

**SUELEN CASTILHO**

**LEISHMANIOSE VISCERAL EM MATO GROSSO DO SUL:  
AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA E PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL**

**CAMPO GRANDE  
2010**

**SUELEN CASTILHO**

**LEISHMANIOSE VISCERAL EM MATO GROSSO DO SUL:  
AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA E PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL**

Dissertação apresentada como exigência para a obtenção do título de mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul “Dr. Hélio Mandetta”.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval

**CAMPO GRANDE  
2010**



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

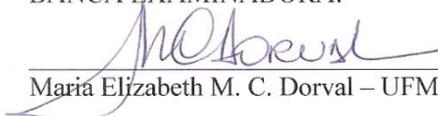
**Programa de Pós Graduação em  
Doenças Infecciosas e Parasitárias**



## TERMO DE APROVAÇÃO

A dissertação intitulada: “LEISHMANIOSE VISCERAL EM MATO GROSSO DO SUL: AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA E PERFIL CLÍNICO-LABORATORIAL”, como exigência para a obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias, na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, obteve aprovação.

BANCA EXAMINADORA:

  
\_\_\_\_\_  
Maria Elizabeth M. C. Dorval – UFMS

  
\_\_\_\_\_  
Lorena Lobo Figueiredo Pontes – FMRP/USP

  
\_\_\_\_\_  
Elenir Rose Jardim Cury Pontes-UFMS

Campo Grande, 05 de agosto de 2010.

*Aos meus pais, instrumentos de Deus que me deram o dom da Vida,  
Maria Luiza, a melhor mãe do mundo  
e Valdemir (Biliu), meu paizinho preferido!  
A distância não os impediu de se fazerem presentes,  
confortando-me com apoio e palavras de carinho.  
Meu reconhecimento a vocês que não pouparam esforços para a minha educação e  
principalmente para a minha felicidade.  
Amo vocês!*

*À minha família, os grandes amores da minha vida:  
meus avós, Malvina e Onilpho, Eduarda e Manoel (in memoriam);  
meus irmãos, Lílian, Cleomir e Manoel;  
meus sobrinhos, Letícia, Ana Clara, Guilherme e Ricardo; e meus tios que sempre  
me incentivaram com tanto amor e carinho.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, “inteligência suprema e causa primária de todas as coisas”. Pela sua infinita bondade, concedendo benefícios em todos os momentos da minha vida. Eu seria ingrata se os atribuísse ao acaso ou ao meu próprio mérito. Aos Espíritos Protetores, pela inspiração de bons pensamentos e proteção constantes. Muito obrigada por mais essa conquista!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval, minha querida orientadora por quem tenho imensa admiração e respeito. Orgulho-me em dizer que sou orientada da “Prof<sup>a</sup>. Beth”, pois além de ser reconhecida pelo seu profissionalismo tive o prazer de ter uma grande amiga por perto. Muito obrigada pela confiança, quando aceitou me orientar; pela paciência e ensinamentos, durante a realização desse trabalho; e pela amizade desde os tempos de faculdade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Cepa Matos pelo apoio constante, sua participação foi imprescindível desde o início até a conclusão desse projeto. Muito obrigada por ter me concedido parte do seu precioso tempo!

Aos acadêmicos do curso de Medicina Marcel Arakaki Asato, Mariana Lima Mascarenhas Moreira e Vinícius de Souza Siebert que contribuíram imensamente para a realização dessa pesquisa. Minhas desculpas pelas cobranças e meu reconhecimento pelo esforço de vocês. Muito obrigada!

À Dr<sup>a</sup>. Lorena Lôbo de Figueiredo Pontes, pela gentil recepção em seu laboratório e preciosa colaboração na construção desse trabalho.

Aos hematologistas do Hospital Universitário Msc. Éveny Cristine Luna de Oliveira e Luis Henrique M. Mascarenhas, pela cooperação quando solicitados para dirimir as dúvidas durante a pesquisa.

Ao Dr. José Maria Nossa Ascenço, ao amigo Eduardo Onoda e a toda equipe do Laboratório de Análises Clínicas Multilab, pela solicitude, paciência e ensinamentos proporcionados.

Ao Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elenir Rose Jardim Cury Pontes, pela presteza na realização das análises estatísticas e revisão desse trabalho. Muito obrigada pela colaboração.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sonia Maria Oliveira de Andrade, pelas orientações sempre que foi solicitada.

À Msc. Janaina Michelle de Oliveira, companhia divertida das horas de trabalho. Muito obrigada pelos auxílios oferecidos.

Aos amigos do laboratório de Parasitologia que sempre estavam por perto com uma palavra amiga ou um cuidado de mãe. À Elisa, Jucelei, D. Zélia, Geucira, Prof<sup>a</sup>. Alessandra, Prof<sup>a</sup>. Carla e Beatriz, muito obrigada!

Aos colegas de trabalho da UBS Jockey Club que sempre se dispuseram a contornar a minha ausência da melhor forma possível. À gerente Alice Sasaya, Cleidinha, Neusa, Leandra, Fátima e Fatiminha, Edilda, Vânia, Altair e ao grande amigo Dr. Duízio, meu muito obrigada pelo reconhecimento e incentivo. Também àqueles que permitiram o meu afastamento, Rita de Cássia, Aleyne e Dr. Luiz Henrique Mandetta.

