

ABORDAGEM CLÍNICA E LABORATORIAL DE UM CÃO COM HIPOPLASIA ERITRÓIDE E HIPERPLASIA GRANULÓCITICA ASSOCIADO À LEISHMANIOSE VISCERAL

(Clinical and laboratory approach of a dog with erythroid hypoplasia and granulocytic hyperplasia associated with visceral leishmaniasis)

Samuel Monteiro JORGE*¹; Thayz Paolla Ferreira ROMANO²; Márcio Eduardo de Melo BENVENUTTI¹; Gilzane Dantas NÓBREGA¹; Gabriela Noronha TOLEDO²; Antônio Fernando de Melo VAZ¹

¹Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Av. Universitária, s/n, Santa Cecília, Patos, PB; ²Clínica Médica de Pequenos Animais (UFCG). *E-mail: samuelm.jorge@gmail.com

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma enfermidade comum que acomete múltiplos sistemas e apresenta tempo de evolução crônico. Dentre as características laboratoriais que são observadas, os achados na medula óssea podem variar de hipoplasia a hiperplasia, tanto eritróide quanto granulocítica. Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo realizar uma análise clínica e laboratorial dos achados em um cão com hipoplasia eritróide e hiperplasia granulocítica associada à LV. Um cão da raça Setter Irlandês, macho, com 7 anos de idade foi atendido no Hospital Veterinária Ivon Macêdo Tabosa da Universidade Federal de Campina Grande (HVIMT / UFCG) apresentando epistaxe, perda de peso e hiporexia. Foi solicitado hemograma completo, análise de bioquímica sérica, urinalise e mielograma com pesquisa de hemoparasitas. No hemograma foi evidenciado anemia normocítica normocrômica e diminuição da quantidade de plaquetas com presença de agregados plaquetários. A bioquímica sérica revelou hipoalbuminemia e hiperproteinemia. Na urinalise não foi evidenciada alterações com relevância clínica. Foi observada amastigotas de *Leishmaniasp* no mielograma, e hipoplasia eritróide e hiperplasia granulocítica. O animal foi tratado com associação de milteforan, alopurinol e domperidona, contudo o tutor não retornou para reavaliação do paciente. Diante do exposto, uma abordagem clínica laboratorial de um paciente com LV é importante para um tratamento mais adequado e melhorar o prognóstico. Mais estudos devem ser realizados para a melhor compreensão das respostas hematopatológicas frente a essa enfermidade.

Palavras chaves: Hematopatologia, doenças infecciosas, clínica médica veterinária.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a common disease that affects multiple systems and has a chronic evolution time. Among the laboratory characteristics that may occur, bone marrow changes may range from hypoplasia to both erythroid and granulocytic hyperplasia. Therefore, the present study aims to perform a clinical and laboratory analysis of the findings in a dog with erythroid hypoplasia and granulocytic hyperplasia associated with VL. A 7 - years-old male Irish Setter dog was attended at the Ivon Macêdo Tabosa Veterinary Hospital of the Federal University of Campina Grande (HVIMT / UFCG) presenting epistaxy, weight loss and hyporexia. Complete blood count, serum biochemistry analysis, urinalysis, and a

myelogram with hemoparasites were requested. The complete blood count showed normochromic normocytic anemia and a decrease in the number of platelets with platelet aggregates. Serum biochemistry revealed hypoalbuminemia and hyperproteinemia. Urinalysis showed no clinically relevant changes. Leishmaniasis amastigotes were observed in the myelogram along with erythroid hypoplasia and granulocytic hyperplasia. The animal was treated with the combination of milteforan, allopurinol and domperidone, however the tutor did not return for the patient's reassessment. In the light of the above, a clinical laboratory approach of a patient with VL is important for a better treatment and to improve the prognosis. Further studies should be performed to better understand the hematopathological responses to this disease.

