



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
MESTRADO EM PATOLOGIA

ALANA JOCELINA MONTENEGRO DE CASTRO

LEISHMANIOSE VISCERAL – AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DA MEDULA  
ÓSSEA E CORRELAÇÃO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA.

FORTALEZA

2011

ALANA JOCELINA MONTENEGRO DE CASTRO

LEISHMANIOSE VISCERAL – AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DA  
MEDULA ÓSSEA E CORRELAÇÃO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de mestre.

**Orientadora:** Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu

**Co-orientador:** Profa. Dra. Maria Helena da Silva Pitombeira

FORTALEZA 2011

## Ficha catalográfica

C35l Castro, Alana Jocelina Montenegro de  
Leishmaniose visceral – avaliação citomorfológica da  
medula óssea e correlação com a gravidade da doença./  
Alana Jocelina Montenegro de Castro. – Fortaleza, 2011.  
73f.: il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Margarida Maria de Lima Pompeu  
Dissertação (Patologia) – Universidade Federal do Ceará.  
Faculdade de Medicina. Departamento de patologia e  
Medicina Legal

1. Leishmaniose visceral 2. Medula óssea 3.  
Comorbidade I. Pompeu, Margarida Maria de Lima (Orient.)  
II. Título.

CDD: 616.9364

**ALANA JOCELINA MONTENEGRO DE CASTRO**

**LEISHMANIOSE VISCERAL – AVALIAÇÃO CITOMORFOLÓGICA DA  
MEDULA ÓSSEA E CORRELAÇÃO COM A GRAVIDADE DA DOENÇA.**

**Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em  
Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Patologia.**

**Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Dr. Herivaldo Ferreira da Silva

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Dra. Dorcas Lamounier Costa

---

Dra. Romélia Gonçalves Pinheiro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço muito especialmente e com emoção:

- à minha família e a todos meus grandes amigos que me incentivaram, me deram apoio e contribuíram para realizar esse trabalho;
- à orientadora desta dissertação e amiga, Prof.<sup>a</sup> Margarida Maria Lima Pompeu que soube com muita competência e profissionalismo delinear o percurso de minha formação científica durante o Mestrado;
- à Prof.<sup>a</sup> Maria Helena da Silva Pitombeira, amiga e companheira, pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade na co-orientação deste trabalho;
- à Prof.<sup>a</sup> Rosa Maria Salani Mota pela análise estatística dos dados deste trabalho;
- à bibliotecária Norma de Carvalho Linhares pelo auxílio na revisão bibliográfica;
- a todos os colegas do mestrado pelo companheirismo;
- a todos os docentes, discentes e funcionários do departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC pelo apoio e contribuição;
- a todos os que fazem os laboratórios do HUWC, HIAS, HSJ pelo auxílio na coleta do material;
- a todos os colegas e funcionários do HEMOCE pela consideração e apoio.

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é um sério problema de saúde pública na América Latina e vem apresentando uma letalidade crescente no Brasil. É uma doença infecciosa sistêmica que envolve a medula óssea, causando várias manifestações hematológicas. **Objetivos:** Descrever as características da medula óssea na LV e correlacionar os achados citomorfológicos com parâmetros do sangue periférico e com os sinais de gravidade da doença. **Metodologia:** Trata-se de um estudo retrospectivo, com levantamento dos dados clínicos e laboratoriais de pacientes atendidos em três hospitais de referência no Estado do Ceará, entre junho de 2001 a agosto 2010. Foram incluídos 126 pacientes com diagnóstico de LV, confirmado pela detecção do parasito na medula óssea e/ou pela sorologia positiva, através do rK39. As lâminas dos mielogramas de todos os pacientes foram avaliadas e a carga parasitária e os parâmetros hematológicos foram determinados. A gravidade foi determinada pelo risco de óbito, utilizando sistema de escores. **Resultados:** A idade variou de 5 meses a 79 anos e 74% eram do gênero masculino. Os pacientes residentes em região urbana representaram 68,2% da casuística. Comorbidades estavam associadas em 31,7% dos pacientes. Os achados mais frequentes da medula óssea foram carga parasitária moderada/alta (57,2%), displasia com predomínio de diseritropoese (80,9%), hemofagocitose (30,1%) e granuloma (22,2%). Houve uma associação positiva entre a carga parasitária com neutropenia grave, neutrófilos  $<500/\text{mm}^3$  ( $p=0,04$ ) e hemofagocitose ( $p=0,05$ ). No presente trabalho, utilizando o modelo de prognóstico baseado em escores, foi observado que 23,8% foram classificados como pacientes com alto risco de óbito ( $\geq 3$ ). A maioria dos pacientes com escore considerado de alto risco de óbito apresentou medula óssea normocelular, carga parasitária moderada/alta, diseritropoese e disgranulopoese. Em relação à presença de granuloma, houve uma associação negativa, estatisticamente significativa, nos pacientes com alto risco de óbito ( $p=0,02$ ). O estudo aponta para possíveis indicadores diagnósticos e de prognósticos identificáveis na medula óssea de pacientes com LV.

**Palavras chaves:** Leishmaniose visceral; medula óssea; hematopoese.

## ABSTRACT

The visceral leishmaniasis (VL) is a serious problem of public health in the Latin America and has shown an increase mortality in the Brazil. This is a systemic infectious disease involving the bone marrow, causing many hematologic manifestations. **Objetives:** to describe LV bone marrow features and correlate cytomorphological findings with peripheral blood parameters and the disease severity. **Methodology:** It is a retrospective study with gathering clinical and laboratory data of patients attended at three references hospital of Ceará State between June 2001 and August 2010. Were included 126 patients with a LV diagnosis confirmed by detection of the parasite in bone marrow and/or by positive sorology, by rK39. The slides of bone marrow aspiration of all patients were evaluated and the parasite load and the hematologic parameters were determined. The gravity was determined by the risk of death using the scoring system. **Results:** The age ranged from 5 months to 79 years and 74% were male. The patients from urban area accounted 68,2%. Comorbidities were associated in 31,7% patients. The more frequently finding of bone marrow were moderate/high parasite load (57,2%), dysplasia with predominance of dyserythropoiesis (80,9%), hemophagocytosis (30,1%) and granuloma (22,2%). There was one positive association between parasite load and serious neutropenia, neutrophil  $<500/\text{mm}^3$  ( $p=0,04$ ), and hemophagocytosis ( $p=0,05$ ). In this present study, using the model predictions based on scores was observed that 23,8% were classified as high risk of death. Most patients with a score considered with high risk of death had normocelular bone marrow, parasite load moderate/high, dyserythropoiesis and dysgranulopoiesis. In relation to the presence of granuloma there was a negative association statistically significant in the patients with high risk of death ( $p=0,02$ ). The study points to possible diagnostic and prognostic indicators identified in the bone marrow of patients with VL.

**Key-words:** Visceral leishmaniasis; bone marrow; hematopoiesis.

## LISTAS DE TABELAS

1. Manifestações clínicas de 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 - 2010.....	34
2. Dados hematológicos e principais parâmetros bioquímicos de 126 pacientes com LV .....	35
3. Distribuição das comorbidades apresentadas pelos pacientes com LV (n=43), Ceará, 2001 – 2010 .....	35
4. Distribuição dos pacientes com LV (Ceará 2010 – 2011) classificados quanto aos escores de risco, segundo Sampaio (2010).....	36
5. Distribuição das alterações citomorfológicas observadas na medula óssea de 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 - 2010.....	39
6. Distribuição do parasitismo observado na medula óssea de 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001-2010 .....	42
7. Associações das Alterações Citomorfológicas com a Carga Parasitária da Medula Óssea de 126 Pacientes Portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010 ...	44
8. Comparação da carga parasitária em pacientes com LV coinfectados com HIV, Ceará, 2001 – 2010 .....	46
9. Associação da carga parasitária com a gravidade em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010 .....	47
10. Associação da celularidade do aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010 .....	47
11. Associação da presença de granuloma no aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010 .....	48
12. Associação da diseritropoese no aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.....	48
13. Associação da disgranulopose no aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.....	49
14. Associação da dismegacariopose no aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010...	49

## LISTAS DE FIGURAS

1.	Distribuição segundo o gênero dos pacientes com LV, Ceará, 2001 - 2010.....	31
2.	Distribuição em percentagem dos 126 pacientes portadores de LV, segundo a procedência, no Estado do Ceará, durante o período de 2001 – 2010 .....	32
3.	Distribuição em percentual, segundo a faixa etária e o gênero, de 126 pacientes com LV, Ceará, 2001 – 2010 .....	33
4.	Distribuição em percentual da celularidade medular e das linhagens hematopoéticas dos 126 pacientes com LV, Ceará, 2001 – 2010 .....	37
5.	Eritroblastos displásticos e rouleaux em aspirado de medula óssea (May-Grunwald-Giemsa, x1000 .....	40
6.	Células da linhagem granulocítica displásticas em aspirado de medula óssea (May-Grunwald-Giemsa, x1000) .....	40
7A-B	Micromegacariócitos em aspirado de medula óssea (May-Grunwald-Giemsa, x1000). .....	40
8.	Corpo citoplasmático em aspirado de medula óssea, contendo amastigotas (May-Grunwald-Giemsa, x40).....	40
9.	Célula de Mott em aspirado de medula óssea, (May-Grunwald-Giemsa, x40) .....	41
10.	Célula plasmática atípica em aspirado de medula óssea (May-Grunwald-Giemsa,x1000). .....	41
11.	Granuloma em aspirado de medula óssea,(May-Grunwald-Giemsa, x40) .....	41
12.	Célula gigante em aspirado de medula óssea,(May-Grunwald-Giemsa, x 1000) .....	41
13.	Hemofagocitose em aspirado de medula óssea, (May-Grunwald-Giemsa, x 1000) .....	41
14.	Formas amastigotas extra e intracelular, parasitando macrófagos, em aspirado de medula óssea,(May-Grunwald-Giemsa, x1000).....	42
15.	Distribuição da carga parasitária de pacientes portadores de LV, em relação à diseritropoese. Ceará, 2001 – 2010.....	43
16.	Distribuição da carga parasitária de pacientes portadores de LV, em	

	relação à hemofagocitose. Ceará, 2001 – 2010 .....	43
17.	Associação das alterações do sangue periférico consideradas como critérios de risco de óbito com a carga parasitária em 126 pacientes com LV, Ceará, 2001 – 2010.....	45
18.	Distribuição das comorbidades em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato de aminotransferase
BP	Baixo parasitismo
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
DAT	Teste de aglutinação direta
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
G - CSF	Fator Estimulante de Formação de Granulócito
GM - CSF	Fator Estimulante de Formação de Macrófago e Granulócito
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IDRM	Intradermo reação de Montenegro
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LES	Lupus eritematoso sistêmico
LDH	Desidrogenase láctica
LDU	<i>Leishman Donovan Units</i>
LV	Leishmaniose visceral
MAP	Moderado/alto parasitismo
M/E	Mielóide/eritóide
MO	Medula óssea
MS	Ministério da Saúde
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PCR	Polimerase chain reaction
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RT-PCR	Reação de imunofluorescência indireta em tempo real
SFM	Sistema fagocítico macrofágico
TAP	Tempo de atividade da protrombina
Th	Linfócito T <i>helper</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO ...</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Etiologia.....</b>	<b>14</b>
<b>1.2</b>	<b>Patogenia .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Aspectos clínicos e laboratoriais .....</b>	<b>16</b>
<b>1.4</b>	<b>Diagnóstico .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Fatores associados à gravidade .....</b>	<b>18</b>
<b>1.6</b>	<b>Alterações citomorfológicas da medula óssea .....</b>	<b>19</b>
1.6.1	Celularidade da medula óssea e contagem diferencial .....	20
1.6.2	Componentes celulares da medula óssea .....	21
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>24</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Critérios de inclusão .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Critérios de exclusão.....</b>	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Metodologia geral para preenchimento .....</b>	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>Dados demográficos e de identificação .....</b>	<b>27</b>
<b>4.5</b>	<b>Dados do exame clínico .....</b>	<b>27</b>
<b>4.6</b>	<b>Dados dos exames laboratoriais .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b>Critérios de gravidade .....</b>	<b>28</b>
<b>4.8</b>	<b>Medula óssea .....</b>	<b>29</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>30</b>
<b>4.10</b>	<b>Aspectos éticos .....</b>	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização do perfil sócio demográfico e clínico epidemiológico dos pacientes portadores de LV .....</b>	<b>30</b>
<b>5.2</b>	<b>Aspectos clínicos e laboratoriais .....</b>	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Distribuição das comorbidades associadas à LV .....</b>	<b>35</b>
<b>5.4</b>	<b>Caracterização dos pacientes com LV, quanto aos critérios de risco de óbito .....</b>	<b>36</b>
<b>5.5</b>	<b>Caracterização dos achados citomorfológicos da medula óssea....</b>	<b>36</b>

5.5.1	Celularidade da medula óssea .....	37
5.5.2	Alterações citomorfológicas da medula óssea .....	38
5.5.3	Parasitismo medular .....	42
<b>5.6</b>	<b>Associação das alterações morfológicas com a carga parasitária no aspirado da medula óssea .....</b>	<b>43</b>
<b>5.7</b>	<b>Associação da carga parasitária da medula óssea com as alterações do sangue periférico .....</b>	<b>45</b>
<b>5.8</b>	<b>Associação das comorbidades com a carga parasitária da medula óssea .....</b>	<b>45</b>
<b>5.9</b>	<b>Associação das alterações da medula óssea e da carga parasitária com a gravidade da doença .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>58</b>
	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>67</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV), ou calazar, é uma doença infecciosa sistêmica, grave, potencialmente fatal para o homem com manifestações que refletem o desequilíbrio entre a multiplicação dos parasitas no sistema fagocítico mononuclear (SFM) e a resposta imunológica do indivíduo. A letalidade nos casos humanos não tratados pode alcançar de 70% a 90% (MICHALICK; GENARO, 2005).

A LV apresenta-se globalmente distribuída, sendo estimada uma incidência de 500 mil casos novos/ano. É considerada endêmica em 88 países, sendo que cerca de 90% de casos notificados ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (DESJEUX, 2004).

A distribuição geográfica da LV vem se modificando desde a década de 80. O ciclo de transmissão, que anteriormente ocorria no ambiente silvestre e rural, hoje também se desenvolve em áreas urbanas e rurais não endêmicas. Vários fatores podem ter contribuído para essa mudança como a migração e as alterações ambientais. A doença vem surgindo cada vez mais em pacientes com AIDS e com outras comorbidades. As principais comorbidades associadas ao risco de aquisição da LV são aquelas ligadas a situações de imunodeficiência, infecção pelo HIV, transplantes, uso de corticóide e outras drogas imunossupressora, doença hepática e idade (DESJEUX, 2004).