Ao amigo Fernando Câmara, que me apoiou nos momentos de angústia e incerteza, me ajudando a superar as dificuldades.

Ao José Álvaro, mais do que companheiro da minha mãe, tornou-se um amigo, sempre com uma palavra serena. Sei que muitas vezes me auxiliou mesmo que indiretamente. Muito obrigada!

Por fim, nem por isso menos importantes, às minhas grandes amigas. Pois quando estamos distantes da família percebemos o valor daqueles que estão próximos. Muito obrigada a vocês que fazem parte da minha vida, minha família pelos laços de simpatia.

A Thaís, pela atenção de mãe, pelo companheirismo de todos os dias e pelos infinitos momentos de alegria.

A Silvana, por todo incentivo desde a época da seleção para ingresso no curso de pós-graduação. Se não fosse por você, hoje eu não estaria aqui.

À amiga Ada, pelo apoio constante e companheirismo desde os tempos de faculdade.

Às amigas Luciana, Renata, Cláudia, Gabriela, Keylla, Fabi...peço desculpas e agradeço pela compreensão durante as minhas ausências.

*"O sábio não se senta para lamentar-se, mas  
se põe alegremente em sua tarefa  
de consertar o dano feito."  
[William Shakespeare]*

*Pois...*

*"Saber e não fazer, ainda não é saber."  
[Provérbio Zen]*

## RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença grave que atinge crianças, adultos, pessoas imunodeprimidas e apresenta alta letalidade se não tratada. Um dos fatores para o desfecho fatal é o diagnóstico tardio. Visando contribuir para um diagnóstico ágil e preciso com consequente tratamento adequado, este trabalho teve como objetivo descrever as alterações mais frequentes na medula óssea de pacientes com LV que possam auxiliar no prognóstico e no diagnóstico parasitológico direto. Foram analisados retrospectivamente prontuários e lâminas de 202 pacientes atendidos pelo NHU/UFMS, diagnosticados pela microscopia e/ou cultura no laboratório de Parasitologia Humana da UFMS nos anos de 2003 a 2008. A maioria foi procedente de centros urbanos, sendo 75,4% deles da capital. As crianças responderam pelo maior número de casos (59,9%), principalmente menores de cinco anos, e não houve óbito entre elas. Entre os adultos predominou o sexo masculino (70,4%). Na admissão a febre foi apresentada por 92,6% dos pacientes; hepatomegalia e esplenomegalia estiveram presentes com alta frequência, principalmente entre as crianças; e o emagrecimento foi mais evidente entre os adultos. Laboratorialmente os pacientes apresentaram pancitopenia com acentuada anemia e inversão albumina/globulina em 60,3%. Comorbidades mais frequentes foram: pneumonia, disfunções hepáticas, HIV e etilismo. Houve discordância entre os métodos diagnósticos, evidenciada pelos resultados falso-negativos. A maior parte das lâminas apresentou celularidade insatisfatória (65,3%), relacionada com a ausência de espículas e/ou aglomerados celulares (59,4%) e, portanto, não pode ser atribuída à atividade da parasitose. Os megacariócitos estavam reduzidos em 65,3% das lâminas. Plasmocitose esteve presente em 63,9% dos casos, com eventual observação de células de Mott e plasmócitos flamejantes. *Rouleaux* presente em 84,7% das lâminas. Histiócitos aumentados (56,9%) e a presença de *tart-cell* e/ou hemofagocitose foram detectados em 45,0% dos casos, principalmente entre as crianças. Amastigotas foram vistas no interior de granulócitos, eritroblastos e plasmócito quando se verificou maior frequência de parasitas na lâmina. Eosinofilia foi detectada em 44,1% dos casos e grânulos mistos em 21,3%. Estruturas relacionadas à parasitose tais como expansões citoplasmáticas, restos celulares diversos e fragmentos de granulócitos foram visualizadas em 75,2%, 66,8% e 55,0% dos casos, respectivamente. Transformação gelatinosa da medula foi observada em 44,6%. Outras alterações constituem características de disritropose, mielodisplasia e/ou apoptose. Essas observações podem auxiliar no diagnóstico precoce e preciso, incentivando o examinador a uma pesquisa meticulosa de formas do parasita nos esfregaços, principalmente se apresentarem manifestações clínicas compatíveis e/ou o paciente for proveniente de área endêmica para a parasitose. Além disso, fica evidente a necessidade de otimizar a técnica de obtenção do aspirado de medula óssea a fim de melhorar a qualidade da amostra e consequentemente a sensibilidade dos métodos, permitindo instituição de terapia adequada.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, mielograma, alterações celulares