Key words: Hematopathology, infectious diseases, veterinary medical clinic.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença zoonótica com desenvolvimento crônico e características multissistêmicas (GODOY *et al.*, 2016). Essa enfermidade é causada por um protozoário difásico do gênero *Leishmania* que necessita de um vetor biológico, o mosquito-palha do gênero *Phlebotomus*, para se desenvolver (GREENE, 2016).

A infecção do flebotomíneo ocorre quando as fêmeas ingerem as amastigotas livres ou dentro dos macrófagos ao realizarem o repastado sanguíneo em animais infectados. No intestino do artrópode, as amastigotas irão passar por uma série de alterações morfológicas que culmina na forma promastigota. Por fim, ao realizar novamente o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, as promastigotas são lançadas na corrente sanguínea e se transformam em amastigotas recomeçando o ciclo (JERICO *et al.*, 2015).

Os sinais clínicos ocorrem devido à resposta imunológica frente ao protozoário (GREENE, 2016). Os animais infectados podem estar subclínicos ou apresentar onicogribose, alopecia facial, perda de peso, linfadenomegalia, e entre outros sinais clínicos (ETTINGER *et al.*, 2017). O tratamento é feito com associação de miltefusina e alopurinol, contudo a cura parasitológica é rara (JERICO *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2019).

A leishmaniose visceral é uma doença com distribuição mundial, e no Brasil a região nordeste apresenta a maior prevalência (VIOL *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2016). O diagnóstico pode ser feito através de métodos como ELISA, PCR e a pesquisa do parasita através da citologia de órgãos linfóides (RIBEIRO *et al.*, 2019). Os achados laboratoriais geralmente são hiperproteinemia com hiperglobulinemia, alterações em enzimas hepáticas, azotemia, anemia não regenerativa, leucopenia ou leucocitose (GREENE, 2016). As alterações na medula óssea variam quanto à fase da infecção, podendo apresentar hiperplasia granulocítica, hipoplasia ou aplasia eritróide e dentre outros (MOMO *et al.*, 2014).

Diante disso, o presente trabalho tem como objetivo relatar um caso de um cão apresentando hipoplasia eritróide e hiperplasia granulocítica associado à leishmaniose visceral.

MATERIAIS E MÉTODOS

Um cão da raça Setter Irlandês, macho, com 7 anos de idade foi atendido no Hospital Veterinário Universitário Ivon Macêdo Tabosa da Universidade Federal de

Campina Grande (HVUIMT / UFCG) apresentando tosse, dispnéia, epistaxe e onicogribose. Além disso, segundo o tutor, o animal apresentava normodipsia e normorexia, contudo estava com perda de peso progressiva.

Após a realização da anamnese e exame físico, foi solicitada a coleta de medula óssea para a realização do mielograma e pesquisa de parasitas, hemograma completo, e dosagens de análises bioquímicas séricas (albumina, alanina aminotransferase, creatinina, fosfatase alcalina, fósforo, proteína total e uréia) e urinálise.

A coleta de medula foi realizada através de uma agulha 18 G acoplada a uma seringa de 10,0 mL com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA – 10% p/v) como anticoagulante. O animal foi posicionado em decúbito dorsal e a agulha fora inserida no manúbrio esternal com posterior realização de pressão negativa. A amostra foi encaminhada para o Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande (LPCV / UFCG). Foram confeccionados 04 esfregaços realizando squash que depois foram corados com panótico rápido. As lâminas foram analisadas utilizando microscopia ótica.

Para a realização do hemograma e dosagem de análises bioquímicas séricas o sangue foi coletado por venopunção jugular com uma agulha 22 G acoplada a uma seringa de 3,0 mL e o volume foi distribuído em um tubo contendo EDTA e outro sem EDTA. Para a análise do sangue com anticoagulante, a amostra foi submetida ao analisador hematológico veterinário (PocH – 100iV Diff). Em seguida, uma lâmina de esfregaço sanguínea que foi submetida à coloração com panótico rápido e analisada em microscopia ótica. Além disso, foi realizada a contagem de reticulócitos utilizando o sangue contendo EDTA. Uma alíquota da amostra foi misturada com 3 partes de azul cresil brilhante e encubado em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Por fim, os reticulócitos foram contados utilizando a objetiva de maior aumento na microscopia ótica. A amostra sem anticoagulante foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi separado e o sedimento descartado. A análise do soro foi realizada utilizando o aparelho bioquímico automático (Cobas C111-Roche) através de métodos cinético colorimétrico.