No Brasil, a LV está distribuída em 21 Unidades Federadas, atingindo as cinco regiões. Em 2009, a região Nordeste representou 47,5% dos casos, seguida pelas regiões Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro-Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). De 2000 a 2009 foram registrados 34.583 casos de LV no país, com média anual de 3.458 casos confirmados. Nesse mesmo período, ocorreram 1.771 óbitos por LV, representado por uma letalidade média de 5,1%. (MS, 2010).

As estratégias de controle atuais não têm sido capazes de prevenir a expansão geográfica (TORRES; BRANDÃO, 2006). Sua alta incidência e letalidade é um problema de saúde pública, observando-se a presença de casos autóctones em 24 estados, sendo a região Nordeste responsável por 56% dos casos notificados no país, com destaque para o Estado do Ceará, aonde a LV vem se mantendo endêmica, com a notificação de surtos frequentes (CEARÁ, 2009). Segundo o

DATASUS, no Ceará foram notificados e confirmados 1636 casos de LV de janeiro de 2001 a dezembro de 2006. Fortaleza representa em torno de 61% dos casos.

## 1.1 Etiologia

A LV é causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*. Existem três espécies de *Leishmania*: *L. donovani*, *L. chagasi* e *L. infantum*, distribuídas em diferentes regiões geográficas. A *L. donovani* é responsável pelo calazar no leste da África e na Índia. A *L. infantum* é o agente da LV do Mediterrâneo e a *L. chagasi* da LV nos países da América Latina. A *Leishmania chagasi* é a espécie mais comum encontrada no Brasil (NEVES; MELO; LINARDI, 2005).

A *Leishmania* é um protozoário intracelular obrigatório do SFM apresentando-se com uma forma promastigota ou flagelada, encontrada no intestino do vetor e outra amastigota, presente nos tecidos dos vertebrados (NEVES; MELO; LINARDI, 2005).

O vetor da LV é um inseto hematófago de pequeno porte, flebotomíneo da espécie *Lutzomia longipalpis*, cor de palha e grandes asas pilosas. Seu *habitat* é o domicílio e peri-domicílio, onde se alimenta de sangue do homem, do cão, de outros mamíferos e aves. A fêmea da *Lutzomia longipalpis* é contaminada durante o repasto sanguíneo em animal infectado através das formas amastigotas. Estas, ao atingirem o intestino médio, transformam-se em promastigotas e em torno do terceiro dia chegam à probóscida do vetor, sendo então, inoculadas quando o inseto pica um novo mamífero. Essas formas são, posteriormente, fagocitadas por células do SFM, iniciando sua fase de parasitismo no novo hospedeiro. Outras formas menos comuns de transmissão são representadas por acidentes de laboratório, transfusão sanguínea, transmissão materno-fetal e pelo compartilhamento de agulhas contaminadas (ALVAR *et al.*, 1997).

## 1.2 Patogenia

A LV é uma doença sistêmica que atinge as células do SFM, sendo os órgãos mais afetados: baço, fígado, linfonodos, medula óssea (MO) e pele. Em casos avançados da doença, praticamente todos os órgãos podem ser acometidos.

Após inoculação, cuja lesão no local muitas vezes é inaparente, a forma promastigota da leishmania é fagocitada por células mononucleares onde se transforma em forma amastigota, iniciando-se o processo de multiplicação intracelular com disseminação por via hematogênica ou linfática (BARRAL *et al.*, 1998; MALLA; MAHAJAN, 2006).

Os fatores que determinam o desenvolvimento da LV permanecem não identificados, mas a resposta imune tem um papel importante no controle da doença. A resistência à doença é determinada por uma resposta do tipo Th1, enquanto que a suscetibilidade é mediada pela resposta tipo Th2, caracterizada pela produção de altos títulos de anticorpos e citocinas imunossupressoras (KHOSHDEL *et al.*, 2009).

O parasita intracelular desencadeia inicialmente uma resposta imune dependente de linfócitos Th1 capaz de abortar a doença na grande maioria dos pacientes, por intermédio da produção de IL2 e IFN-gama. A atividade leishmanicida de macrófagos depende da produção de radicais livres como  $O^2$  e  $NO^2$  em resposta ao IFN-gama. A resposta Th2 induz a produção de IL4 e IL10 que contribui para a patologia da doença de diversas maneiras. A IL10 torna os macrófagos não responsivos ao IFN-gama, inibe a maturação e migração das células dendríticas, estimula a proliferação e diferenciação das células B, levando a produção de auto-anticorpos e formação de imunocomplexos. A IL4 está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4 (NYLÉN; SACKS, 2007).

A hiperplasia do SFM, principalmente de macrófagos e plasmócitos e a congestão dos sinusoides leva à esplenomegalia com consequente sequestro esplênico; hepatomegalia com hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer; adenomegalias discretas; pneumonite intersticial pela ocupação e lesão de células alveolares e infiltração da MO determinando uma redução da hematopoese. A linfonodomegalia é discreta ou ausente na LV do velho mundo, onde o diagnóstico etiológico pode ser efetivado pela pesquisa do parasita em material aspirado destes

linfonodos. A ativação policlonal dos linfócitos B está relacionada à produção acentuada de imunoglobulinas, formação de autoanticorpos e de imunocomplexos circulantes. Ocorre uma diminuição da população celular ao nível da zona paracortical dos linfonodos com queda na produção dos linfócitos T. A infiltração das placas de Payer acelera o trânsito intestinal, justificando em parte a hipoalbuminemia. A imunossupressão durante a doença ativa, associada à desnutrição e leucopenia, seriam responsáveis pelo desenvolvimento de infecções secundárias (BARBOSA, 1991; GENARO, 1991; BADARÓ; DUARTE, 2005; ZIJLSTRA, 1991).

A resistência à visceralização da *Leishmania* tem como principal característica histopatológica o aparecimento de granulomas. A formação, estrutura e função dos granulomas têm sido extensamente estudadas na leishmaniose experimental (MALLA; MAHAJAN, 2006). Estas estruturas inflamatórias, imunologicamente ativas, formadas por macrófagos parasitados, circundados por células T produtoras de citocinas e monócitos, provê um microambiente favorável para a morte intracelular da *L. donovani* o que constitui um mecanismo de defesa do hospedeiro (MURRAY, 2001).

### **1.3 Aspectos clínicos e laboratoriais da Leishmaniose visceral**

O espectro clínico da LV pode variar desde manifestações discretas até as graves, que, se não tratadas, podem levar a óbito. Os sinais e sintomas irão depender da relação que se estabelece entre parasito-hospedeiro, isto é, imunidade celular do hospedeiro e virulência da espécie infectante. A tríade clássica da LV, hepatoesplenomegalia, febre e pancitopenia é observada em 75% dos casos (PEARSON; SOUZA, 1995; BHATTACHARYA; SUR; KARBWANG, 2006).

O período de incubação varia de 10 dias a 24 meses com média de 2 a 4 meses. Tem sido relatados casos com 10 anos ou mais. A infecção latente pode progredir para doença ativa sob a influência de algum tipo de estresse ou depressão do sistema imune (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010). Em uma zona de transmissão ativa de casos, é difícil determinar o tempo decorrido entre a infecção e a apresentação da doença (FARHAT; CARVALHO; SUCCI, 2007).

A forma clássica apresenta longa evolução dos sintomas, deficiência nutricional, perda de cabelos, crescimento dos cílios, febre, perda de peso e caquexia, hepatoesplenomegalia, palidez intensa. Na forma aguda da doença a manifestação dos sintomas é abrupta. Na maioria dos casos a febre é o primeiro sintoma e pode ser alta, contínua ou intermitente, com duração de uma ou duas semanas. Os casos assintomáticos podem apresentar exames sorológicos e/ou parasitológicos positivos (SILVA *et al.*, 2001; FARHAT; CARVALHO; SUCCI, 2007).

Alterações laboratoriais incluem anemia, trombocitopenia, leucopenia, neutropenia, eosinopenia, linfomonocitose, hipergamaglobulinemia com hipoalbuminemia que resultam na inversão da relação albumina/globulina e aparecimento de formação em *rouleaux* das hemácias com padrões tão acentuados quanto no mieloma múltiplo. Aumento das aminotransferases hepáticas é achado comum, hiperbilirrubinemia é menos freqüente e fenômenos hemorrágicos tem sido relacionados com prognóstico desfavorável (BAIN, 1997; BARANWAL; MANDAL; SING, 2007).

Estudos epidemiológicos mostram que somente uma pequena parcela de indivíduos infectados desenvolve a forma clássica da LV, resultando que apenas um em cada seis indivíduos expostos à *L. donovani* desenvolverão a doença (BADARÓ *et al.*, 1986). Existe evidência de que indivíduos permanecem infectados mesmo após a resolução espontânea dos sintomas, e que podem desenvolver a LV clássica ou a síndrome leishmanial atípica, vários anos depois, em caso de se tornarem imunocomprometidos (PEARSON; SOUSA, 1995). No Sudão, Etiópia e principalmente na Índia, encontra-se ainda a leishmaniose dérmica pós-calazar, que se manifesta após a cura da doença, caracterizada por lesões macropapulares e nodulares (ZIJLSTRA *et al.*, 2003).

#### **1.4 Diagnóstico**

O diagnóstico da LV é baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial pode ser realizado de três formas: parasitológico, imunológico e molecular.

O diagnóstico parasitológico é a demonstração do parasita em culturas ou em aspirados de MO, baço e linfonodo (GONTIJO; MELO, 2004).

O diagnóstico imunológico tem como base a detecção de anticorpos anti-leishmania. Os testes mais utilizados são: teste de aglutinação direta (DAT), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), padronizado pelo MS, e ensaio imunoenzimático (ELISA). A especificidade do teste depende do antígeno empregado. A desvantagem da baixa especificidade comum aos métodos que utilizam antígenos não purificados levou à identificação de alguns antígenos purificados, sintéticos ou recombinantes. Entre estes, a proteína recombinante K39 (rK39) foi a mais amplamente avaliada, tratando-se de uma seqüência clonada de 39 aminoácidos da região quinase da *L. chagasi*, complexo donovani-específico (CANELA; ALVES; RODRIGUES, 2004).

O diagnóstico molecular é realizado por métodos de hibridização com sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR) – para detecção de DNA – e da reação em cadeia da transcriptase reversa após transcrição reversa (RT-PCR) – para detecção de RNA (GONTIJO; MELO, 2004; SCHALLING; OSKAM, 2002).

### **1.5 Fatores associados à gravidade**

O MS, em 2005, elaborou um manual para abordagem dos casos graves e orientação de conduta em pacientes com LV, uma nova versão foi publicada em 2006 (MS, 2006b). Foram considerados aspectos relacionados a sinais de alerta, de gravidade e de indicação de internação. Como sinais de alerta, encontram-se idade entre seis e 12 meses e, no caso de adultos, idade compreendida entre 50 e 65 anos. Também estão incluídas, nessa categoria, a suspeita de infecção bacteriana, recidiva da LV, diarreia ou vômitos, edema localizado e febre por mais de 60 dias. Os sinais de gravidade incluem idade inferior a seis meses ou adultos com mais de 65 anos, icterícia, fenômenos hemorrágicos, edema generalizado, sinais de toxemia, desnutrição grave e a presença de qualquer comorbidade, inclusive infecção bacteriana.

A hospitalização é recomendada para todos os pacientes com algum sinal de alerta ou gravidade. Além disso, recomenda-se a internação de todos aqueles que apresentem leucometria inferior a  $1.000 \text{ céls/mm}^3$ , neutropenia menor do que  $500 \text{ céls/mm}^3$ , plaquetopenia inferior a  $50.000 /\text{mm}^3$ , hemoglobina menor do que  $7,0 \text{ g/dL}$ , creatinina sérica acima de duas vezes o maior valor de referência, atividade de protrombina menor do que 70%, bilirrubina total acima do maior valor de referência, dosagens de enzimas hepáticas (aminotransferases) cinco vezes o maior valor de referência e de albumina menor do que  $2,5 \text{ g/dL}$ .

Apesar de conter alguns parâmetros ainda sem definitiva comprovação na literatura, os critérios devem ser utilizados como orientação e não como forma única de conduta. Como exemplo, em pacientes pediátricos, seria mais prudente a internação das crianças com leucócitos menores que  $2.000 \text{ céls/mm}^3$  e neutrófilos abaixo de  $1.000 \text{ céls/mm}^3$ .

A definição de gravidade na LV é muito ampla e complexa. A necessidade de restringir os critérios de gravidade levou alguns autores a adotarem novas estratégias para definir gravidade, utilizando sistema de escores para determinar risco de óbito (COSTA, 2009; SAMPAIO *et al.*, 2010) que ainda são muito recentes e estão em fase de validação.

## **1.6 Alterações citomorfológicas da medula óssea**

A MO é um tecido constituído por células hematopoéticas e estroma. O estroma é constituído por um componente celular representado por adipócitos, fibroblastos, células reticulares, células endoteliais, osteoblastos, osteoclastos, e um componente acelular, representado pela matriz extracelular, composta por várias proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos. O estroma constitui o microambiente que regula a hematopoese por meio das citocinas liberadas pela matriz extracelular, que possibilita a proliferação e diferenciação das células hematopoéticas. O espaço medular é constituído por um complexo de seios venosos, cujos sinusóides são formados por células endoteliais e reticulares que participam ativamente da regulação da hematopoese. As células adiposas secretam fatores solúveis e funcionam como reserva de lípidos necessária ao metabolismo

das células em proliferação, participando também da regulação da hematopoese. O estroma é responsável pela produção de G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7 e TGF $\alpha$  e outros fatores que participam na produção, proliferação e maturação das células hematopoéticas. O compartimento das células hematopoéticas inclui as células tronco (*stem cells*), e as células diferenciadas das linhagens eritróide, mielóide e megacariocítica (ZAGO, 2005).

O estudo da MO é um procedimento antigo, que continua tendo relevância clínica nos tempos modernos. Desde 1905, quando o médico italiano Pianese relatou uma infiltração da medula óssea pelo parasita *Leishmania Infantum*, que este exame é aplicado na clínica (PARAPIA, 2007). Atualmente é considerado uma das ferramentas mais valiosas para diagnosticar as doenças hematológicas.

Este estudo pode ser realizado em amostra da medula óssea obtida por punção aspirativa ou por aquisição de fragmentos de tecido.

As indicações do mielograma incluem o diagnóstico das doenças hematológicas, estadiamento de linfoma de Hodgkin e não Hodgkin, a avaliação das citopenias, trombocitose, leucocitose e policitemia, investigação de febre de origem indeterminada, pesquisa de parasitas, diagnóstico de doenças de depósito (ex. doença de Niemann-Pick e doença de Gaucher), e a detecção do carcinoma metastático (FOUCAR, 2001).

#### 1.6.1 Celularidade da medula óssea e contagem diferencial

A celularidade da medula óssea é uma medida da relação das células hematopoéticas e gordurosas. Embora o material do mielograma e da biópsia óssea seja apenas uma amostra do órgão hematopoético, a celularidade da medula óssea pode ser bem estimada nessas duas técnicas e fornece importantes informações sobre a atividade hematopoética (FOUCAR, 2001).