## ABSTRACT

*Visceral leishmaniasis is a severe disease affecting children, adults, immunocompromised people, with a high lethality rate if untreated. One of the reasons for the fatal outcome is late diagnosis. In order to contribute to an accurate and quick diagnosis and a consequent suitable treatment, this paper describes the most frequent alterations in the bone marrow of VL patients that may help in the prognosis and direct parasitological diagnosis. Medical records and plates of 202 patients assisted by NHU/UFMS were retrospectively analyzed. These patients had been diagnosed by microscopy and/or culture in the UFMS Human Parasitology Laboratory from 2003 to 2008. Most of them came from urban areas; 76,0% from the capital city. Children, especially those under five, stood for most cases (59,9%); no death was reported among them. Males predominated (70,4%). On admission fever was reported in 92,6% of the patients; hepatomegaly and splenomegaly were reported frequently, especially among children; weight loss was more evident among adults. Laboratorial assays showed pancytopenia with enhanced anemia and albumin/globulin inversion in 60,3% of all patients. Comorbidities were more frequently seen among adults, especially pneumonia, liver malfunction, HIV and alcoholism. There was disagreement between the diagnostic methods, as evidenced by the false-negative results. Most plates presented unsatisfactory cellularity (65,3%), associated with the absence of marrow particles and/or cellular agglomerates (59,4%); therefore it may not be attributed to the parasite activity. Megakaryocytes were reduced in 65,3% of the films. Plasmacytosis was seen in 63,9% of the cases, with hazardous observation of Mott cells and flaming plasmocytes. Rouleaux was present in 84,7% of the films. Histiocytes enlarged in 56,9% and tart-cell and/or hemophagocytosis were detected in 45,0% of the cases, especially among children. Amastigotes occurred inside granulocytes, erythroblasts and plasmocyte when a large number of parasites was seen on the plate. Eosinophilia were detected in 44,1% of the cases and mixed granules in 21,3%. Structures related to the parasitosis, such as cytoplasmic expansions, diverse cellular debris and fragments of granulocytes were observed in 75,2%, 66,8% and 55,0% of the cases, respectively. Gelatinous marrow transformation was found in 44,6%. Other alterations are typical of dyserythropoiesis, myelodysplasia and/or apoptosis. These observations may help in early and accurate diagnosis, leading the examiner to perform a thorough study of parasite forms, especially if they present consistent clinical manifestations and/or if the patient comes from an endemic area for the parasitosis. Furthermore, there is an urgent need to optimize the technique to obtain the bone marrow aspirate and consequently improve the quality of sample and the sensibility of methods, allowing the management of a suitable therapy.*

*Key-words: Leishmania chagasi, bone marrow aspirate, cytological findings*

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a faixa etária, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	68
Tabela 2 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o sexo e o grupo etário, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	69
Tabela 3 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a procedência e o grupo etário, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	69
Tabela 4 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e os sinais e sintomas, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	70
Tabela 5 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e as comorbidades e condições associadas, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	71
Tabela 6 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença ou não de comorbidades e/ou condições associadas, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	72
Tabela 7 – Estatística descritiva do número de comorbidades em pacientes com leishmaniose visceral segundo o desfecho entre adultos, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	73
Tabela 8 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e as alterações hematológicas, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	73
Tabela 9 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e as alterações bioquímicas, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	74
Tabela 10 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o aumento da VHS e elevação das globulinas, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	74
Tabela 11 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e os métodos diagnósticos, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	75
Tabela 12 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de espículas e/ou aglomerados em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	76
Tabela 13 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a celularidade e a presença de espículas em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	76
Tabela 14 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de amastigotas e a presença de espículas em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	78
Tabela 15 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a frequência de amastigotas em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	79
Tabela 16 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de megacariócitos em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	79
Tabela 17 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral e plaquetopenia segundo o grupo etário e a frequência de megacariócitos em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	80
Tabela 18 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de plasmócitos e células de Mott em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	81

Tabela 19 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de plasmócitos em esfregaço de medula óssea e a globulinemia, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	81
Tabela 20 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de <i>rouleaux</i> em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	83
Tabela 21 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a elevação de proteínas totais e a presença de <i>rouleaux</i> em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	84
Tabela 22 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a globulinemia e a presença de <i>rouleaux</i> em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	84
Tabela 23 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de histiócitos em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	84
Tabela 24 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de <i>tart cell</i> e/ou hemofagocitose em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	86
Tabela 25 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a presença de <i>tart cell</i> e/ou hemofagocitose e a frequência de amastigotas em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	86
Tabela 26 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de amastigotas e a presença de polimormonucleares (PMN) parasitados em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008..	87
Tabela 27 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de amastigotas e a presença de eritroblastos ortocromáticos ou plasmócito parasitados em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	88
Tabela 28 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de eosinófilos e grânulos mistos em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	89
Tabela 29 – Distribuição de pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de eosinófilos no sangue periférico e no esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	90
Tabela 30 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de expansões citoplasmáticas ( <i>blebbing</i> ) em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	90
Tabela 31 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de fragmentos de granulócitos ( <i>granular stippling</i> ) em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	90
Tabela 32 – Distribuição de pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de restos celulares diversos ( <i>basophilic bare cell</i> ) em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	91
Tabela 33 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de transformação gelatinosa em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	92
Tabela 34 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a frequência das alterações na medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	94