A coleta da urina foi realizada por sondagem. Um cateter acoplado a uma seringa de 5 mL foi introduzindo na uretra do animal para a coleta da urina. Foram obtidos 3 mL de urina que fora enviada para o LPCV – UFCG onde foi realizado o exame físico e químico da urina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No exame físico foi observado áreas de hipotricose generalizadas, lesões crostosas na região do dorso e membros, alopecia periocular e lesão em ponta de orelha. Não foi observado alterações de padrão de ausculta pulmonar e cardíaca. O animal apresentava linfonomegalia poplíteos, e escore corporal baixo. Os sinais clínicos relatados pelo tutor e as alterações observadas no exame físico são comuns em cães com leishmaniose visceral (SCHIMMING, 2012; GREENE, 2016).

As lesões de pele, linfadenomegalia e perda de peso são os principais achados clínicos em animais com essa enfermidade (GREENE, 2016). As lesões na pele podem ocorrer devido à deposição de imunocomplexos culminando em processos inflamatórios

locais. O aumento nos linfonodos é ocasionado por um aumento da proliferação e atividade de linfócitos B (KOUTINAS e KOUTINAS, 2014). O fator de necrose tumoral alfa, que é uma das citocinas pró-inflamatórias produzidas em pacientes com leishmaniose visceral, é um dos fatores que induz à perda de peso nesses pacientes (SINGH *et al.*, 2018).

Quanto aos analitos bioquímicos séricos, o animal apresentou hipoalbuminemia (1,72 g/dL vs. referência de normalidade 2,6 g/dL a 3,3 g/dL) e proteína total aumentada (11,2 g/dL vs. Referência de normalidade 2,7 a 4,4 g/dL). Os outros analitos bioquímicos analisados não apresentaram alterações com relevância clínica (THRALL *et al.*, 2015). A hiperproteinemia pode estar associada à ativação policlonal de linfócitos B causando um aumento de anticorpos, em especial gama-globulinas (BRAZ *et al.*, 2015). Os processos inflamatórios podem induzir à diminuição da albumina, caso estes persistam por dias ou semanas (STOCKAHM e SCOTT, 2011).

A quantidade de urina obtida foi insuficiente para a realização da sedimentoscopia. Desse modo, apenas o exame físico e químico da urina, foram realizados. Não foi observado alterações com relevância clínica. Para a realização do sumário de urina completo é recomendado que seja coletado uma quantidade mínima de 5 mL, caso contrário, isso pode gerar resultados falso positivos observados na sedimentoscopia (RIZZI *et al.*, 2017).

No eritrograma, o animal apresentou anemia (contagem de hemácias $2,44 \times 10^6/\mu\text{L}$ vs. referência de normalidade 5.5×10^6 a $8.5 \times 10^6/\mu\text{L}$; hematócrito 16% vs. referência de normalidade 37% a 55%) normocítica (68,9 fL vs. referência de normalidade 60 a 77 fL) e normocrômica (32 % vs. referência de normalidade 32% a 36%). Em lâmina, foi observado que as hemácias apresentavam se morfologicamente normais para a espécie. No plaquetograma foi observada trombocitopenia ($121.000/\mu\text{L}$ vs. referência de normalidade $200.000/\mu\text{L}$ a $500.000/\mu\text{L}$) com acentuada agregação plaquetária. Não foram evidenciadas alterações com significado clínico relevante no leucograma (WEISS e WARDROP, 2010). Durante a contagem de reticulócitos (reticulócitos corrigidos 1,3 vs. referência anemia não regenerativa 0,5 a 1,5) foi evidenciada anemia não regenerativa (LOPES *et al.*, 2007).

