ALONSO, F. H. de. **Estudo das anemias em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade de Brasília.** / Flávio Herberg de Alonso; orientação de Giane Regina Paludo. – Brasília, 2012. 42 p. : il.

AMORIM, V. M.; DA CRUZ JÚNIOR, Carlos Alberto. **Terapia celular com células-tronco mesenquimais em animais com hipoplasia de medula óssea.** Programa de Iniciação Científica-PIC/UniCEUB-Relatórios de Pesquisa, 2019.

ANDREONI, L. B; MIRANDA, L.M. **Levantamento de mielogramas com ênfase em pacientes portadores de leishmaniose visceral canina.** Revista PUBVET v.14, n.8, a640, p.1-10, ago., 2020. Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/6872/levantamento-de-mielogramas-com-ecirncfase-em-pacientes-portadores-de-leishmaniose-visceral-canina>. Acessado em: 05 de nov. de 2021.

BAETA, J. S. V. **Influência de suplementação de ferro e vitaminas hematopoiéticas (vitamina B12 e ácido fólico) no tempo de recuperação do hematócrito em cães após doação de sangue** / Juliana Santana Valente Baeta. - Viçosa. MG, 2015. vii, 30f. : il. (algumas color) ; 29cm.

BARBOSA, R., COSTA, I. C. C. **Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.** Scientia Medica, v. 23, n. 1, p. 5-11, 2013.

BARROS, R.M. **Caracterização histopatológica da leishmaniose visceral canina no distrito federal.** / Rafaela Magalhães Barros orientação de Márcio Botelho de Castro – Brasília, 2011. 102 p.: il.

BLACK L.L., et. al. **Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs.** *Veterinary Therapeutics* 9, 192–200, 2008.

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

CAPLAN, A.I.; DENNIS, J. E. **Mesenchymal stem cells as trophic mediators.** *Journal of Cellular Biochemistry* 98:1076-1084, 2006.

CARVALHO, F.L.N. et al. **Canine visceral leishmaniasis diagnosis a comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs.** *Epidemiology & Infection.* Pub. 2018; 146(5): 571–576. Disponível em: S0950268818000225jra 571..576 (cambridge.org). Acessado em: 10 de outubro de 2021.

Costa-Val, A. P; et al. **Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity.** *Vet J.* 2007; 174(3):636-643.

FARIA, C. D. de O. **Avaliação do uso de células-tronco mesenquimais nos lipídeos epidérmicos e na resposta inflamatória da dermatite atópica canina pela técnica de imunoistoquímica** / Camila Domingues de Oliveira Faria. – Botucatu, 2019.

FARIA, A.R. e ANDRADE, H.M. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática.** *Rev. Pan-Amaz Saúde* 2012; 3(2): 47-57. Disponível em: <http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v3n2/v3n2a07.pdf> Acesso em: 10 de outubro de 2021.

FREITAS, M. R. V. de. **Análise macroscópica de fígado e baço de cães acometidos por leishmaniose visceral** / Maria Railma Vieira de Freitas. – 2011. 30f.

FREITAS, Lilian Coutinho. **Canine leishmaniasis: report of case**. 2019. 72 fls. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas. Advisor: Prof. Dr. Wendell Marcelo de Souza Perinotto.

GATTI A, MARTINS DS, CARVALHO CKCM, SANTOS EJC. Medvep - Revista Científica de Medicina Veterinária - **Pequenos Animais e Animais de Estimação**; 2014; 12(41); 1-637.

GRAMICCIA, M. **Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis**. *Veterinary Parasitology*, 181(1), 23–30, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570192> Acesso em: 17 de setembro de 2021.

GREENE, C. E.; **Doenças Infeciosas em Cães e Gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

GIRARDI, A. **Avaliação da medula óssea em cães pancitopênicos de uma população hospitalar da região Centro Oeste do Brasil: Avaliação de medula óssea em cães pancitopênicos** / Angela Girardi. – 2014. 63 f.: il. color. ; 30 cm.

GONZÁLEZ, F. H. D. **Patologia clínica veterinária: texto introdutório** / Félix H. Diaz González, Sérgio Ceroni da Silva (editores). – Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 342 p.

HONG, S. J.; TRAKTUEV, D. O.; MARCH, K. L. **Therapeutic potential of adipose-derived stem cells in vascular growth and tissue repair**. *Current Opinion Organ Transplant*, v. 15, p. 86-91, 2010.

HONSE, C. O. **Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil hematológico de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi**. Rio de Janeiro; 2014. 81f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

JERICÓ, M.M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos** / Márcia Marques Jericó, Márcia Mery Kogika, João Pedro de Andrade Neto. – 1. ed. – Rio de Janeiro: Roca, 2015. II.

JORGE, S. M; et.al. **Abordagem clínica e laboratorial de um cão com hipoplasia eritróide e hiperplasia granulócítica associado à leishmaniose visceral.** *Ciência Animal*, v.30, n.2, p.130-137, 2020.

LACERDA, M. S. de. **Perfil hematológico de cães (*Canis lupus familiaris*) soropositivos para leishmania spp atendidos no hospital veterinário de Uberaba – MG.** *Nucleus Animalium*, v.9, n.1, 2017.

LAURENTI, M.D. **Patologia e patogenia das leishmanioses. [Pathology and pathogenesis of leishmaniasis].** 2010. 84 f. Tese (Livre-Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LOPES, S. T. dos A. **Manual de patologia clínica veterinária /** Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Alexander Welker Biondo, Andrea Pires dos Santos ; colaboradores Mauren Picada Emanuelli ... [et.al.]. – 3. ed. – Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107 p. : il.