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Valores de referência dos exames laboratoriais para crianças e adultos.....	64
Figura 2 – Valores de referência para a velocidade de hemossedimentação de acordo com sexo e idade.....	64
Figura 3 – Valores de referência para alguns tipos celulares na medula óssea de crianças e adultos.....	65
Figura 4 – Presença de espículas e celularidade em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	77
Figura 5 – Amastigotas em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	78
Figura 6 – Alterações displásicas na série megacariocítica em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.	80
Figura 7 – Plasmócitos, células de Mott e flamejantes em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	82
Figura 8 – <i>Rouleaux</i> em esfregaço de medula óssea de paciente com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	83
Figura 9 – Histiócitos, <i>tart-cell</i> e hemofagocitose em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	85
Figura 10 – Precursores de polimorfonucleares parasitados em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.	87
Figura 11 – Eritroblasto ortocromático e plasmócito parasitados em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	88
Figura 12 – Eosinofilia e granulação mista em eosinófilos em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.	89
Figura 13 – Expansões citoplasmáticas, restos celulares de granulócitos e de macrófagos em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	91
Figura 14 – Transformação gelatinosa em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	92
Figura 15 – Célula apoptótica em esfregaço de medula óssea de paciente com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	93
Figura 16 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo as alterações no esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008.....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{m}$	- Micrômetro
%	- Percentual
A/G	- Relação albumina/globulina
ALT	- Alanina aminotransferase
AMO	- Aspirado de medula óssea
AST	- Aspartato aminotransferase
BBC	- <i>Basophilic bare cell</i> = fragmentos celulares de células não granulocíticas
BFU-E	- <i>Burst forming unit-erythroid</i> = progenitor eritroide primitivo
BFU-Mk	- <i>Burst forming unit-megakaryocyte</i> = progenitor megacariocítico primitivo
BMO	- Biópsia de medula óssea
CD	- <i>Cluster of differentiation</i> = grupamento de diferenciação, marcador de superfície celular
CD34	- Marcador de superfície celular da célula-tronco hematopoética mais primitiva ( <i>stem cell</i> )
CD4	- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
CD8	- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos
CFU	- <i>Colony forming unit</i> = unidade formadora de colônia
DAT	- <i>Direct agglutination test</i> = teste de aglutinação direta
DC	- <i>Dendritic cell</i> = célula dendrítica
DPOC	- Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	- <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> = ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	- <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> = ensaio imunoenzimático
g/dL	- Gramas por decilitro
G-CSF	- <i>Granulocyte colony stimulating factor</i> = fator estimulante de colônia de granulócitos
GM-CSF	- <i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i> = fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
GS	- <i>Granular stippling</i> = fragmentos citoplasmáticos de granulócitos
Hb	- Hemoglobina
HIV	- <i>Human immunodeficiency virus</i> = vírus da imunodeficiência humana
Ht	- Hematócrito
HTLV	- <i>Human T-cell lymphotropic virus</i> = vírus linfotrópico de célula T humano
ICT	- <i>Immunochromatographic test</i> = teste imunocromatográfico ou teste rápido
IDR	- Intradermorreação de Montenegro
IFI	- Imunofluorescência indireta
IFN- $\gamma$	- Interferon $\gamma$
IgA	- Imunoglobulina da classe A
IgG	- Imunoglobulina da classe G
IgM	- Imunoglobulina da classe M
IL-2	- Interleucina 2
IL-3	- Interleucina 3
IL-4	- Interleucina 4
IL-5	- Interleucina 5
IL-10	- Interleucina 10
IL-12	- Interleucina 12
IRC	- Insuficiência renal crônica
kDNA	- DNA do cinetoplasto
LDPC	- Leishmaniose dérmica pós-calazar
LHH	- Linfocitose hemofagocítica
LPG	- Lipofosfolipiano
LT	- Leishmaniose tegumentar

LV	- Leishmaniose visceral
LVC	- Leishmaniose visceral canina
mg/dL	- Miligramas por decilitro
MO	- Medula óssea
mm/h	- Milímetro por hora
mm <sup>3</sup>	- Milímetro cúbico
MS	- Mato Grosso do Sul
NHU	- Núcleo do Hospital Universitário
NK	- células <i>natural killer</i>
NNN	- Nicole, Novy, McNeal = fase sólida de meio de cultura
OMS	- Organização Mundial de Saúde
OPAS	- Organização Pan-Americana de Saúde
PCR	- <i>Polymerase chain reaction</i> = reação em cadeia da polimerase
PMN	- Polimorfonucleares (granulócitos)
RGE	- Razão granulócitos/eritrócitos
RIFI	- Reação de imunofluorescência indireta
SAME	- Seção de arquivos médicos
SFM	- Sistema fagocítico mononuclear
SIDA	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
TGF- $\beta$	- <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i> = fator transformador de crescimento $\beta$
Th1	- Células T CD4 secretoras do padrão 1 de citocinas, resposta imunológica celular
Th2	- Células T CD4 secretoras do padrão 2 de citocinas, resposta imunológica humoral
TNF- $\alpha$	- <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> = fator de necrose tumoral $\alpha$
TRL	- Teste rápido anticorpo anti- <i>Leishmania</i>
VHS	- Velocidade de hemossedimentação
WHO	- World Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>2.1 Leishmanioses</b> .....	17
<b>2.2 Leishmaniose visceral</b> .....	20
<u>2.2.1 Aspectos clínicos</u> .....	24
<u>2.2.2 Aspectos laboratoriais</u> .....	29
<u>2.2.3 Aspectos imunológicos</u> .....	32
<u>2.2.4 Diagnóstico</u> .....	35
<u>2.2.5 Tratamento</u> .....	40
<b>2.3 Medula óssea</b> .....	42
<u>2.3.1 Medula óssea normal</u> .....	42
<u>2.3.2 Hematopoese</u> .....	44
<u>2.3.3 Análise da medula óssea</u> .....	50
<b>2.4 Medula óssea na leishmaniose visceral</b> .....	54
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	60
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	60
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	60
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	61
<b>4.1 Tipo de pesquisa</b> .....	61
<b>4.2 Local e período da pesquisa</b> .....	61
<b>4.3 Sujeitos da pesquisa</b> .....	61
<b>4.4 Aspectos éticos</b> .....	62
<b>4.5 Análise dos dados de prontuários</b> .....	62
<b>4.6 Análise das lâminas de medula óssea</b> .....	64
<b>4.7 Organização e análise dos dados</b> .....	67
<b>5 RESULTADOS</b> .....	68
<b>5.1 Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais</b> .....	68
<b>5.2 Dados referentes aos métodos diagnósticos</b> .....	75
<b>5.3 Avaliação da medula óssea</b> .....	75
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	96
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	111
<b>8 RECOMENDAÇÕES</b> .....	113
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	114
<b>ANEXO A</b> .....	135