A anemia normocítica e normocrômica, não regenerativa, é um achado comum em cães com leishmaniose (BRAZ *et al.*, 2015). O processo inflamatório crônico pode ter induzido a liberação de interferon-gama, fator de necrose tumoral-alfa e interleucina-1 que inibem a proliferação e diferenciação das células progenitoras eritróides, além disso, essas citocinas pró-inflamatórias podem inibir a produção de eritropoetina pelos rins e consequentemente diminuem a eritropoiese (THRALL *et al.*, 2012).

Os animais podem apresentar os leucócitos totais dentro do valor de referência para a espécie (BRAZ *et al.*, 2015). Isso pode ocorrer devido ao processo inflamatório crônico no qual ocorre uma hiperplasia granulocítica aumentando a produção de leucócitos para suprir a demanda dos tecidos (STOCKHAM e SCOTT, 2011). O valor das plaquetas está falsamente diminuído devido a presença de agregados plaquetários, e isso ocorre devido a dificuldades durante a coleta que levam ao estímulo da agregação plaquetária (VALENCIANO *et al.*, 2014).

No mielograma foi observada uma amostra normocelular com presença de maturação celular ordenada sem evidencição de atipias. Ademais, observa-se um aumento na quantidade de plasmócitos e macrófagos. Foram observadas amastigotas de *Leishmaniasp* no fundo de lâmina e nos vacúolos citoplasmáticos dos macrófagos. A relação mieloid-

eritróide estava aumentada (1,9 vs. referência de normalidade 0,9 a 1,76). Diante disso, conclui-se que o animal apresentava hipoplasia eritróide e hiperplasia granulocítica. O hematócrito abaixo do valor de referência associado à contagem de leucócitos totais, quantidade de células nucleadas na medula normal, relação mielóide-eritróide alta, e o histórico do paciente configuram o processo medular como hipoplasia eritróide e hiperplasia granulocítica (HARVEY, 2001; GRIDEM *et al.*, 2014). A classificação quanto a hipoplasia e hiperplasia granulocítica ou eritróide pode variar mediante a relação mielóide-eritróide em comparação com a celularidade observada na medula óssea (GRIDEM *et al.*, 2014)

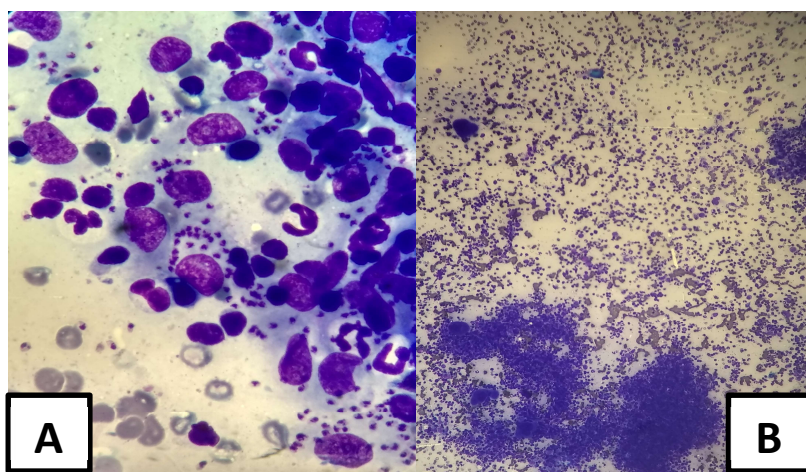


Figura 01: (A) presença de amastigotas de *Leishmaniasp* no interior de macrófagos e no fundo de lâmina observados no aumento de 1000x. (B) medula óssea com celularidade normal observada no aumento de 100x. (Fonte: LPCV – UFCG).