MARTINS GS, CORREIA FGM, SILVA FF, SOUSA LL, SILVA HN, JÚNIOR PMR, BITENCOURT EL (2020) **Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral no tocantins de 2009 a 2018.** *Revista de Patologia do Tocantins*, 10(4):. 2020; 7(3).

MEDEIROS, C. M. O. et al. **Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de fortaleza, Ceará.** *Ciência Animal*, v. 18, n. 1, p.43-50, 2008.

MIRANDA, D.F.H. **Alteração na medula óssea de cães com leishmaniose visceral: um estudo clínico-patológico /** Dayane Francisca Higino Miranda – 2018. 122 f.: il.

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

MOMO, C. et al. **Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis.** *Veterinary Medicine International*, v. 2014, p. 1-5, 2014.

MÜLLER, D. C. de M; et.al. **Técnicas de sítios de coleta de medula óssea em cães e gatos.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 39, n.7, p.2243-2251, out, 2009.

NICOLATO, R. L. de C. **Estudo da maturação e das alterações eritrocitárias e leucocitárias em cães naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*** [manuscrito] Roney Luiz de Carvalho Nicolato. – 2014. 64 f.: il. color.. graf.; tabs.

ORKIN, S. H.; ZON, L. I. **Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology**. Cell, v. 132, n. 4, p. 631–644, 2008.

PINHO, F. A. de. **Patogênese da pancitopenia na leishmaniose visceral canina e murina** / Flaviane Alves de Pinho. – São Paulo, 2014.

QUEIROZ, N. M. G. P. **Diagnóstico da leishmaniose visceral canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a Rifi e Elisa-teste** / Nina Marí Gual Pimenta de Queiroz. – Araçatuba: [s.n.], 2009. 125 f. : il.

QUIMBY J.M., et. al. **Assessment of intravenous adipose-derived allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of feline chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled clinical trial in eight cats**. J Feline Med Surg. 18(2):165-71, 2016;.

QUINNELL R. J; et al. **Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis**. The Journal of Infectious Diseases. 2011.183, 1421–1424.

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

SANTANA, Paulo Ricardo Medeiros, Federal University of Paraíba, June 2016. **Use of autological tronco cells of adiposous tissue in dog with aplasia medular**. Advisor: Ricardo Romão Guerra.

SANTOS, J. P. A. dos. **Terapia celular em gatos portadores da doença renal crônica: avaliação laboratorial e imagiológica** / Juliana Passos Alves dos Santos. – 2012. 102 f. : il.

SANTOS, E. J. C. **Análise da Aplicação Terapêutica das Células Tronco na Medicina Veterinária**. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 02, Vol. 01. pp 269-295, Abril de 2017. ISSN:2448-0959. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/veterinaria/medicina-veterinaria>. Acessado em: 10 de Nov. de 2021.

SANTOS, E. J. C; WINCK, C. P; BRAGA, C. L. **Estudo eficácia e segurança terapêutica das células-tronco mesenquimais alogênicas no tratamento de**

**felinos acometidos pela doença renal crônica e resistentes a eritropoetina sintética.** Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 02, Vol. 01. pp 296-309, Abril de 2017. ISSN 2448-0959

SARUGASER R., et. al. **Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors.** Stem Cells, 23(2):220-9, 2005.

SAÚDE, M. **Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde Ministério da Saúde Número Especial | Mar. 2021.**

SILVA, M. V. M; NOGUEIRA, J. L. **Terapia celular: revisão de literatura.** REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA. Ano VIII – Número 15 – Julho de 2010 – Periódicos Semestral – ISSN: 1679-7353.

SILVA, A. D. F. S.; LIMA, M. C. J. S; SOTO-BLANCO, B. **Perfil hematológico e eletroforético de proteínas séricas em cães soropositivos para leishmaniose visceral no Estado do Rio Grande do Norte.** Acta Veterinaria Brasilica, v. 5, n. 3, p. 300-305, 2011.

SILVA, R. B. **Doenças associadas à anemia em cães do município de Santa Cruz do Rio Pardo – SP /** Renan Buzolim Silva – Ourinhos, SP: FIO, 2015. 50f., 30cm

STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária** 2ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2011.

TALLONE T., et. al. **Adult human adipose tissue contains several types of multipotent cells.** J Cardiovasc Transl Research, 4(2):200-10, 2011.

TANER, G; LUNARDON, T; FAM, A. L. D. **Uso da eritropoetina recombinante humana no tratamento de anemia não regenerativa em cão sem doença renal crônica - relato de caso.** 107 Revista Eletrônica Bociências, Biotecnologia e Saúde, Curitiba, n. 15, maio-ago. 2016.

TORRECILHA, R.B.P. et al. **Correlações entre carga parasitária periférica e alterações clínicas e laboratoriais comuns em cães com leishmaniose visceral.** Preventive Veterinary Medicine. Vol. 132, Pub. Set. 2016, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Disponível em: [www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587716302847](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587716302847) Acesso em: 10 de outubro de 2021.



Trópia, de A. R; et al. **Influence of clinical status and parasite load on erythropoiesis and leucopoiesis in dogs naturally infected with Leishmania (Leishmania) chagasi.** Plos One 2011; 6(5):e18873.

VEIGA, C. S. C. da. **Leishmaniose visceral: o papel do médico veterinário da educação nas escolas ao diagnóstico especializado** / Cíntia Silva Corrêa da Veiga. – Vassouras: 2020. Vii, 26 f. : il. ; 29,7 cm.

VIDAL M.A., Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM. **Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells.** Veterinary Surgery 36, 613–22, 2007.

VISCONDI, E. de S; et.al. **Células-tronco em pequenos animais.** ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, N.16; p. 2013 635.

TRZIL J.E., et. al. **Intravenous adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for the treatment of feline asthma: a pilot study.** J Feline Med Surg. 17 de setembro de 2015.