## 1 INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são infecções causadas por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Esses parasitas são agentes de zoonoses que infectam eventualmente a espécie humana nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo, causando doenças do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM).

As formas clínicas descritas são a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT), podendo ainda serem classificadas como: Leishmaniose Cutânea, Leishmaniose Cutâneo-mucosa (ou Mucocutânea), Leishmaniose Cutânea Difusa e Leishmaniose Visceral. Suas formas de doença estão relacionadas à espécie do parasita e diferem em distribuição geográfica dos hospedeiros e vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade.

A LV é uma doença grave que atinge crianças, adultos, pessoas imunodeprimidas e, quando não tratada, apresenta alta letalidade. Caracteriza-se por produzir febre irregular e prolongada, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e, em sua fase terminal, caquexia. Seu agente etiológico pertence ao complexo "*Leishmania donovani*" e possui duas formas: flagelada ou promastigota, presente no tubo digestivo do inseto vetor; e outra aflagelada ou amastigota, encontrada nos tecidos dos vertebrados.

Para fins de diagnóstico, é essencial o encontro do parasita no material biológico analisado, que pode ser obtido por punção de vísceras. A forma amastigota é encontrada principalmente no baço, medula óssea, linfonodos, fígado e eventualmente no sangue, com o diagnóstico tradicionalmente baseado na observação direta do parasita pelo exame microscópico de amostras desses órgãos. Outros métodos incluem isolamento *in vitro* e testes sorológicos. O diagnóstico tardio tem sido considerado um dos principais fatores que contribuem para a alta letalidade. Aliado a isso, outra dificuldade no manejo da parasitose relaciona-se à ausência de um tratamento eficaz e seguro, uma vez que os medicamentos atualmente disponíveis são altamente tóxicos.

Em Mato Grosso do Sul a LV está em franca expansão e urbanização, sendo encontrada em grandes centros urbanos do estado, inclusive na capital. O processo de endemização com elevada incidência da doença no Estado é preocupante e incentiva pesquisas voltadas ao seu manejo e controle.

Em razão da ausência de estudos da medula óssea de pacientes com LV no Mato Grosso do Sul e da grande relevância das alterações hematológicas na progressão da parasitose, neste trabalho foram estudados os aspectos clínicos, laboratoriais e da medula óssea de indivíduos portadores de LV, tendo como principal desafio a conversão dos novos conhecimentos em ferramentas aplicáveis na rotina, a fim de otimizar o diagnóstico e possibilitar tratamento adequado e precoce em benefício do bem estar dos pacientes.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Leishmanioses

As leishmanioses são infecções causadas por espécies de protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (GRIMALDI; TESH, 1993) cujas primeiras observações ocorreram no fim do século XIX por vários estudiosos, sendo finalmente, o protozoário descrito e assim denominado por Ross em 1903 (REY, 2001a). Esses parasitas são agentes de zoonoses que infectam eventualmente a espécie humana nas regiões tropicais e subtropicais do Velho e do Novo Mundo, causando doenças do sistema fagocítico mononuclear – SFM (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989).

As leishmanioses permanecem como sério problema de saúde pública. São endêmicas em 88 países no mundo, dos quais 72 estão em desenvolvimento. Estima-se que 14 milhões de pessoas estejam infectadas e dois milhões de novos casos ocorram a cada ano. Provavelmente esses valores de prevalência são subestimados, uma vez que apenas em 33 países a notificação é compulsória, numerosos casos não são diagnosticados, especialmente quando os pacientes não têm acesso a atendimento médico para acompanhamento e tratamento ou são assintomáticos (DESJEUX, 2004; WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2006).

Pelo menos 20 espécies de *Leishmania* podem dar origem a um amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas auto-resolutivas até lesões mucosas desfigurantes e infecções viscerais fatais. De modo geral, são divididas em Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV), entretanto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divide e reconhece as leishmanioses em quatro grupos clínicos (DESJEUX, 2004; REY, 2001a):

- a) leishmaniose cutânea: produzem apenas lesões cutâneas, ulcerosas ou não;
- b) leishmaniose cutâneo-mucosa ou mucocutânea: evoluem causando lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe;
- c) leishmaniose cutânea difusa: apresentam-se de forma disseminada cutânea em indivíduos anérgicos (resposta imune celular deficiente); e

- d) leishmaniose visceral ou calazar: manifestação visceral da doença, atingindo baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides, devido ao tropismo dos parasitas pelo SFM desses órgãos.