A celularidade é variável e normalmente decresce com a idade. O termo hipocelular é usado para uma medula óssea com diminuição da celularidade e aumento do tecido adiposo, enquanto que uma medula óssea com proporção aumentada de células hematopoéticas, e uma diminuição da quantidade de gordura é referida como hipercelular (RILEY *et al.*, 2009).

A contagem diferencial é realizada determinando a porcentagem de células que compõem cada linhagem, o que permite calcular a relação mieloide/eritroide (M/E). Essa relação é uma importante medida semi-quantitativa das células eritroides e granulocíticas (RILEY *et al.*, 2009).

### 1.6.2 Componentes celulares da medula óssea

Células progenitoras, totipotentes ou “stem cells” são células primitivas que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação. Representam 0,01-0,05% das células da medula óssea. Originam todas as células hematopoéticas, incluindo eritrócitos, granulócitos, macrófagos, megacariócitos e linfócitos.

Linhagem eritróide: representa em torno de 25 a 30% do total celular. A produção de elementos precursores (proeritroblastos ou pronormoblastos) se dá através do estímulo da eritropoetina, sintetizada pelas células do parênquima renal e do fígado, considerada o principal regulador humoral da produção de hemácias (AZEVEDO, 2008). As células precursoras da linhagem eritroide são identificadas morfológicamente. Durante o processo de maturação ocorre uma condensação da cromatina nuclear, a hemoglobinizacão do citoplasma e a expulsão do núcleo. Os estágios celulares da eritropoese incluem eritroblasto basófilo, policromatófilo, ortocromático, reticulócito e hemácia (RILEY *et al.*, 2009).

Linhagem granulocítica: predomina na MO normal em indivíduos de todas as idades, constituindo 50 a 70% das células nucleadas. São produzidas a partir das células progenitoras multipotentes, sob a ação de numerosos mediadores, em especial os fatores G-CSF e GM-CSF. A célula mais imatura da linhagem granulocítica é o mieloblasto. Na sequência de maturação os mieloblastos são seguidos pelos promielócitos, mielócitos, metamielócitos e neutrófilos maduros (bastonetes e segmentados).

Linhagem megacariocítica: os megacariócitos representam menos que 1% das células nucleadas. São as maiores células da medula óssea, apresentam núcleos multilobados e sua proliferação é estimulada pela trombopoetina, produzida principalmente no fígado. Uma das características mais importantes da maturação do megacariócito é a poliploidia, decorrente da duplicação do DNA, sem que ocorra

divisão do citoplasma, denominada endomitose. A evolução do megacarioblasto para o megacariócito maduro envolve vários ciclos de duplicação do DNA sem a correspondente divisão celular. As plaquetas são formadas pela fragmentação do citoplasma do megacariócito.

Linhagem monocítica-macrofágica: os precursores mais imaturos são os monoblastos e promonócitos. Estas células são liberadas pela MO e transitam pelo sangue periférico como monócitos, migrando em seguida para os tecidos onde recebem denominações especiais em alguns deles: macrófagos na medula, células de Kupffer no fígado, células de Langerhans na pele, osteoclastos no osso, células microgliais no sistema nervoso central e células alveolares no pulmão. São também os precursores das células gigantes multinucleadas. Estas células constituem o sistema reticuloendotelial (fagocítico mononuclear) e tem como função: fagocitose de elementos estranhos e restos celulares, apresentação de antígenos, produção de citocinas que atuam na regulação da hematopoese, inflamação e resposta imune. Os macrófagos são a primeira linha de defesa do organismo contra parasitas intracelulares, capazes de destruir várias espécies de bactérias e fungos. Os monócitos e macrófagos são semelhantes aos granulócitos quanto à atividade fagocitária. A fagocitose induz um aumento do metabolismo oxidativo da célula, com o aumento do consumo de oxigênio, produção de  $H_2O_2$  e superóxidos e estímulo do *shunt* das pentoses.

Linfócitos e plasmócitos: os linfócitos normalmente compreendem 15-20% da população de células nucleadas da MO de adultos, e uma proporção discretamente maior em crianças. O precursor mais imaturo é o linfoblasto, seguido pelo prolinfócito. A maturação linfoide resulta na formação de linfócitos B, T e NK, células relacionadas à resposta imune humoral e celular. Os plasmócitos são o estágio final de maturação do linfócito B, responsável pela produção de imunoglobulinas. Normalmente compreendem menos de 1% de todas as células nucleadas da MO.

Mastócitos e outros tipos celulares: os mastócitos são derivados dos granulócitos basófilos e representam uma proporção muito pequena das células nucleadas. Uma variedade de outros tipos celulares são encontrados nos aspirados de MO, células do estroma, células adiposas, osteoblastos e osteoclastos (FOUCAR, 2001; NAEIM, 1992; REGO, 2005; RILEY *et al.*, 2009; ZAGO, 2005).

Alguns estudos têm demonstrado que patógenos podem agir diretamente na função das células hematopoéticas precursoras, *stem cells*, e no estroma medular (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000). Alterações na hematopoese são comumente associadas à infecção por vírus, bactérias e protozoários. A LV pode simular ou causar muitas alterações hematológicas como: pancitopenia, mielofibrose, mielodisplasia, hemofagocitose, (BAIN; WICKRAMASINGHE, 1986; DHINGRA *et al.*, 2010).

As alterações citomorfológicas e histomorfológicas encontradas na MO dos pacientes com LV, podem ser de dois tipos: (1) alterações no estroma medular - edema, hemorragia, necrose, granulomas, nódulos linfoides, mielofibrose, e a transformação gelatinosa ou atrofia; (2) alterações das linhagens hematopoéticas - hiperplasia, hipoplasia, ou aplasia e dispoeses de uma ou de todas as linhagens celulares (DIEBOLD *et al.*, 2000; DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010).

As alterações displásticas presentes na LV, em uma, duas ou nas três linhagens hematopoéticas são semelhantes às encontradas na mielodisplasia trilinear clonal, descritas segundo as diretrizes para o diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas (NIERO-MELO *et al.*, 2006).

A MO na LV pode ainda apresentar outras características anormais, incluindo plasmocitose, aumento de histiócitos e hemofagocitose (BAIN, 2010).

## **2 JUSTIFICATIVA**

A LV vem apresentando aumento da sua prevalência nestas últimas décadas. Dois fatos novos são preocupantes, a urbanização da doença com a chance de aumentar a transmissão, por acometer áreas com maior densidade populacional e sua associação com vírus HIV, na coinfeção. Tem sido relatado também aumento da forma grave na LV, que culminam em óbito em cerca de 3 - 13%. Discute-se se este aumento observado de formas graves da LV representa realmente uma mudança na apresentação da doença ou se seria decorrente de uma melhor detecção de casos.

Ainda existem lacunas no conhecimento da patogênese desta doença, e a compreensão dos mecanismos patogênicos são fundamentais para a intervenção terapêutica. No modelo murino, a LV apresenta resposta diferenciada no baço, no fígado e no sangue periférico. Muito pouco é conhecido sobre a fisiopatologia da medula óssea na LV e sua correlação com o baço, fígado e sangue periférico na evolução da doença. Neste estudo se busca descrever as alterações citomorfológicas na MO e correlacioná-las com a carga parasitária e as manifestações clínicas e laboratoriais da doença.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar as alterações citomorfológicas da medula óssea na LV e correlacionar com as manifestações clinico-laboratoriais.

### 3.2 Objetivos específicos

- Descrever as alterações citomorfológicas das linhagens hematopoéticas;
- Determinar a carga parasitária;
- Correlacionar as alterações morfológicas da MO com a carga parasitária;
- Correlacionar a carga parasitária da MO com as alterações do sangue periférico;
- Correlacionar as alterações da MO com as comorbidades;
- Correlacionar as alterações morfológicas e carga parasitária da MO com a gravidade da doença.

## **4 METODOLOGIA**

Trata-se de um estudo retrospectivo de pacientes com o diagnóstico de LV, internados no Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará, UFC, Hospital São José de Doenças infecciosas e Hospital Infantil Albert Sabin da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, SESA, no período de janeiro de 2001 e julho de 2010.

### **4.1 Critérios de inclusão**

Pacientes com LV, diagnóstico feito por identificação de leishmania no mielograma ou rK39 positivo.

### **4.2 Critérios de exclusão**

Pacientes com diagnóstico de LV que possuíam esfregaços do aspirado medular sem condições adequadas para análise ou que não realizaram mielograma.

### **4.3 Metodologia geral para preenchimento**

A busca dos prontuários foi guiada através de catálogos no Serviço de Arquivo Médico-Hospitalares (SAME). Os dados obtidos dos prontuários foram anotados em ficha clínica padronizada, contendo identificação do paciente, dados demográficos, clínicos e laboratoriais. As informações foram registradas em fichas de seguimento clínico-epidemiológica (Apêndice A, página 66) e transferidos para o banco de dados.

Informações obtidas dos prontuários relacionadas aos sintomas e sinais foram registradas como:

- 1- sim, se foi relatado o sintoma/sinal;
- 2- não, se foi negado o sintoma/sinal;
- 3- sem referência (s/ref), se não havia registro desse sintoma/sinal.

#### **4.4 Dados demográficos e de identificação**

Foram registrados o número identificador do prontuário, o nome do paciente, gênero, idade, data da internação, ou do diagnóstico.

A procedência foi categorizada em: 1- Fortaleza, 2- Região Metropolitana de Fortaleza, 3- Interior e 4- Outros estados.

#### **4.5 Dados do exame clínico**

As variáveis investigadas foram: febre, emagrecimento, comorbidades (infecções associadas, coinfeção HIV, doenças autoimunes e crônicas degenerativas) icterícia, edema, fenômenos hemorrágicos (petéquias, equimoses, sangramentos de mucosa), sinais de toxemia (letargia, má perfusão, cianose, taquicardia ou bradicardia, hipoventilação ou hiperventilação), hepatomegalia e esplenomegalia ao diagnóstico.

#### **4.6 Dados dos exames laboratoriais**

Foram avaliados hemograma (dados quantitativos da série vermelha, branca e plaquetária), albumina, marcadores de lesão hepática (ALT, AST, bilirrubinas, tempo de protrombina) e creatinina, ao diagnóstico.

#### 4.7 Critérios de gravidade

Foi considerado paciente com risco alto de óbito, aquele que apresentar escore  $\geq 3$ , segundo Sampaio *et al.* (2010), por ter apresentado a melhor combinação de sensibilidade (88,7%), especificidade (78,5%), valor preditivo positivo (32,0%), e valor preditivo negativo (78,5%).

VARIÁVEIS	ESCORE
Dispneia	1
Infecções associadas	1
Neutrófilos $< 500/\text{mm}^3$	1
Icterícia	2
Sangramento de mucosa	2
Plaquetas $< 50.000/\text{mm}^3$	3

#### 4.8 Medula óssea

Foram analisadas as lâminas de mielogramas dos arquivos do Laboratório do Hospital São José de Doenças Infeciosas, da Unidade Laboratorial de Referência em Hematologia (HEMOCE/UFC) e do Centro de Referência do Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins (HIAS-SESA). As lâminas foram coradas pelo May Grunwald-Giemsa, e realizadas uma avaliação hematológica e parasitológica em microscópio óptico, Olympus CX31, no aumento de 10X e 100X.

**Avaliação parasitológica** - A carga parasitária foi determinada segundo Stauber (1955) modificado, expressa como *Leishman Donovan Units* (LDU *index*), que corresponde ao número de amastigotas por 1000 células nucleadas. Os resultados foram classificados como parasitismo baixo (BP), quando o valor do LDU variou de 0-10, parasitismo moderado a alto (MAP), para LDU acima de 10.

**Avaliação hematológica** - Foi realizada uma contagem diferencial de 500 células, utilizando o contador automático Leukotron e avaliados os seguintes critérios:

- ✓ celularidade global - estimada como normocelular, hipercelular e hipocelular
- ✓ celularidade de cada linhagem hematopoética
- ✓ relação mielóide e eritróide ( M/E) - determinada dividindo a proporção de células da série mielóide pela proporção de eritroblastos. Valores entre 2,0/1,0 e 4,0/1,0 são considerados normais.
- ✓ contagem diferencial de plasmócitos, linfócitos e eosinófilos
- ✓ presença de macrófagos parasitados
- ✓ presença de hemofagocitose
- ✓ presença de granuloma
- ✓ presença de corpos citoplasmáticos

A análise das alterações morfológicas das três linhagens hematopoéticas seguiu as diretrizes para o diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas (NIERO-MELO *et al.*, 2006). As dispoeses nas linhagens eritróide (diseritropoese), granulocítica (disgranulopese) e megacariocítica (dismegacariopese) são avaliadas considerando:

**SÉRIE ERITRÓIDE** - Retardo maturativo, assincronismo maturativo núcleo-citoplasma, formas megaloblastóides (núcleo em "fatia de salame"), mitoses anômalas (despolarizadas), multinuclearidade, apoptose (cariorrexis), falhas de hemoglobinação, vacuolização citoplasmática, pontes internucleares ou intercitoplasmáticas, fragmentos nucleares, formas bizarras, atípicas ou aberrantes.

**SÉRIE GRANULOCÍTICA** - Retardo maturativo, assincronismo maturativo núcleo-citoplasma, alterações megaloblastóides (alteração de Tempka-Braün), disgranulações (hipogranularidade e/ou distribuição heterogênea), e formas pelgeróides (hiposegmentação, hipogranulação), *donut cells* (células em rosca), fragmentos nucleares, formas imaturas bizarras, atípicas ou aberrantes.

**SÉRIE MEGACARIOCÍTICA** - Núcleos fragmentados, hipersegmentados, bilobulados, monofomas grandes ou pequenas, microformas (igual a 2 vezes o tamanho do neutrófilo = 20-30 µm).

Para a avaliação da contagem diferencial das células nucleadas da medula óssea foram utilizados os valores de referência segundo Williams, 1990 ( Anexo 1).

#### **4.9 Análise estatística**

Os dados foram organizados e analisados descritivamente com o auxílio dos programas *Microsoft® Office Excel 2003* e analisados pelo programa *Epi Info™ version 3.5.1*. A fim de verificar possíveis associações entre as variáveis do estudo foi utilizado o teste exato de *Fisher* com nível de significância  $p < 0,05$ .