Os pacientes com leishmaniose visceral, tanto em humanos quanto em cães, podem desenvolver hipoplasia eritróide sem discrasia evidente (VARMA e NASEEM, 2010; PALTRINERI *et al.*, 2018). O padrão medular pode variar dependendo da resposta imunológica, contudo, à causa da hipoplasia eritróide nesse caso pode estar associada às citocinas pro-inflamatórias que afetam a eritropoiese (THRALL *et al.*, 2012; MOMO *et al.*, 2014). Os fatores pro-inflamatórios produzidos durante o processo inflamatório crônico podem contribuir para a hiperplasia granulocítica, contudo ainda não se sabe ao certo quais fatores estariam envolvidos nessa característica medular (ABIDIN *et al.*, 2018). O aumento na quantidade de plasmócitos e macrófagos pode estar relacionado à reação imunológica do organismo em oposição ao agente etiológico (HARVEY, 2001; PALTRINERI *et al.*, 2018).

A leishmaniose visceral pode causar hipoplasia eritróide e hiperplasia granulocítica, e isso é decorrente do processo inflamatório de curso crônico que acontece nessa enfermidade (NICOLATO *et al.*, 2013). Esse tipo de padrão medular pode ser observado também em outros processos inflamatórios crônicos como síndromes paraneoplásicas, autoimunes, como por exemplo, o lupus e micobacteriose com característica sistêmica (BARGER e MCNILL, 2017). O aumento de plasmocitos pode estar associado a mieloma múltiplo, e quando há um aumento concomitante de macrófagos pode estar correlacionado a presença de outros hemoparasitas como a *Ehrlichia sp* (HARVEY, 2001).

Após o resultado dos exames foi prescrito para o animal miltelfosina na dose de 2 mg/kg uma vez ao dia durante 28 dias, 10 mg/kg de alopurinol duas vezes ao dia até novas

recomendações edomperidona na dose de 0,5 mg/kg uma vez ao dia por 30 dias. Foi marcado o retorno do paciente para a semana seguinte, para reavaliar o seu estado geral, contudo ele não retornou.

No que diz respeito ao tratamento quimioterápico, o alopurinol foi utilizado com o intuito de impedir a síntese protéica e multiplicação do parasito ao se incorporar no seu RNA, culminando na diminuição da carga parasitária. A miltefusina é um agonista do receptor do fator de ativação plaquetário que tem efeito leishmanicida em macrófagos. A associação desses fármacos tem efeito sinérgico e propicia a cura clínica e evita recidiva. Para que o tratamento dos sinais clínicos seja mais eficaz é importante o uso de um imunomodulador, visto que a resposta imune do hospedeiro frente ao agente é responsável pela sintomatologia observada nessa enfermidade, nesse âmbito foi utilizada a domperidona para que ocorra a redução dos títulos de anticorpos e conseqüentemente dos sinais clínicos (JERICO *et al.*, 2015; TRAVI *et al.*, 2018). Contudo, os resultados terapêuticos desejados não foram observados, pois o paciente não retornou para nova avaliação clínica.

CONCLUSÕES

A leishmaniose visceral é uma doença comum em cães. Desse modo, uma abordagem clínica e laboratorial correta é importante para a realização do tratamento adequado contribuindo para o prognóstico do paciente. Além disso, mais estudos precisam ser realizados para melhor compreensão dos mecanismos e das respostas geradas pela medula óssea em animais com essa enfermidade.

BIBLIOGRAFIA

- ABEDIN, B.M.; HAMMAMI, A.; STÄGER, S.; HEINONE, K.M. Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *Plos One*, v.13, n.8, p.1-26, 2017.
- BARGER, A.M.; MACNEILL, A.L.; Small animals cytologic diagnosis. 1ª ed., Nova Iorque: Taylor & Francis Group, 2018. 920p.
- BRAZ, P.H.; SARTORETTO, M.C.; SOUZA, A.S.; MELO, F.M.G. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* *Acta Veterinária Brasileira*, n.9, n.1, p.87-90, 2015.
- ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C.; COTÉ, E. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 8ª ed., Missouri: Elsevier, 2017. 5875p.
- GODOY, K.C.S.; BRAZ, P.H.; ASSIS, A.R.; ANTUNES T.R.; GOMES, D.C.; SOUZA, A.I. Avaliação dos indicadores de lesão miocárdica em cães com leishmaniose visceral. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68, n.2, p.313-320, 2016.
- GREENE, C.G. Infectious disease of the dog and cat. 4ª ed., Missouri: Saunders, 2016. 1383p.