Alguns autores citam, ainda, a existência de uma leishmaniose dérmica desenvolvida após a forma visceral. A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) é caracterizada por uma lesão macular, maculo-papular (lesão polimórfica) ou nodular e é uma complicação da LV frequentemente observada após o tratamento no Sudão e mais raramente em outros países da África Oriental e subcontinente da Índia (BEENA; RAMESH; MUKHERJEE, 2003; CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004).

Embora em todos os casos apresentem morfologia semelhante, por vezes até indistinguíveis, os parasitas isolados não são idênticos entre si. Suas apresentações clínicas estão relacionadas à espécie do parasita e diferem em distribuição geográfica dos hospedeiros e vetores envolvidos, taxas de incidência e de mortalidade (GONTIJO; MELO, 2004).

Em virtude da diversidade das características clínicas e epidemiológicas alguns autores usam a classificação em subgêneros, “complexos”, espécies e subespécies. Atualmente, aceita-se a classificação em dois subgêneros (LAINSON; SHAW, 1987), de acordo com o local de desenvolvimento no intestino do inseto vetor. O subgênero *Viannia*, entre outras características, não apresenta tropismo visceral, enquanto no subgênero *Leishmania* está incluído o complexo “*Leishmania donovani*”, que mostra alta tendência a invasão das vísceras (REY, 2001a).

As formas tegumentares no Brasil são determinadas por sete espécies, seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lansoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergi* e *L. (Leishmania) amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1987; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

A forma visceral é causada por espécies pertencentes ao complexo “*Leishmania donovani*” (LAINSON; SHAW, 1987) que está representado pelas espécies *L. (Leishmania) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*, esta última sendo considerada por alguns autores como sinônimo de *L. (L.) infantum* e que representa apenas parasitas que circulam nas Américas (MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000).

Esses protozoários são parasitas dimórficos: uma forma flagelada promastigota, encontrada no artrópode vetor e uma forma sem flagelo livre,

amastigota, que se desenvolve intracelularmente no mamífero hospedeiro (CHAPPUIS et al., 2007). As leishmanioses são transmitidas ao homem por mais de 30 diferentes espécies de flebotomíneos (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004), destacando-se os gêneros *Lutzomyia* nas Américas e *Phlebotomus* na África, Europa e Ásia (KILLICK-KENDRICK, 1990). Esses insetos são dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (KILLICK-KENDRICK, 1990) e somente as fêmeas transmitem o agente pela inoculação da forma promastigota na pele (DESJEUX, 2004; GUERIN et al., 2002).

No Brasil duas espécies estão relacionadas com a transmissão da LV, *Lutzomyia longipalpis*, principal espécie transmissora no país e *Lutzomyia cruzi*, incriminada como vetora nos estados de Mato Grosso do Sul (OLIVEIRA, A. G. et al., 2006; SANTOS et al., 1998; SILVA; ANDREOTTI; HONER, 2007) e recentemente no Mato Grosso (MAIA-ELKHOURY et al., 2008; MISSAWA; LIMA, 2006). Houve adaptação desse inseto para o ambiente rural e periferias de grandes centros podendo ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiro, canil, paiol, entre outros ambientes e também no intradomicílio.

O vetor é primeiramente infectado ao picar um animal ou homem com a doença, e no seu tubo digestivo o parasita se multiplica. Após 8 a 20 dias, o flebotomíneo fêmea pode transmitir pela picada a forma promastigota, que é a forma infectante, para o novo hospedeiro (DESJEUX, 2004; SACKS; KAMHAWI, 2001). Depois de fagocitadas pelas células do sistema macrofágico (células dendríticas e macrófagos da derme), as promastigotas diferenciam-se na forma amastigota com a perda do flagelo. As amastigotas se multiplicam e sobrevivem dentro dos vacúolos parasitóforos acidificados (fagolisossomas) através de uma complexa interação parasito-hospedeiro (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; BERMAN; DWYER; WYLER, 1979; BURCHMORE; BARRETT, 2001; CHAPPUIS et al., 2007).

Portanto, as promastigotas interagem com os indivíduos infectados muito brevemente sem causar manifestações clínicas, enquanto as amastigotas persistem em seus hospedeiros por anos ou por toda vida sendo responsáveis pelas manifestações da doença. Os macrófagos são as principais células hospedeiras para replicação da *Leishmania* e também as células efetoras para a destruição do parasita (CHAPPUIS et al., 2007; SOONG, 2008).

Subsequentemente à multiplicação, as amastigotas são disseminadas pelo sistema vascular e linfático e infectam outras células, resultando, no caso da LV, na infiltração da medula óssea, baço, fígado e linfonodos (CHAPPUIS et al., 2007). Embora os fatores determinantes do tropismo tissular do parasita permaneçam obscuros, as diversas formas da doença são atribuídas às espécies de *Leishmania* envolvidas e ao estado imunológico do hospedeiro, destacando o papel crítico das células dendríticas na imunidade protetora (SOONG, 2008).

## 2.2 Leishmaniose visceral

A LV é a forma mais grave das leishmanioses e é frequentemente letal se não tratada, podendo atingir adultos, crianças e imunocomprometidos (DESJEUX, 1999, 2004; REY, 2001b).