#### **4.10 Aspectos éticos**

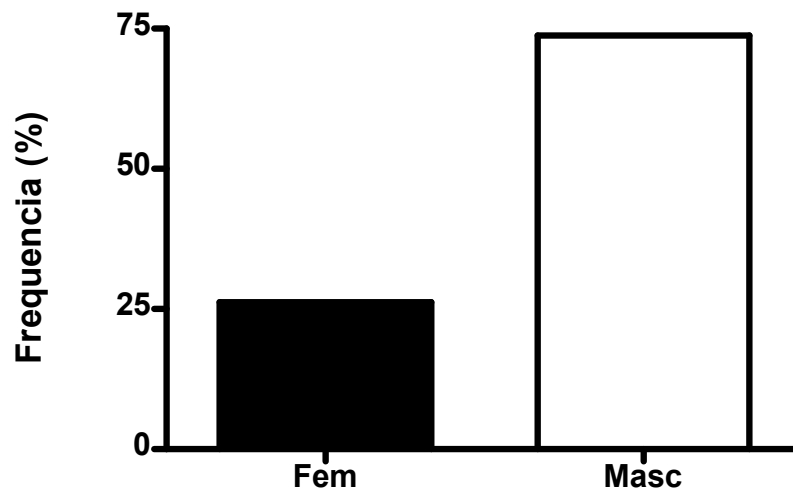
O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio, sob o protocolo de nº 067.07.10, ao Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital São José de Doenças Infecciosas e ao Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Infantil Albert Sabin, protocolo nº 089/2009.

Todos emitiram pareceres favoráveis, sem ressalvas para a execução da pesquisa.

## 5 RESULTADOS

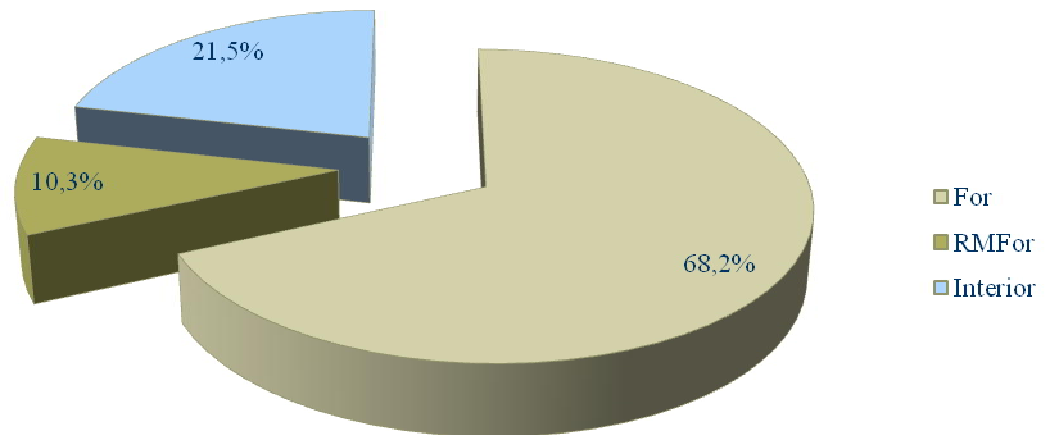
### 5.1 Caracterização do perfil sócio demográfico e clínico epidemiológico dos pacientes portadores de LV

Foram estudados 126 pacientes com diagnóstico de LV no período compreendido entre junho de 2001 a agosto de 2010. Com relação ao perfil sócio demográfico, 93 (74%) pacientes eram do sexo masculino e 33 (26%) do sexo feminino (Figura 1).



**Figura 1** – Distribuição segundo o gênero dos pacientes com LV, Ceará, 2001 - 2010.

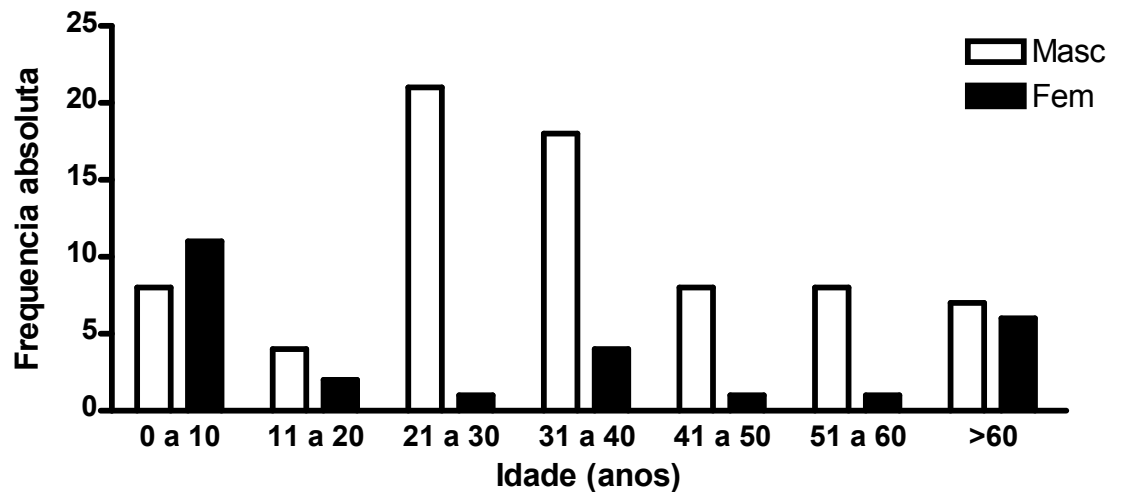
Todos os pacientes eram procedentes do estado do Ceará, sendo que 68,2% (n= 86) residiam em Fortaleza, 10,3% (n = 13) na região metropolitana de Fortaleza e 21,5% (n= 27) no interior do Estado (Figura 2).



**Figura 2** – Distribuição em porcentagem dos 126 pacientes portadores de LV, segundo a procedência, no estado do Ceará, durante o período de 2001 - 2010.

A idade dos pacientes variou de 5 meses a 79 anos. A distribuição por faixa etária mostrou que a maioria dos casos ocorreu em pacientes entre 21 a 59 anos de idade, correspondendo a 59,5% (n= 75), seguida pelas faixas etárias de 0 a 17 anos com 30,1% (n= 38) e >60 anos com 10,3% (n= 13).

Em relação ao gênero, foi observado que a LV preponderou entre pessoas do sexo masculino (74%, n = 93). No entanto, ela acometeu de forma diferenciada de acordo com a faixa etária. Ambos os sexos apresentaram frequência igual nas faixas etária  $\geq 60$  anos. Na faixa etária de 21 a 59 anos ocorreu mais entre os homens (54%) que nas mulheres (5,5 %) (Figura 3).



**Figura 3** - Distribuição em percentual, segundo a faixa etária e o gênero, de 126 pacientes com LV, Ceará, 2001 - 2010.

## 5.2 Aspectos clínicos e laboratoriais

Entre as principais manifestações clínicas, destacaram-se a febre em 95% dos casos, esplenomegalia 92,%, hepatomegalia 83% e emagrecimento 86%, seguida por icterícia 27%, edema 24% e fenômenos hemorrágicos( petéquias, hematomas e sangramentos de mucosa) 21%. Sinais de toxemia ( taquicardia, bradicardia, dispnéia, letargia) foram descritos em 8% dos pacientes (Tabela 1).

Tabela 1 – Manifestações clínicas de 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 - 2010.

<b>Manifestações clínicas</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Febre	116/122	95
Esplenomegalia	108/117	92
Emagrecimento	90/105	86
Hepatomegalia	96/116	83
Icterícia	21/77	27
Edema	19/79	24
Fenômenos hemorrágicos	19/90	21
Sinais de toxemia	8/95	8

Dentre os achados laboratoriais hematológicos e bioquímicos foi verificado uma ampla variação destes parâmetros. As alterações hematológicas mais relevantes foram: leucopenia ( $\mu=2.800/\text{mm}^3$  e  $DP=2.000$ ), neutropenia ( $\mu=1.400/\text{mm}^3$  e  $DP=1.700$ ), anemia (hemoglobina,  $\mu=8,0$  mg/dL e  $DP= 2,11$ ), plaquetopenia ( $\mu=104.774/\text{mm}^3$  e  $DP=64.773$ ). Em relação aos exames bioquímicos foram observados: hipoalbuminemia ( $\mu = 2,9$  g/dL e  $DP=0,84$ ), elevação das aminotransferases, AST ( $\mu=70,2$  mg/dL e  $DP=83,2$ ), ALT ( $\mu=60,7$  mg/dL e  $DP=70,6$ ), bilirrubina total ( $\mu =0,9$  g/dL e  $DP=1,0$ ) e creatinina ( $\mu =0,9$  mg/dL e  $DP=1,0$ ), (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados hematológicos e principais parâmetros bioquímicos de 126 pacientes com LV.

<b>Exames laboratoriais</b>	<b>Média</b>	<b>(±DP)</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>N</b>
Hemoglobina (g/dL)	8,0	2,11	2,6	15,6	126
Leucometria (mm <sup>3</sup> )	2.8	2.060	590	17.300	125
Neutrófilos (mm <sup>3</sup> )	1.4	1.666	53,00	14.532	125
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	104.774	64.773	10.000	376.000	123
AST (mg/dL)	70,2	83,2	9	440	103
ALT (mg/dL)	60,7	70,6	9	379	106
Albumina (g/dL)	2,9	0,8	0,9	4,8	87
Creatinina (mg/dL)	0,9	0,7	0,18	5,52	106
Atividade protrombina (%)	10	28	26	100	44
Bilirrubina total (mg/dL)	0,9	1,0	0,13	6	79

### 5.3 Distribuição das comorbidades associadas à LV

A presença de comorbidades foi observada em 40 (32%) dos pacientes. Entre elas as doenças infecciosas foram as mais freqüentes (75%) predominando os pacientes co-infectados com HIV, correspondendo a 32%. Estavam associadas também doenças autoimunes (10%) e doenças crônicas degenerativas (15%) ressaltando o diabetes mellitus e neoplasias (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das comorbidades apresentadas pelos pacientes com LV (n=43), Ceará, 2001 - 2010.

<b>Comorbidades</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
HIV	13	32
Outras doenças infecciosas	17	42
Doenças autoimunes	4	10
Doenças crônicas degenerativas	6	15
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>100</b>

#### 5.4 Caracterização dos pacientes com LV, quanto aos critérios de risco de óbito

Quando os pacientes foram classificados adotando o sistema de score de prognóstico de risco de óbito, considerando o escore  $\geq 3$  como alto risco para óbito, foi observado que 23,8% (n=30) dos pacientes eram de alto risco (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com LV (Ceará 2010 – 2011) classificados quanto aos escores de risco, segundo Sampaio *et al.* (2010)

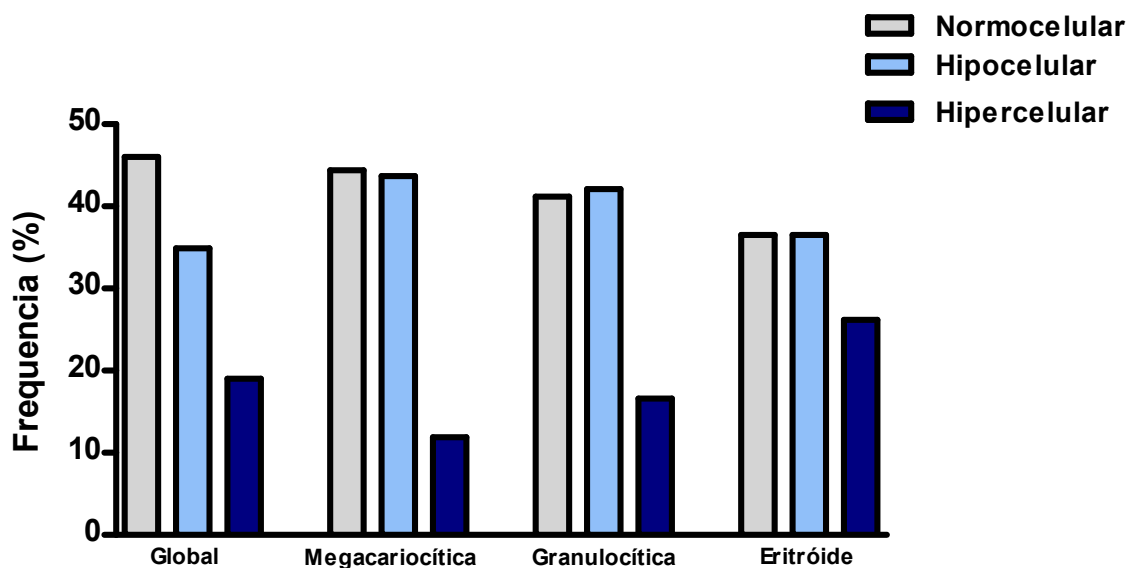
Escore	Nº	%
0	44	35,0
1	31	24,6
2	21	16,6
3	11	9,0
4	9	7,1
5	6	4,7
6	2	1,5
7	2	1,5

#### 5.5 Caracterização dos achados citomorfológicos da medula óssea

A análise da medula revelou alterações em relação a celularidade, a morfologia celular e uma carga parasitária variável.

### 5.5.1 Celularidade da medula óssea

A análise da celularidade evidenciou alterações nas linhagens hematopoéticas em 68 pacientes (54%). O predomínio foi da hipocelularidade, mais marcante nas linhagens granulocítica em 53 (42%) pacientes e megacariocítica em 55 (44%) pacientes enquanto que a hipocelularidade eritróide foi encontrada em 47 (37%) indivíduos. A hiperplasia esteve presente na linhagem granulocítica em 21 (17%), na megacariocítica em 15 (12%), sendo mais proeminente na linhagem eritróide em 32 (26%) com uma inversão da relação M/E que variou de 0,2/1,0 a 0,9/1,0 em 12 (10%) pacientes (Figura 4).



**Figura 4** - Distribuição em percentual da celularidade medular e das linhagens hematopoéticas dos 126 pacientes com LV, Ceará, 2001 - 2010.

### 5.5.2 Alterações citomorfológicas da medula óssea

A frequência das alterações citomorfológicas encontradas no aspirado medular dos 126 pacientes estão expressas na Tabela 5.

As alterações displásticas na linhagem eritróide, foram observadas em 102 (80,9) pacientes, com predomínio de multinuclearidade, falhas de hemoglobinizacão, *blebs* citoplasmáticos, formas megaloblastóides e bizarras (Figura 5).

As alterações displásticas na linhagem granulocítica, presentes em 60 pacientes (47,6%), foi representada por assincronismo maturativo núcleo-citoplasma, disgranulações (hipogranularidade e/ou distribuição heterogênea), formas imaturas bizarras, atípicas ou aberrantes (Figura 6A) e formas pelgeróides (hipossegmentação, hipogranulação) (Figura 6B).

Na linhagem megacariocítica foi evidenciado dismegacariopose em 69 pacientes (54,7%), com presença de elementos hipersegmentados, bilobulados, monolobulados e micromegacariócitos (Figura 7).

Corpos citoplasmáticos (Figura 8) foram encontrados em 48 pacientes (38,1%), alguns contendo formas amastigotas, outros granulares ou agranulares. Plasmocitose (média 6%) foi observada em 69 pacientes (54,7%). Presença de atipias nas células plasmáticas, caracterizada por inclusões citoplasmáticas (célula de Mott), em 9 (7,14%) (Figura 9). Em um paciente com LV e mieloma múltiplo o percentual de células plasmáticas foi 18%, sendo observado plasmoblastos e atipias mais acentuadas decorrentes da neoplasia (Figura 10).