GRIDEM, C.B.; NEEL, J.A.; JUOPERRI, T.A. Cytology of Bone Marrow. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v.32, p.1313-1374, 2014.

HARVEY, J.W. *Atlas of Veterinary Hematology: blood and bone marrow of domestic animals*. 1ª ed., Philadelphia: Saunders, 2001. 225p.

JERICÓ, M.M.; ANDRADE NETO, J.P.; KOGIKA, M.M. *Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos*. 1ª ed., Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, 2015. 7047p.

KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmaniainfantum/chagasi*. *Veterinary Pathology*, v.5, n.4, p.527-538, 2014.

MOMO, C.; JACINTHO, A.P.P.; MOREIRA, P.R.R.; MUNARI, D.P.; MACHADO, G.F.; VASCONCELOS, R.O. Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Medicine International*, v.14, n.1, p.1-5, 2014.

NICOLATO, R.C.; ABREU, R.T.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.O.; REIS, L.E.S.; CARVALHO, M.G.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C.; BOUILLET, L.E.M.; LEMOS, D.S.; COURA-VITAL, W.; REIS, A.B. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally leishmania infantum–Infected dogs and related myelogram and hemogram changes. *Plos One*. v.8, n.12, p.1-9, 2013.

PALTRINIERI, S.; GRANDONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*, v.45, n.4, p.552-578, 2018.

RIBEIRO, R.R.; MICHALICK, M.S.M.; DA SILVA, M.E.; DOS SANTOS, C.C.P.; FRÉZARD, F.J.G.; SILVA, S.M. Canine Leishmaniasis: An overview of the current status and strategies for control. *Biomedical Research Internacional*, v.18, n.2, p.1-12, 2019.

RIZZI, T.E.; VALENCIANO, A.; BOWLES, M.; COWELL, R.; TYLER, R.; DENICONA D.B. *Atlas of canine and feline urinalysis*. 1ª ed., St Louis: John Wiley & Sons, 2017. 197p.

SCHIMMING, B.C. Leishmaniose visceral canina – Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v.10, n.19, p1-17, 2012.

SILVA, R.B.S.; MENDES R.S.; SANTANA V.L.; SOUZA, H.C.; RAMOS C.P.S.; SOUZA, A.P.; ANDRADE, P.P.; MELO, M.A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.36, n.7, p. 625-629, 2016.

SINGH, S.; FACIORUSSO, A.; SINGH, A.B.; CASTEELE, N.V.; ZARRINPAR, A.; PROKOP, L.J.; GRUNVALD, E.L.; CURTIS, J.R.; SANDBORN, W.J. Obesity and response to anti-tumor necrosis factor- α agents in patients with select immune-mediated inflammatory diseases: A systematic review and meta-analysis. *Plos One*, v.13, n.5, p.1-26, 2018.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2ª ed., Iowa: Blackwell Publishing, 2011, 728p.

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBELL, T.W. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária. 2ª ed., São Paulo: Roca, 2015. 1590p.

TRAVI, B.L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. Plos One, v.12, n.1, p.1-13, 2018.

VALENCIANO, A.C.; COWELL, R.C.; RIZZI, T.E.; TYLER, R.D.; DENICOLA, D.B. Atlas of canine and feline peripheral blood smears. 1ª ed., St Louis: Elsevier, 2014. 516p.

VARMA, N.; NAASEN, S.; Hematological changes in visceral leishmaniasis/Kal Azar. Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion, v.26, n.3, p.78-82, 2010.

VIOL, M.A.; AQUINO, M.C.C.; NETO, L.S.; OLIVEIRA, B.C.M.; KANETO, C.N.; ZUCATTO, A.S.; BRESCIANI, K.D.S. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina no Brasil – Revisão. Unimar Ciências, v.23, n.1-2, p.17-22, 2014.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology. 6ª ed., Iowa: Blackwell, 2010. 1232p.