São causadoras dessa forma clínica espécies pertencentes ao complexo “*Leishmania donovani*” (LAINSON; SHAW, 1987) que está representado por:

*Leishmania (Leishmania) donovani*, responsável pelo calazar indiano nos países asiáticos (Índia, Paquistão, Bangladesh) e África Oriental, transmitida por vetores do gênero *Phlebotomus*;

*Leishmania (Leishmania) infantum*, presente em áreas do Mediterrâneo, África Oriental, Próximo Oriente, Norte da Ásia e da China, infectando principalmente crianças. É também transmitida por vetores do gênero *Phlebotomus* que se infectam ao picarem os cães de áreas endêmicas que funcionam como reservatório;

*Leishmania (Leishmania) chagasi* considerada como agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA) no Novo Mundo (BRASIL, 2006a) desde que foi descrita por Cunha e Chagas (1937). No entanto, isolados dessa espécie de diversas regiões do Brasil têm demonstrado considerável homogeneidade bioquímica e genética, bem como similaridade nas manifestações clínicas com a LV do Mediterrâneo, sugerindo tratar-se de espécie introduzida no continente americano durante o processo de colonização européia (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000). Além disso, pelo fato de não existir evidências de ocorrência de LV nas Américas antes da colonização, alguns autores propõem que *Leishmania chagasi* e *Leishmania infantum* devam ser consideradas como sinônimos (CHAPPUIS et al., 2007; DANTAS-TORRES, 2006; MAURÍCIO;

STOTHARD; MILES, 2000), com estudos mostrando uma adaptação ao ecossistema americano, em que o cão, o homem e flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* mantêm o ciclo parasitário (KILLICK-KENDRICK, 1990; MAURÍCIO; STOTHARD; MILES, 2000).

Há dois tipos de LV que diferem nas suas características de transmissão: LV zoonótica, transmitida de um animal para o vetor e desse para o homem, e LV antroponótica, transmitida do homem para o vetor e desse para outro homem suscetível (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004). No ambiente rural, humanos são hospedeiros ocasionais e os animais, principalmente os cães, são reservatórios do parasita. A LV zoonótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. infantum*, enquanto a LV antroponótica é encontrada em áreas de transmissão de *L. donovani* (CHAPPUIS et al., 2007).

A LDPC ocorre em indivíduos infectados por *L. donovani*. Esses casos são altamente infecciosos devido ao alto parasitismo das lesões cutâneas, portanto, funcionando como reservatórios para LV antroponótica entre ciclos epidêmicos. Assim, identificação e tratamento dos casos são importantes medidas de controle da parasitose principalmente na Índia (BEENA; RAMESH; MUKHERJEE, 2003; CHAPPUIS et al., 2007).

Estima-se a ocorrência de 500 mil novos casos de LV e mais de 50 mil mortes pela doença a cada ano, mortalidade que somente é superada, entre as doenças parasitárias, pela malária. A maioria (90%) dos casos ocorre em seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Etiópia e Brasil (DESJEUX, 2004).

A doença afeta principalmente comunidades pobres, geralmente em áreas rurais, sendo endêmica em países que estão entre os menos desenvolvidos do mundo, tal como Nepal, ou nas regiões mais pobres. Os pacientes e seus familiares tornam-se ainda mais pobres devido aos altos custos diretos com diagnóstico e tratamento, e indiretos pela redução da renda familiar durante a doença (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004).

Na América Latina a doença já foi descrita em pelo menos 12 países. O Brasil responde por 90% dos casos, que ocorriam principalmente na região Nordeste (BRASIL, 2006a).

Atualmente, é um crescente problema de saúde pública no Brasil e encontra-se em franca expansão geográfica, estando distribuída em 21 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009a) unidades federadas. O país tem registrado um aumento nos casos

de LV desde 1990, aproximadamente, 3.000 casos/ano, letalidade média de 8% (BRASIL, 2008) e com mudanças no seu padrão de transmissão. Com a expansão da doença para as regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste, houve redução da participação do Nordeste no número de casos (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Enquanto a forma rural persiste, a doença está surgindo na forma urbana em centros como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros (BRASIL, 2006a).

O Estado de Mato Grosso do Sul (MS) teve os primeiros relatos da doença a partir de 1980 em Corumbá e Ladário (REGO et al., 1983). Na capital, Campo Grande, o primeiro caso autóctone canino foi registrado em 1998 (SILVA et al., 2000), e os primeiros casos humanos em 2002 (FURLAN, 2010). O processo de endemização da doença com elevada incidência em Campo Grande (BOTELHO; NATAL, 2009) e Três Lagoas (OLIVEIRA, A. L. L. et al., 2006) confirmam sua expansão e urbanização. O Estado é o oitavo do país com o maior registro de casos e apresenta letalidade média de 8,6%, sendo que a LV já foi registrada em 56 dos seus municípios (MATO GROSSO DO SUL, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b).

O incremento no número de casos de LV se deve à migração da população das áreas rurais para as periferias de grandes centros urbanos, criando áreas densamente povoadas com precárias condições socioeconômicas, mínimo de infraestrutura e saneamento, que é associado à falta de medidas de controle e à coinfeção com vírus causador da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (CHAPPUIS et al., 2007; GONTIJO; MELO, 2004; WHO, 2006). Outros fatores apontados são: desmatamento, novos esquemas de irrigação e fatores individuais como genética e deficiência nutricional (DESJEUX, 2004). Neste contexto, o parasita recém introduzido encontra um grande número de hospedeiros não imunes, muitas vezes mal nutridos, aumentando o risco de infecção (GUERIN et al., 2002).