A eosinofilia medular esteve presente em 4 pacientes (3,1%). Um aumento de eosinófilos (18%) foi observado em um paciente com estrogiloidíase. Linfocitose superior a 20% ocorreu em 12 pacientes (9,5%).

Granuloma (Figura 11) esteve presente no aspirado medular de 28 (22,2%) pacientes e em um caso foi observado a presença de células gigantes (Figura 12).

Hemofagocitose (Figura 13) foi observada em 38 pacientes (30,1%), em número variável.

**Tabela 5** - Distribuição das alterações citomorfológicas observadas na medula óssea de 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 - 2010.

Alterações citomorfológicas		Nº	%
Diseritropoese	>10%	12	9,5
	<10%	90	71,4
Disgranulopoese	>10%	2	1,5
	<10%	58	46,0
Dismegacariopoese	>10%	10	7,9
	<10%	59	46,8
Plasmócitos	>2%	69	54,7
Macrófagos parasitados		66	52,3
Corpos citoplasmáticos		48	38,1
Hemofagocitose		38	30,1
Granuloma		28	22,2
Linfócitos	>20%	12	9,5
Eosinofilia	>6%	4	3,1

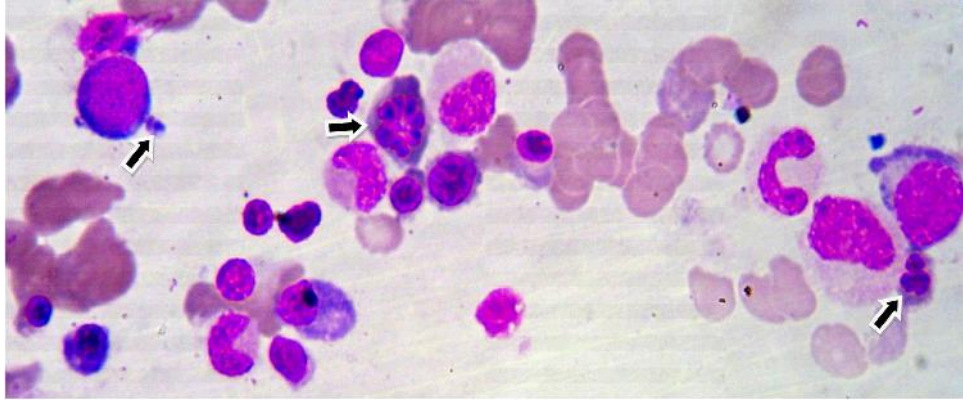


Figura 5 - Eritroblastos displásticos e rouleaux em aspirado de medula óssea (May - Grunwald-Giemsa, x1000).

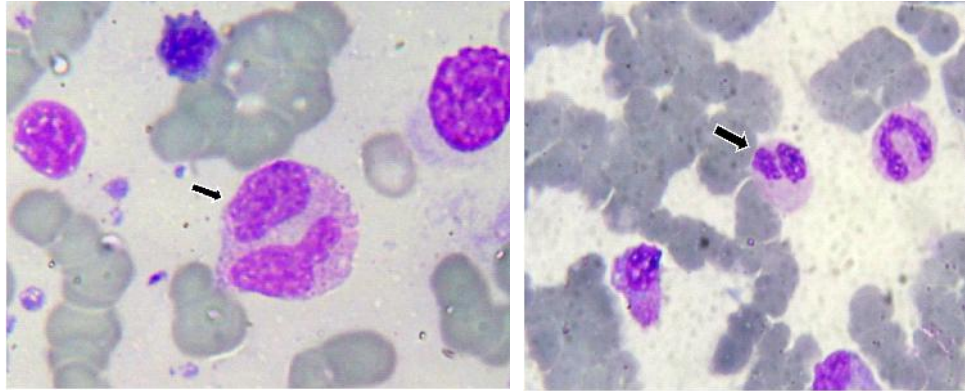


Figura 6 - Células da linhagem granulocítica displásticas em aspirado de medula óssea . A- Granulócito aberrante; B Forma pelgeróide. (May-Grunwald-Giemsa, x1000).

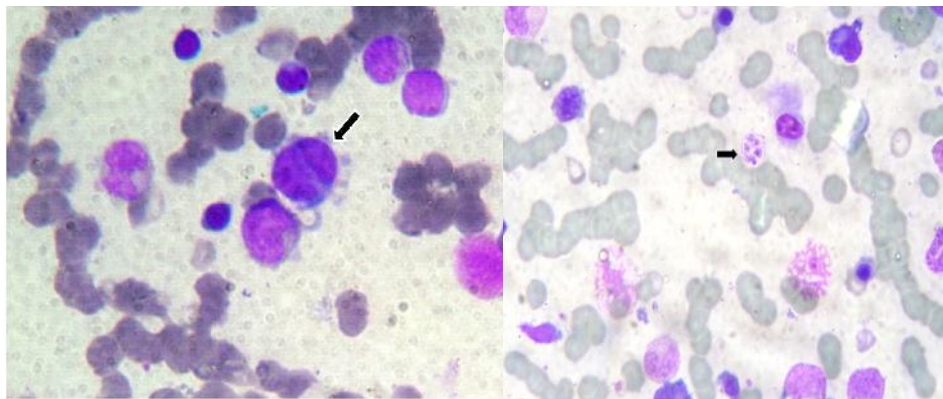


Figura 7 - Micromegacariócitos em aspirado de medula óssea (May-Grunwald-Giemsa, x1000).

Figura 8 - Corpo citoplasmático em aspirado de medula óssea, contendo amastigotas (May-Grunwald-Giemsa, x40)

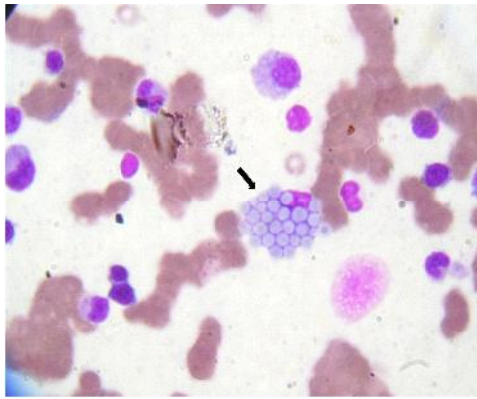


Figura 9 - Célula de Mott em aspirado de medula óssea, (May -Grunwald-Giemsa, x40)



Figura 10 - Célula plasmática atípica em aspirado de medula óssea (May -Grunwald-Giemsa,x1000)

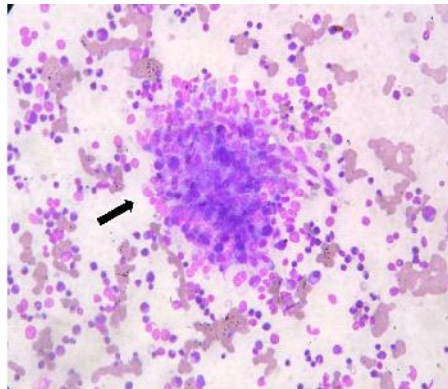


Figura 11 - Granuloma em aspirado de medula óssea,(May -Grunwald-Giemsa, x40)

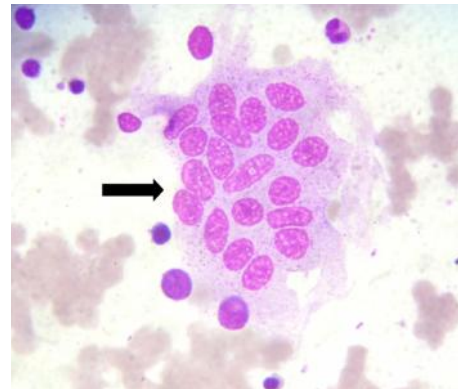


Figura 12 - Célula gigante em aspirado de medula óssea,(May-Grunwald-Giemsa, x 1000)

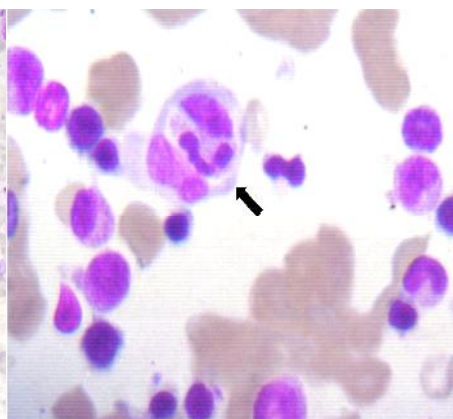
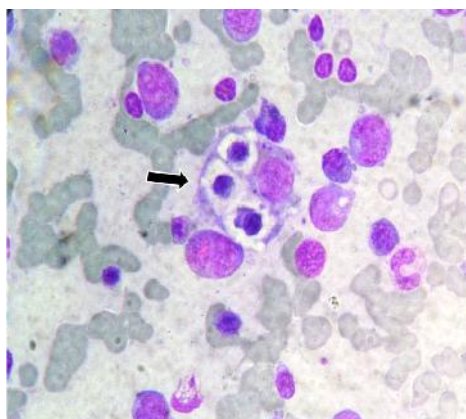


Figura 13 - Hemofagocitose em aspirado de medula óssea, (May-Grunwald-Giemsa, x 1000)

### 5.5.3 Parasitismo medular

Dentre os 126 aspirados de medula óssea dos pacientes estudados, 120 (95%) apresentaram formas amastigotas de leishmanias. A confirmação do diagnóstico de LV nos 6 pacientes restantes foi feita através do teste sorológico com antígeno rK39. As formas amastigotas de leishmania estavam presentes intra e extracelular (Figura 14). Os parasitas intracelulares se apresentavam fagocitados por macrófagos e em apenas um caso por neutrófilo.

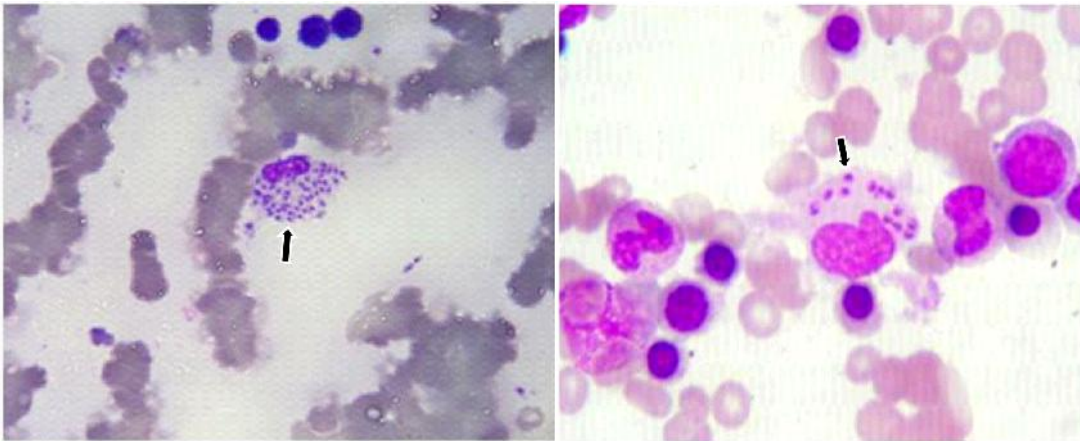


Figura 14 - Formas amastigotas extra e intracelular, parasitando macrófagos, em aspirado de medula óssea, (May-Grunwald-Giemsa, x1000)

Considerando a quantificação da carga parasitária no aspirado da medula óssea, a frequência dos pacientes com baixo parasitismo foi 54 (43%) e moderado/alto correspondeu a 72 (57%), (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição do parasitismo observado na medula óssea de 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001-2010.

<b>Parasitismo</b>	<b>Nº</b>	<b>%</b>
Parasitismo baixo	54	43
Parasitismo moderado/alto	72	57

## 5.6 Associação das alterações morfológicas com a carga parasitária no aspirado da medula óssea

Na tentativa de avaliar o impacto do parasitismo na própria MO, foram realizadas associações da carga parasitária com os achados citomorfológicos. Em relação à celularidade e às alterações displásticas, não houve associação estatisticamente significativa. Dos pacientes que apresentaram diseritropoese mais acentuada (> 10%), 80 (64%) apresentaram uma carga parasitária baixa ( $p=0,36$ ), (Figura 15). Não houve associação estatisticamente significativa entre a presença de granuloma e a carga parasitária. Verificou-se associação positiva entre a carga parasitária e a hemofagocitose ( $p=0,05$ ), (Figura 16) (Tabela 7).

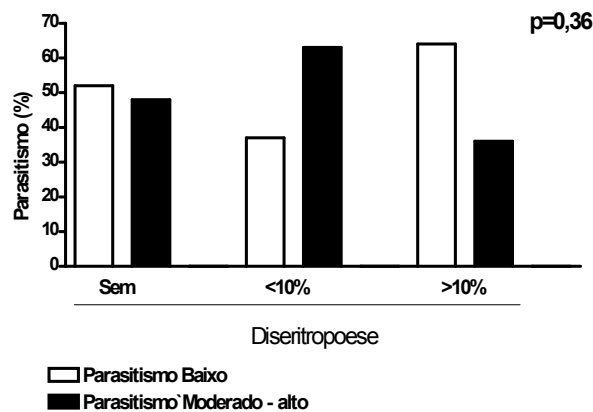


Figura 15 – Distribuição da carga parasitária de pacientes portadores de LV, em relação à diseritropoese. Ceará, 2001 – 2010.

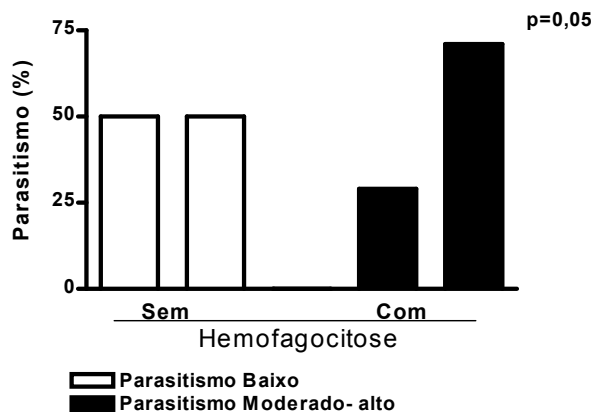


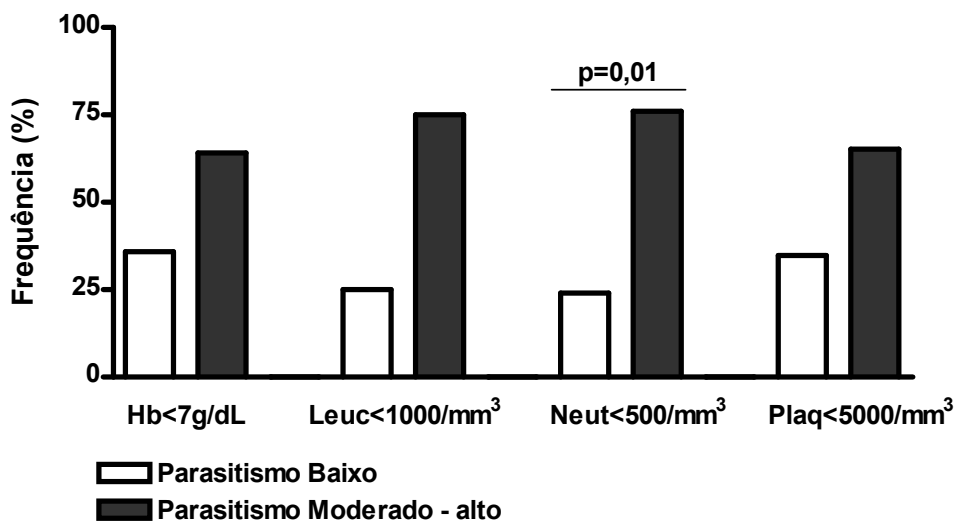
Figura 16 – Distribuição da carga parasitária de pacientes portadores de LV, em relação à hemofagocitose. Ceará, 2001 – 2010.

Tabela 7 - Associações das Alterações Citomorfológicas com a Carga Parasitária da Medula Óssea de 126 Pacientes Portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.

Alterações Citomorfológicas	Carga Parasitária						p
	Baixa		Moderada/ Alta		Total		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<b><u>Celularidade</u></b>							
Normo	22	38	36	62	58	100	
Hiper	10	42	14	58	24	100	0,47
Hipo	22	50	22	50	44	100	
<b><u>Diseritropoese</u></b>							
Ausente	13	52	12	48	25	100	
<10%	34	37	56	63	90	100	0,36
>10%	7	64	4	36	11	100	
<b><u>Disgranulopoese</u></b>							
Ausente	27	41	39	59	66	100	
<10%	26	45	32	55	58	100	0,71
>10%	1	50	1	50	2	100	
<b><u>Dismegacariopoese</u></b>							
Ausente	20	35	37	65	57	100	
<10%	28	47	31	53	59	100	0,14
>10%	6	60	4	40	10	100	
<b><u>Granuloma</u></b>							
Ausente	45	46	53	54	98	100	
Presente	9	32	19	68	28	100	0,20
<b><u>Hemofagocitose</u></b>							
Ausente	43	50	45	50	88	100	
Presente	11	29	27	71	38	100	0,04

### 5.7 Associação da carga parasitária da medula óssea com as alterações do sangue periférico

Na investigação das associações entre o parasitismo medular e o quadro hematológico periférico foram realizadas análises envolvendo o grau de parasitismo da MO e os seguintes variáveis: Hb <7g/dL; leucócitos <1000/mm<sup>3</sup>; neutrófilos <500/mm<sup>3</sup>; plaquetas < 50.000/mm<sup>3</sup>. Houve uma associação da carga parasitária com a neutropenia, 76% dos pacientes com neutropenia grave (neutrófilos <500/mm<sup>3</sup>) apresentaram carga parasitária moderada a alta (p=0,01), (Figura 17).



**Figura 17** - Associação das alterações do sangue periférico consideradas como critérios de risco de óbito com a carga parasitária em 126 pacientes com LV, Ceará, 2001 – 2010.

### 5.8 Associação comorbidades e carga parasitária da medula óssea

Na Figura 18 está representada a associação das comorbidades com a carga parasitária. Houve uma tendência da carga parasitária moderada/alta para os pacientes com comorbidades, mas a associação não foi estatisticamente significativa (p=0,07).

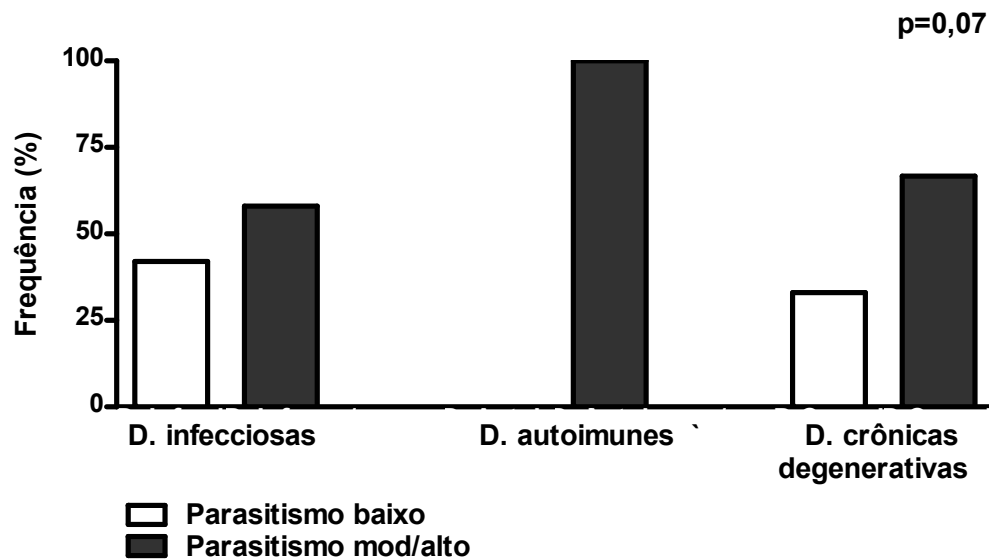


Figura 18 – Distribuição das comorbidades em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.

Quando foi comparada a carga parasitária dos pacientes com LV coinfectados com HIV com os que não tinham coinfeção, foi verificado que não houve uma associação estatisticamente significativa entre estas duas variáveis (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação da carga parasitária em pacientes com LV coinfectados com HIV, Ceará, 2001 - 2010.

Carga parasitária	Leishmaniose		Leishmaniose/ HIV		p*
	Nº	%	Nº	%	
Baixa	12	70,6	5	38,4	1,0
Moderada/alta	23	74,2	8	65,6	
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>13</b>	<b>100</b>	

### 5.9 Associação das alterações da MO e a carga parasitária com a gravidade da doença

Não houve uma associação estatisticamente significativa entre a carga parasitária e os riscos de óbito ( $p=0,83$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 - Associação da carga parasitária com a gravidade em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.

Risco de óbito	Carga Parasitária				p*
	Baixa		Moderada/ Alta		
Escores	Nº	%	Nº	%	
<3	42	43,2	54	56,3	0,83
≥3	12	40,0	18	60,0	

Em relação à celularidade da MO, não houve associação estatisticamente significativa entre as celularidades das diversas linhagens com os escores de risco de óbito. ( $p=0,27$ ). (Tabela 10).

Tabela 10 - Associação da celularidade do aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.

Risco de óbito	Celularidade						p*
	Normo		Hiper		Hipo		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<3	41	42,7	21	21,9	34	35,4	0,27
≥3	17	56,7	3	10,0	10	33,3	

A presença de granuloma no aspirado medular foi mais frequente nos pacientes que apresentaram escore de risco de óbito <3, sendo uma associação estatisticamente significativa ( $p=0,02$ ), (Tabela 11).

Tabela 11 - Associação da presença de granuloma no aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.

Risco de óbito	Granuloma				p*
	Não		Sim		
	Nº	%	Nº	%	
<3	70	72,9	26	27,1	0,02
≥3	28	93,3	2	6,7	

Foi observada uma alta freqüência de diseritropese (86,7%) nos pacientes com risco de óbito alto, bem como nos pacientes que apresentaram escore <3, (78,1%). Não houve associação significativa entre a diseritropese e risco de óbito (Tabela 12).

Tabela 12 - Associação da diseritropese no aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010.

Risco de óbito	Diseritropese				p*
	Não		Sim		
Escore	Nº	%	Nº	%	
<3	21	21,9	75	78,1	0,43
≥3	4	13,3	26	86,7	

A disgranulopose foi observada em 53,3% dos pacientes com risco de óbito alto (Tabela 13).

Tabela 13 - Associação da disgranulopose no aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010

Risco de óbito	Disgranulopose				p*
	Não		Sim		
Escores	Nº	%	Nº	%	
<3	52	54,2	44	45,8	0,53
≥3	14	46,7	16	53,3	

Não houve associação da dismegacariopose com o risco de óbito (Tabela 14).

Tabela 14 - Associação da dismegacariopose no aspirado da medula óssea com risco de óbito em 126 pacientes portadores de LV, Ceará, 2001 – 2010

Risco de óbito	Dismegacariopose				p*
	Não		Sim		
Escores	Nº	%	Nº	%	
<3	42	43,8	54	53,6	0,67
≥3	15	50,0	15	50,0	

## 6 DISCUSSÃO

A LV é causada pelo parasita *Leishmania donovani*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum*, um protozoário intracelular obrigatório, que fagocita as células do SFM, sendo a MO um dos órgãos mais afetados.

Os achados citomorfológicos da MO na LV, tem sido raramente descritos na literatura. Nesse estudo, foi realizado uma análise das alterações morfológicas do aspirado medular de pacientes com LV e correlação desses achados com a gravidade da doença utilizando fatores preditores de mau prognóstico, os riscos de óbito.

O estudo do perfil epidemiológico revelou uma maior frequência de LV em Fortaleza, 68,2% de casos. A urbanização da LV está bem documentada na literatura (TORRES; BRANDÃO, 2006; GONÇALVES, 2010). Estudos em outra áreas do Brasil tem demonstrado a mudança da distribuição geográfica da LV (ALBUQUERQUE *et al.*, 2009; TORRES; BRANDÃO, 2006). A mudança do perfil epidemiológico da doença está intimamente relacionada ao processo migratório do campo para as grandes cidades. A presença dos flebótomos e a circulação de cães infectados, oriundos das áreas endêmicas, propiciaram a adaptação do parasito ao novo nicho ecológico (GONTIJO; MELO, 2004).

Os resultados apresentados no presente estudo com relação ao sexo dos pacientes demonstraram uma maior predominância do gênero masculino (74%) como apontado na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2006 ; SILVA *et al.*, 2001).

Analisando a frequência quanto à idade dos pacientes, foi verificado que o maior número de casos da doença foi encontrado na população com idade entre 21 a 59 anos (n=75). No Brasil, a LV clássica acomete pessoas de todas as idades, mas na maior parte das áreas endêmicas, 80% dos casos registrados, ocorrem em crianças com menos de 10 anos. Silva *et al.* (2001) num estudo em Belo Horizonte relataram uma segunda maior prevalência no grupo de 15 a 29 anos. Em focos urbanos existe uma tendência de modificação na distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas também no grupo de adultos jovens (GONTIJO; MELO, 2004; SILVA *et al.*, 2001).

No Brasil, as manifestações clínicas mais comuns da LV em crianças e adultos, não diferem das que têm sido observadas em outros países (CALDAS *et al.*, 2006). Febre, hepatoesplenomegalia e citopenias isoladas ou combinadas estiveram

presentes na quase totalidade dos pacientes estudados. Gomes (1986) estudou 133 casos de LV em Fortaleza, em maiores de 18 anos e descreveu anemia em todos os pacientes. Esses mesmos achados são descritos na literatura, em crianças e adultos e podem ser explicados pela hemólise, eritropoese ineficaz, hiperesplenismo, hipoplasia medular e ou hemofagocitose (UZAIR *et al.*, 2004; SINGH *et al.*, 1999; SARKER *et al.*, 2003; PITOMBEIRA; MARTINS, 1975).

As alterações bioquímicas detectadas no presente estudo se mostraram em consonância com a literatura (PASTORINO *et al.*, 2002; BADARÓ *et al.*, 1986).

Entre os pacientes estudados, 40 (31,7%) apresentaram comorbidades, sendo a mais frequente a coinfeção pelo HIV, hanseníase e infecções respiratórias, seguidas das doenças crônicas degenerativas e doenças autoimunes. Alguns estudos têm descrito a associação da LV com LES, transplantados renais e doenças neoplásicas hematológicas (FERNÁNDEZ-GUERRERO *et al.*, 1987; BERENGUER, *et al.*, 1998) em decorrência da terapia imunossupressora. A LV nos últimos anos vem aumentando como coinfeção em pessoas infectadas com o HIV (CHOI; LERNER, 2001; MARQUES *et al.*, 2007). A leishmânia e o vírus HIV parasitam macrófago e a presença dos dois microorganismos na mesma célula tem sido implicado na disseminação e manifestação de ambas as doenças (SOUZA, 2007).

Na presente casuística, chamou a atenção, um paciente que tinha como comorbidade, linfoma de Hodgkin em remissão, que foi a óbito em decorrência da LV refratária ao tratamento e outro com mieloma múltiplo, que foi a óbito por sepsis.

Fatores relacionados com a gravidade e risco de óbito foram avaliados em quatro estudos na África (ABDELMOULA *et al.*, 2003; COLLIN *et al.*, 2004; SEAMAN *et al.*, 1996; MULLER *et al.*, 2009). No Brasil, Werneck *et al.* (2003), em estudo de caso-controle em Teresina-PI, mencionaram como determinantes de maior gravidade: icterícia, hematócrito menor de 20 %, febre por tempo superior a 60 dias e diarreia. Rey *et al.* (2005), em estudo retrospectivo de 1995-2002, em crianças, realizado em Fortaleza-CE, relataram a letalidade associada a faixa etária com maior incidência em pacientes menores de um ano. Desnutrição moderada a grave como outro fator importante, esteve presente em 13,2% dos pacientes. Icterícia, hemorragia e edema foram os achados clínicos mais evidentes. Segundo Cavalcante (2007) em estudo para determinar os fatores preditivos de prognóstico em crianças e adolescentes portadores de LV, verificou que as variáveis

associadas à evolução desfavorável foram idade inferior 12 meses, co-infecções e desnutrição.

Segundo Costa (2009) é muito difícil definir gravidade em LV, e este tem sido um fator limitante das recomendações nacionais para a redução da letalidade. A autora avaliou uma coorte de 883 pacientes e observou que, aplicando as recomendações do Ministério da Saúde, 99,9% dos pacientes seriam classificados como graves. Os critérios usados pelo Ministério da Saúde para definir o paciente grave, publicado em 2005, foram baseados em poucas evidências científicas, muito abrangentes e com elevada sensibilidade e baixa especificidade (MS, 2005). Isso levou à necessidade de se estudar o prognóstico em pacientes com LV utilizando o sistema de escores.

Os estudos de prognóstico têm identificado com consistência algumas variáveis como sangramento, infecção, icterícia, co-infecção HIV/AIDS, mas não existe uma definição plenamente adequada. No estudo de Costa (2009) o modelo de prognóstico baseado em escores de risco de óbito foi composto por variáveis clínicas, (idade, sangramentos, coinfeção AIDS, edema, vômitos, icterícia, dispnéia e infecção) e variáveis laboratoriais (leucócitos  $<1500/\text{mm}^3$ , plaquetas  $<50000/\text{mm}^3$  AST ou ALT  $> 100$  UK/L e insuficiência renal). Os fatores de risco para o óbito em lactentes foram, em geral, semelhantes aos fatores nas demais faixas etárias.

No presente estudo, dos 126 pacientes avaliados, 60 (47,6%) foram classificados como graves, quando aplicadas recomendações do Ministério da Saúde. Esta diferença pode ser explicada pelo fato do estudo ter sido realizado com dados retrospectivos que não tinham um protocolo unificado, e com alguns dados sem informações, o que limita a classificação dos pacientes. Baseado neste fato se utilizou o sistema de escores segundo Sampaio *et al.* (2010), por conter menos variáveis, o que conseqüentemente diminuiria esta limitação do presente estudo. Como resultado, foi encontrado 30 (23,8%) pacientes classificados como alto risco de óbito. A mortalidade na nossa casuística correspondeu a 4,8%, o que corresponderia a 20% do grupo classificado como alto risco de óbito. No entanto, quando se avaliou o escore de cada paciente que foi a óbito, verificou-se que dos seis pacientes, cinco deles foram classificados como sendo de baixo risco, com escore menor que 3. Duas possibilidades merecem ser consideradas: uma seria decorrente da limitação dos dados coletados neste trabalho e outra apontaria no sentido de que este estudo de escores de prognóstico pode não ter validade externa

para pacientes do Ceará.

A confirmação de LV pode ser feita pela demonstração do parasita no material obtido de baço, fígado, medula óssea ou linfonodos. Os exames parasitológicos são considerados métodos de referência no diagnóstico da LV, embora pressuponham procedimentos invasivos, requeiram pessoal técnico experiente, sejam laboriosos e não apresentem sensibilidade ideal. A sensibilidade da pesquisa direta em esfregaços em lâmina varia de 95 a 98% para o aspirado de baço, 76 a 91% para o de fígado, 52 a 89% para o de medula óssea e 52 a 69% para o de linfonodos (ZIJLSTRA *et al.*, 1992; SILVA, 2005). Neste estudo, a positividade na pesquisa direta em esfregaço foi de 95% dos aspirados medulares, sendo uma detecção maior que a descrita na literatura.

Em relação aos achados citomorfológicos da MO, 97,0% dos pacientes, apresentavam alterações celulares quantitativas ou qualitativas. Foi observado uma normocelularidade em 58 (46%) pacientes apesar do aspirado medular não ser o melhor método para se determinar a celularidade. Dependendo do volume aspirado, a amostra pode ser diluída com sangue dos sinusoides e assim não refletir a verdadeira celularidade medular (BAIN; WICKRAMASINGHE, 1986). Na LV pode ocorrer uma mielofibrose (ROCHA FILHO *et al.*, 2000), o que dificultaria aspirar o material medular levando a uma hipocelularidade. A hiper celularidade, presente em 19% dos casos, pode ser explicada pela ação das leishmanias nos macrófagos do estroma medular, levando a aumento da produção de GM-CSF e TNF-alpha que estimularia a hematopoese (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000).

Daneshbod, Dehghani e Daneshbod (2010) descreveram os achados do aspirado medular de 204 casos de LV, classificando-os em três grupos: achados comuns - presença de granuloma, plasmócitos, eosinofilia, corpos citoplasmáticos, hiperplasia eritroide; achado incomuns - presença de formas amastigotas em células não histiocitárias, hemofagocitose, células plasmáticas com inclusões cristalinas, blastos leucêmicos e necrose; e achados atípicos - formas regulares e irregulares de amastigotas agregadas, pseudo-Pelger Huet, fibroblastos, *tart cells*, *foamy cells* e células gigantes. Na presente casuística foram observados vários destes achados, com predomínio das alterações displásticas e plasmocitose.

Relatos de casos de LV que simulam mielodisplasia têm sido descritos na literatura (YARALI *et al.*, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2008; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987). Níveis elevados de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

podem causar mielodisplasia trilinear não clonal em pacientes com LV (YARALI *et al.*, 2002). No presente estudo foram observadas alterações displásticas na MO da maioria dos pacientes, predominando a diseritropoese, encontrada em 80% dos casos. A eritropoese na LV já foi descrita como ineficaz e morfológicamente displástica (BAIN, 2010).

Pinheiro *et al.* (2008) relataram o caso de um paciente com diagnóstico de LV por detecção de leishmanias no aspirado medular após um ano de diagnóstico de síndrome mielodisplásica (SMD). É importante, portanto, que em áreas endêmicas seja considerado o diagnóstico de LV nos pacientes com pancitopenia e displasia medular.

A hemofagocitose, observada em 30% dos aspirados estudados, está correlacionada com a formação de anticorpos que opsoniza as células hematopoéticas causando a fagocitose destas células e assemelha-se com um grupo heterogêneo de doenças que incluem o lúpus eritematoso sistêmico e infecções por microorganismos (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010). Pode resultar em pancitopenia, febre, disfunção neurológica e coagulação vascular disseminada (CIVD), constituindo a síndrome hemofagocítica, uma complicação da LV (DHINGRA *et al.*, 2010).

Vários autores têm descrito a formação de granuloma na medula óssea de pacientes com LV (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010; DHINGRA *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2007). A presença de granuloma foi observada em 22% dos casos estudados. Os granulomas são agregados de histiócitos cercados por linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, organizados de forma nodular com contornos nítidos. Células gigantes multinucleadas, substância colagenosa e fibrose também podem estar presentes. Essas lesões podem ocorrer em associação com condições inflamatórias crônicas, incluindo infecções (fúngica, viral, bacteriana e parasitária), doença autoimune, hipersensibilidade a drogas e algumas doenças malignas (RILEY *et al.*, 2009).

Corpos citoplasmáticos livres, presentes em 38% dos casos estudados, são relatados como um critério de diagnóstico morfológico da LV. São definidos como restos de citoplasmas de células mieloides ou monocíticas formados pelo dano celular (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010; SHAHRIAR *et al.*, 1999). Segundo Daneshbod, Deghani e Daneshbod (2010) esses corpos

citoplasmáticos livres podem ser granulares, agranulares ou conter amastigotas, como foi ilustrado na Figura 11.

Cotterell, Engwerda e Kaye (2000), estudando os mecanismos envolvidos na ação da *Leishmania donovani* na mielopoese, demonstraram, pela primeira vez, que o parasitismo intracelular na população de células do estroma medular pode modificar diretamente a capacidade dessas células de regular a hematopoese. Associando-se o parasitismo com as alterações do sangue periférico, os achados citomorfológicos da medula óssea e os riscos de óbito, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a carga parasitária e neutropenia grave ( $p=0,04$ ), e entre carga parasitária e hemofagocitose ( $p=0,05$ ).

Com relação a carga parasitária em pacientes com a coinfeção pelo HIV, era de se esperar que houvesse um aumento significativo do parasitismo nestes pacientes (ALVAR *et al.*, 2008). No entanto, nesse trabalho, apesar de ter observado uma tendência para apresentarem uma carga parasitária moderada/alta, esta associação não foi estatisticamente significativa, talvez devido ao tamanho da amostra.

Houve uma relação entre o alto risco de óbito e o grau de parasitismo, 60% dos pacientes escore de risco  $\geq 3$  apresentaram carga parasitária moderada/alta. Esses achados reforçam o impacto do parasitismo sobre a hematopoese e a gravidade da doença.

Sheikha (2004), estudando diseritropoese em 105 pacientes com LV, observou uma correlação inversa da parasitemia medular com a diseritropoese, o que foi compatível com os dados observados no presente trabalho. Dos pacientes que apresentavam diseritropoese acentuada, 63,3% tinham carga parasitária baixa. Portanto, quando a diseritropoese é uma característica proeminente, é recomendado exame microscópico minucioso para a detecção de formas amastigotas de leishmanias nos casos suspeitos de LV.

Entre os achados da medula óssea observados, a presença de granuloma foi o único que apresentou uma associação estatisticamente significativa quando analisado com os escores de risco de óbito ( $p=0,02$ ). É descrito na literatura que o granuloma está relacionado a uma carga parasitária baixa o que pode dificultar a detecção do parasita (DHINGRA *et al.*, 2010). Foi observado que dos pacientes que apresentavam granuloma, 92% tinham escore de risco de óbito  $<3$ . Como o controle da infecção por leishmania é mediada por resposta imune celular e como o

granuloma representa uma expressão dessa resposta (SHARMA, 2006, STANLEY,2007) pode-se explicar a maior frequência desse achado nos pacientes com baixo risco de óbito.

Esse estudo traz importantes informações sobre as características da medula óssea, o parasitismo medular e os fatores associados à gravidade da LV, que poderão ser de utilidade na definição de recomendações para o diagnóstico e tratamento do paciente com LV.

## 7 CONCLUSÕES

- Na LV, os achados citomorfológicos da medula óssea mais freqüentes foram: displasia das três linhagens hematopoéticas com predomínio da diseritropoese, além da presença de hemofagocitose e granuloma.

- O parasitismo da medula é freqüente, sendo detectado em 95% dos casos, e a intensidade da carga parasitária foi heterogênea.

- Foi observado uma associação positiva entre a carga parasitária com hemofagocitose da medula óssea.

- Foi encontrada uma associação negativa entre a carga parasitária da medula óssea com diseritropoese medular e com os neutrófilos do sangue periférico.

- Não houve associações estatisticamente significantes das alterações da medula óssea e as comorbidades.

- Não houve uma associação entre o risco de óbito alto com a carga parasitária maior, e as dispoeses na medula óssea.

- Foi observada uma associação entre o risco de óbito baixo com a presença de granuloma.

## REFERÊNCIAS

ABDELMOULA, M. S.; M'HAMDI, Z.; AMRI, F.; TEBIB, N.; BEN TURKIA, H.; BEN DRIDI, M. F. Visceral leishmaniasis in children: prognostic factors. **Tunis. Med.**, v. 81, n. 8, p. 545-549, 2003.

ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; SILVA JÚNIOR, G. B.; FREIRE, C. C. F. ; OLIVEIRA, S. B. C.; ALMEIDA, D. M.; SILVA, H. F.; CAVALCANTE, M. S.; SOUSA, A. Q. Urbanization of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Fortaleza, Ceará, Brasil. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 26, n. 4, p. 330-333, 2009.

ALVAR, J.; CANĂVATE, C.; GUTIÉRREZ-SOLAR, B.; JIMÉNEZ, M.; LAGUNA, F.; LOPOES-VÉLEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. Leishmania and human Immunodeficiency vírus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 2, p. 298- 319, 1997.

ALVAR, J.; APARÍCIO, P.; ASEFFA, A.; BOER, M. D.; CANĂVATE, C.; DEDET, P. J.; GRADONI, L.; HORST, T. R.; LOPOES-VÉLEZ, R. L.; MORENO, J. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.

AZEVEDO, M. R. A. de. Hematopoese. In: \_\_\_\_\_. **Hematologia básica: fisiopatologia estudo e estudo laboratorial**. São Paulo: Luana, 2008. p. 49-63.

BADARÓ, R; DUARTE, MIS. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. (Eds). **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 1561-1590.

BADARÓ, R.; JONES, J. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S.G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA R, JOHNSON WD JR. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 154, n. 6, p. 1003-1011, 1986.

BAIN, B. J. Dyserythropoieses in visceral leishmaniasis. **Am. J. Hematol.**, v. 85, p.781, 2010.

BAIN, B. J. Morfologia das células sanguíneas. In: \_\_\_\_\_. **Células sanguíneas: um guia prático**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 52-139.

BAIN, B. J.; WICKRAMASINGHE, S. N. Pathology of the bone marrow: general considerations. In: WICKRAMASINGHE, S. N. (Ed.). **Blood and bone marrow**. New York: Churchill Livingstone, 1986. p. 73-105.

BARANWAL, A. K.; MANDAL, R. N.; SING, R. Fulminant hepatic failure complicate visceral leishmaniasis in an apparently imunocompetent child. **Indian J. Pediatr**, v. 74, n. 5, p. 489-491, 2007.

BARBOSA, W. Leishmaniose visceral. In: MEIRA, D. A. **Clínica de doenças tropicais e infecciosas**. Rio de Janeiro: Interlivros, 1991. p. 351-356.

BARRAL-NETO, M.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Human\_Leishmaniasis@cytokines.bahia.br. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 149-155, 1998.

BERENGUER, J.; GOMÉZ-CAMPDERÁ, F.; PADILHA, B.; RODRIGUEZ-FERRERO, M.; ANAYANA, F.; SANTIAGO, M.; VALDERRÁBANO, F. Visceral Leishmaniasis (Kala-azar) in transplant recipients. **Transplantation**, v. 65, n. 10, p. 1401-1404, 1998.

BHATTACHARYA, S. K.; SUR, D.; KARBWANG, J. Childhood visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 353-356, 2006.

CALDAS, A. J. M. ; COSTA, J.; AQUINO, D.; SILVA, A. A. M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis? **Acta Trop.**, v. 97, n. 3, p. 252-258, 2006.

CANELA, J.R.; ALVES, C.J. M.A.; RODRIGUES, G. C. Perfil diagnóstico de leishmaniose visceral em pacientes adultos admitidos no Hospital Universitário Clemente Faria. **Unimontes Científica**, v. 6, n. 2, p. 107-111, 2004.

CAVALCANTE, M. H. L. **LV americana**: aspectos clínico e laboratoriais preditivos de prognóstico. 2007. Dissertação (Mestrado Profissional em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2007.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA). **Inf. Epidemiol. Leishmaniose Visceral**. 29 de junho de 2009.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, v. 6, n. 3, p. 175-182, 2001.

COLLIN, S.; DAVIDSON, R.; RITMEIJER, K.; KEUS, K.; MELAKU, Y.; KIPNGETICH, S.; DAVIES, C. Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 5, p. 612-619, 2004.

COSTA, L. D. **Fatores de pronóstico na Leishmaniose Visceral: alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte.** 2009. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde). Programa de Pós graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

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

DANESHBOD, Y.; DEGHANI, S. J.; DANESHBOD, K. Bone marrow aspiration findings in kala-azar. **Acta Cytol.**, v. 54, n. 1, p.12-24, 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DIEBOLD, J.; MOLINA, T.; CAMILLERI-BROËT, S.; LE TOURNEAU, A.; AUDOUIN, J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases. **Histopathology**, v. 37, n. 3, p. 199-211, 2000.

DHINGRA, K.K.; GUPTA, P.; SAROHA, V.; SETIA, N.; KHURANA, N.; SINGH, T. Morphological findings in bone marrow biopsy and aspirate smears of visceral kala-azar: A review. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v. 53, p. 96-100, 2010.

FARHAT, C.K.; CARVALHO, L. H. F. R.; SUCCI, R. C. M. Leishmaniose visceral – calazar. In: SCHETTINI, S. T.; SUCCI, R. C. M.; FARHAT, C. K.; CARVALHO, L. H. F. R. **Infectologia pediátrica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2007. p. 891-899.

FERNÁNDEZ-GUERRERO, M. L.; AGUADO, J. M.; BUZÓN, L.; BARROS, C.; MONTALBÁN C.; MARTIN, T. *et al.* Visceral leishmaniasis in immunocompromised host. **Am. J. Med.**, v. 83, n. 6, p. 1098-1102, 1987.

FOUCAR, K. Bone marrow manifestation of systemic infections pathology. In: \_\_\_\_\_. **Bone marrow pathology**. 2. ed. Chicago: ASCP Press, 2001. cap. 28, p. 617-638.

FOUCAR, K. Hematopoieses and morphologic review of bone marrow. In: \_\_\_\_\_. **Bone marrow pathology**. 2. ed. Chicago: ASCP Press, 2001. cap. 1, p. 1-29.

GENARO, O. Leishmaniose visceral. In: NEVES, O. P.; MELO, A.L.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 8. ed. São Paulo: Atheneu.1991. p. 55-72.

GOMES, F. V. B. A. FF. **Calazar - Estudo hematológico em maiores de 18 anos**. 1986. Monografia (Especialização em Hematologia e Hemoterapia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1986.

GONÇALVES, R. P. **Epidemia de leishmaniose visceral americana em Fortaleza: dinâmica espacial e temporal**. 2010. Dissertação (Mestrado em Patologia). Curso de Pósgraduação em Patologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, n. 3, p. 338-347, 2004.

KHOSHDEL, A.; ALBORZI, A.; ROSOULI, M.; TAHERI, E.; KIANY, S.; JAVADIAN, M. H. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- in patients with visceral leishmaniasis. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 13, N. 1, p. 44-46, 2009.

KUMAR, P.V.; VASEI, M.; SADEGHIPOUR, A; SADEHI, E.; SOLEIMANPOUR, H.; MOUSAVI, A.; TABATABAEI, A. H.; RIZVI, M. M. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 29, n. 2, p. 77-80, 2007.

MALLA, N.; MAHAJAN, R. C. Pathophysiology of visceral leishmaniasis – some recent concepts. **Indian J. Med. Res.**, v. 23, n. 3, p. 267-274, 2006.

MARQUES, N. S.; CABRAL, R. S. A.; COELHO, F.; OLIVEIRA, J.; SARAIVA DA CUNHA, J. G.; MELIÇO-SILVESTRE, A. Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana. **Acta Med. Port.**, v. 20, p. 291-298, 2007.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral Americana. In: NEVES, D. P.; MELO, A.L.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.184-193.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília, 2005. p. 22.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e conduta**. Brasília, 2006.

\_\_\_\_\_. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Áreas com transmissão de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasi**. Estratificação de LV segundo município de residência e média de casos de 2007 a 2009. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1\\_areas\\_transmissao\\_lv\\_07\\_10\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/1_areas_transmissao_lv_07_10_10.pdf). Acesso em: 04 fev 2010.

MULLER, Y.; MBULAMBERI, D. B.; ODERMATT, P.; HOFFMANN, A.; LOUTAN, L.; CHAPPUIS, F. Risk factors for in-hospital mortality of visceral leishmaniasis patients in eastern Uganda. **Trop. Med. Int. Health**, v. 14, n. 8, p. 910-917, 2009.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 82, p. 249-267, 2001.

NAEIM, F. Bone marrow structure and function. In: \_\_\_\_\_. **Pathology of bone marrow**. New York: Igaku-Shoin, 1992. p.1-31.

NIERO-MELO, L.; RESENDE, L. S. R.; GAIOLLA, R. D.; OLIVEIRA, .C. T.; DOMINGUES, M. A. C.; MORAES NETO, F. A. Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 3, p. 167-174, 2006.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu; 2005.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol.**, v. 28, n. 9, p. 378-384, 2007.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M.M.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; SANCHES, M.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 5, p. 446-450, 2006.

PARAPIA, L. A. Trepanning or trephines: a history of bone marrow Biopsy. **Br. J. Haematol.**, v. 139, n. 1, p. 14-19, 2007.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; SAMPAIO, M. M. C. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **J. Pediatr.**, v. 78, p.120-127, 2002.

PEARSON, R. D.; SOUZA, A. Q. Leishmania species: visceral (Kala-azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: MANDEL, G. L.; DOUGLAS, R. G.; BENETT, J. B (Eds.). **Principles and practice of infectious diseases**. 4. ed. New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 2428-2442.

PINHEIRO, R. F.; PEREIRA, V. C.; BARROSO, F.; RIBEIRO NETO, C. C. Kala-azar: a possible misdiagnosis of myelodysplastic syndrome in endemic areas. **Leuk. Res.**, v. 32, p. 1776-1790, 2008.

PITOMBEIRA, M. S.; MARTINS, J. M. Estudo cromossômico no calazar. **Rev. Med. Univ. Fed. Ceará**, v. 15, p. 11-14, 1975.

REGO, E. M. Hematopoese. Regulação e microambiente. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 16-21.

REY, L. C.; MARTINS, C. V. RIBEIRO, H. B.; LIMA, A. A. M. Leishmaniose visceral Americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. **J. Pediatr.**, v. 81, n. 1, p. 73-78, 2005.

RILEY, S. R.; WILLIAMS, D.; ROSS, M.; ZHAO, S.; CHESNEY, A.; CLARK, B. D.; BEN-EZRA, J. M.; Bone Marrow Aspirate and Biopsy: A Pathologist's Perspective. II. Interpretation of the Bone Marrow Aspirate and Biopsy. **J. Clin. Labor. Anal.**, v. 23, p. 259-307, 2009.

ROCHA FILHO, F. D.; FERREIRA, F. V. A.; MENDES, F. O.; FERREIRA, F. N. H.; KARBAGE, A.; ALENCAR, M.; COSTA, D. Fibrose da medula óssea (pseudo mielofibrose) em pacientes com calazar. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, n. 4, p.363-366, 2000.

SAMPAIO, M. J. A. Q.; CAVALCANTI, N. V.; ALVES, J. G.; FERNANDES FILHO, M. J. C.; CORREIA, J.B. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 11, p. e877, 2010.

SARKER, C. B.; CHOWDHURY, K. S.; SIDDIQUI, N. I.; JAMAL, M. F.; RAHMAN, S.; MOMEN, A.; DHAR, D. K.; ALAM, K. S. Clinical profile of Kala-azar in adults: as seen in Mymensingh Medical College Hospital, Bangladesh. **Mymensingh Med. J.**, v. 12, n. 1, p. 41-44, 2003.

SCHALLING, H.D.F.H.; OSKAM, L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. **Trop. Med. Int. Health**, v. 7, p. 641-645, 2002.

SEAMAN, J.; MERCER, A. J., SONDORP, H. E., HERWALD, B. L. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and limited resources. **Ann. Intern. Med.**, v. 124, p. 664-672, 1996.

SHAHRIAR, D.; REZA, M. P. A.; REZA, A. M. M.; FARAMARZ, S. Cytological clues of bone marrow findings in Kala-Azar. **Diag. Cytopathol.**, v. 20, n. 4, p. 208-209, 1999.

SHARMA, S. K.; DUBE, A.; NADEEM, A.; KHAN, S.; SALEEM, I.; GARG, R.; MOHAMMAD, O. Non PC liposome entrapped promastigote antigens elicit parasite specific CD8+ AND CD4+ T-cell immune response and protect hamsters against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 24, p. 1800-1810, 2006.

SHEIKHA, A. Diserythropoieses in 105 patients with visceral leishmaniasis. **Lab. Hematol.**, v. 10, n. 4, p. 206-211, 2004.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O. P.; BRASIL, R. P. Visceral Leishmaniasis in the Metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 285-291, 2001.

SILVA, M. R. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N.; Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.72, n. 6, p. 811-814, 2005.

SINGH, K.; SINGH, R.; PARIJA, S. C.; FARIDI, M. M.; BHATTA, N. Clinical and laboratory study of kala-azar in children in Nepal. **J. Trp. Pediatr.** v. 45, p. 95-97, 1999.

SOUZA, F. G. **Comparação de aspectos clínicos e diagnósticos da leishmaniose visceral em portadores e não portadores do vírus da imunodeficiência humana.** 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, p. 138-147, 2007.

STAUBER, L. A. Leishmaniasis in the hamster. In: COLE, W.H. (Ed.). **Some physiological aspects and consequence of parasitism.** New Brunswick, NJ:

Rutgers Univ. Press, 1955. p. 77-90.

TORRES, F. T.; BRANDÃO, F. S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151-156, 2006.

UZAIR, M.; KHAN, S. J.; MUNIB, S.; RAHEEM, F.; SHAH, S. H. Visceral leishmaniasis (kala azar): presentation: diagnosis and response to therapy (an experience of ten cases in adults). **Gomal J. Med. Sci.**, v. 2, n. 1, p. 9-12, 2004.

WERNECK, G. L.; BATISTA, M. S. A.; GOMES, J. R. B.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection**, v. 31, n. 3, p. 174-177, 2003.

WICKRAMASINGHE, S. N.; ABDALLA, S. H.; KASILI, E. G. Ultrastructure of bone marrow in patients with visceral leishmaniasis. **J. Clin. Pathol.**, v. 40, p. 267-275, 1987.

WILLIAMS, W. J.; NELSON, D. A. Examination of the bone marrow. In: WILLIAMS, W. J.; BEUTTLER, E.; ERSLEV, A. J. et al (Eds.). **Hematology**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 24.

YARALI, N.; FISGIN, T., DURU, F.; KARA, A. Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. **Am. J. Hematol.**, v. 71, n. 3, p. 191-195, 2002.

ZAGO, M. A. Eritropoese e eritropoetina: produção e destruição de hemácias. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu, 2005. p. 23-31.

ZIJLSTRA, E. E.; SIDDIG, A. M.; EL-HASSAN, A. M.; EL-TOUM, I. A.; SATTI, M.; GHALIB, H. W.; KAGER, P. A. Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test I diagnosis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 505-507, 1992.

ZIJLSTRA, E. E.; MUSA, A.M.; KHALIL, E. A.; HASSAN, I.M.; HASSAN, I. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003.

ZIJLSTRA, E. E.; ALI, M. S., EL-HASSAN, A. M.; Kala-Azar in displaced people from southern Sudan: Epidemiological, clinical and therapeutic findings. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 365-369, 1991.

**APÊNDICE A**  
**FICHA DE SEGUIMENTO CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA**

DATA DE PREENCHIMENTO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ N° DE REGISTRO \_\_\_\_\_

**1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:**

Nome: \_\_\_\_\_

Data do nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Local do nascimento: \_\_\_\_\_

Sexo: (M) (F) Cor: \_\_\_\_\_ Trabalha: ( ) Sim ( ) Não Ocupação \_\_\_\_\_

Data do início dos sintomas: \_\_\_\_\_

Procedência: \_\_\_\_\_

Residência atual: \_\_\_\_\_

Tempo de moradia: \_\_\_\_\_ Residência(s) anterior(es): ( ) Sim ( ) Não

Telefone para contato: \_\_\_\_\_

**2. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA:**

Localização do domicílio: ( ) Área Urbana ( ) Área Rural

**3. DADOS MÉDICOS DO PACIENTE:**

Data do diagnóstico de LV: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Onde foi realizado o diagnóstico de LV: \_\_\_\_\_

Paciente em tratamento: ( ) Sim ( ) Não

Terapêutica atual: \_\_\_\_\_

Data do início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data do término: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**4. EXAME FÍSICO:**

Esplenomegalia:	( ) Sim ( ) Não
Hepatomegalia:	( ) Sim ( ) Não
Febre:	( ) Sim ( ) Não
Palidez:	( ) Sim ( ) Não
Anemia:	( ) Sim ( ) Não
Perda de peso:	( ) Sim ( ) Não
Dor abdominal:	( ) Sim ( ) Não
Tosse:	( ) Sim ( ) Não
Edema:	( ) Sim ( ) Não
Linfadenomegalia:	( ) Sim ( ) Não

Anorexia:	( )Sim ( ) Não
Epistaxe:	( )Sim ( ) Não

## 5. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL:

### a) Exame para pesquisa do parasita:

Punção de medula óssea: ( )Sim ( ) Não

Data da realização: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Celularidade: \_\_\_\_\_

Diseritropoese: ( )Sim ( ) Não

Qual: \_\_\_\_\_

Disgranulopese: ( )Sim ( ) Não

Qual: \_\_\_\_\_

Dismegacariopese: ( )Sim ( ) Não

Qual: \_\_\_\_\_

Macrófagos parasitados: ( )Sim ( ) Não

Hemofagocitose: ( )Sim ( ) Não

% de Plasmócitos: \_\_\_\_\_ Grau de parasitismo: \_\_\_\_\_

### b) Hemograma:

Hb \_\_\_\_\_ VCM \_\_\_\_\_ Leucócitos \_\_\_\_\_ Plaquetas \_\_\_\_\_

### c) Exames bioquímicos:

Albumina: \_\_\_\_\_; Creatinina \_\_\_\_\_; ALT: \_\_\_\_\_; AST: \_\_\_\_\_;

TAP: \_\_\_\_\_.

### d) Exames imunológicos:

Foi realizado testes imunológicos: ( )Sim ( ) Não

IFI / Data \_\_\_\_\_

ELISA / Data \_\_\_\_\_

K39 ( )Sim ( ) Não Positivo ( )Sim ( ) Não

## ANEXO A

## VALORES DE REFERÊNCIA CONTAGEM DIFERENCIAL DA MEDULA ÓSSEA

CÉLULAS	IDADE	
	0 - 18 MESES	ADULTO
Mieloblasto	-	1.5 - 5.0
Promielócito	0.1 - 1.7	3.5 - 8.0
Série neutrofílica		
Mielócito	1.0 - 4.0	10.0 - 19.0
Metamielócito	8.5 - 16.0	26.0 - 32.0
Bastão	20.0 - 30.0	16.0 - 30.0
Segmentado	2.5 - 10.5	15.0 - 30.0
Série eosinofílica	1.0 - 3.0	2.0 - 6.0
Série basofílica	0.1 - 0.2	0.8 - 1.0
Série monocítica	0.5 - 3.5	2.0 - 6.0
Proeritroblasto	0.1 - 0.2	0.8 - 1.0
Eritroblasto		
Basófilo	0.5 - 0.8	2.5 - 6.0
Policromatófilo	7.0 - 10.0	11.0 - 25.0
Ortocromático	0.1 - 0.5	5.0 - 20.0
Megacariócito	0.05 - 0.1	0.3 - 2.0
Linfócito	15.0 - 40.0	10.0 - 20.0
Plasmócito	0.05 - 0.08	0.5 - 2.0
Relação M:E	4.4-4.8:1	3.0-3.5:1

WILLIAMS; NELSON, 1990