Segundo o Ministério da Saúde, a doença é mais prevalente em crianças menores de 10 anos que respondem por 54,4% dos casos, ocorrendo principalmente entre aqueles que têm até cinco anos (BRASIL, 2006a). Em alguns focos urbanos há uma tendência de modificação da distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas em adultos jovens (SILVA et al., 2001).

O caráter oportunista do parasita se manifesta principalmente nos casos de coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), quando apresenta um comportamento diferente que se reflete, sobretudo, na resposta irregular ao tratamento e alteração do padrão na evolução da doença (ALVAR et al., 1997; DESJEUX, 1999; SIRVENT-VON BUELTZINGSLOEWEN et al., 2004). Especialmente em áreas urbanas do Brasil, o crescente número de casos de coinfeção *Leishmania*/HIV tem levado ao aparecimento de uma nova forma de transmissão pelo compartilhamento de agulhas contaminadas (ciclo antroponótico artificial) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Aliado a isso, os cães (*Canis familiaris*) habitualmente mantidos no ambiente doméstico são considerados a principal fonte de infecção para o flebotomíneo na área urbana, sendo importantes na manutenção da doença (BRASIL, 2006a; WHO, 2006). Em estudos realizados por Deane e Deane (1954, 1955a, 1955b, 1962), foi observado intenso parasitismo cutâneo em cães e raposas do Ceará indicando esses animais como importantes reservatórios no ciclo doméstico da LV.

Embora não possam ser considerados como reservatórios, os suínos também desempenham um importante papel na atração e manutenção do inseto vetor no peridomicílio. Uma vez que os flebotomíneos são atraídos, esses animais podem estar envolvidos na epidemiologia de LV urbana e periurbana (GALATI et al., 2003; MORAES-SILVA et al., 2006).

As principais estratégias de controle incluem diagnóstico e tratamento dos casos, combate ao vetor, controle do reservatório animal e educação em saúde (BRASIL, 2006a; DESJEUX, 2004, WHO, 2006).

Em áreas de LV antroponótica, além do risco individual para os pacientes não tratados, esses indivíduos são fontes de infecção e contribuem para a transmissão da doença. Assim, diagnóstico e tratamento imediatos são considerados essenciais para o controle, especialmente nas áreas de ocorrência da LDPC em função do intenso parasitismo cutâneo (CHAPPUIS et al., 2007).

O combate ao flebotomíneo é realizado por meio do controle químico com o uso de inseticidas de ação residual em domicílio e peridomicílio. Essa estratégia tem enfrentado problemas orçamentários e de recursos humanos (GONTIJO; MELO, 2004), além de ser necessário um maior conhecimento sobre o comportamento desses insetos para garantir um controle efetivo (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

Os cães são considerados os principais reservatórios em focos zoonóticos, por isso o sacrifício dos animais com sorologia e/ou parasitologia positiva é recomendado. Porém, essa medida tem sido bastante contestada pelos proprietários e veterinários em virtude das controvérsias sobre a sua efetividade (COSTA; VIEIRA, 2001). Por outro lado, o tratamento não é recomendado uma vez que, mesmo após a cura clínica, não há cura parasitológica. Portanto, esses animais podem ter recaídas e após algum tempo voltam a ser infectantes para os flebotomíneos. Soma-se que os medicamentos são os mesmos utilizados em humanos e o uso indiscriminado pode levar à resistência dos parasitas (ALVAR et al., 1994). Uma outra abordagem é o uso de coleiras impregnadas com deltametrina como repelente dos vetores (DAVID et al., 2001; GONTIJO; MELO, 2004; KILLICK-KENDRICK et al., 1997), com os inconvenientes de serem caras e de difícil monitoramento em termos de saúde pública (OLIVEIRA; MORAIS; MACHADO-COELHO, 2008).

Contudo, a expansão, urbanização e focos epidêmicos da LV evidenciam a insuficiência dessas medidas (GONTIJO; MELO, 2004). Assim, ainda são necessárias pesquisas quanto às principais fontes de *L. chagasi* para populações humanas, à infectividade de cães para *Lu. Longipalpis* e ao o uso de inseticidas mais efetivos e menos prejudiciais (COSTA; VIEIRA, 2001), além de métodos diagnósticos, tratamento e vacinas ideais para humanos e caninos. Embora algumas vacinas caninas já tenham sido testadas, seus resultados precisam ser melhor avaliados. O desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras para humanos e caninos é uma estratégia promissora que merece ser priorizada (OLIVEIRA; MORAIS; MACHADO-COELHO, 2008; ROMERO; BOELAERT, 2010).

### 2.2.1 Aspectos clínicos

Os pacientes com LV apresentam sinais e sintomas de infecção sistêmica persistente. Caracterizam-se por febre irregular prolongada, anorexia e perda de peso, palidez de pele e mucosas, predisposição a outras infecções, edema, epistaxe, hematêmese, fadiga, cansaço, debilidade progressiva e, devido à invasão parasitária do sangue e sistema monofagocítico, aumento do volume de linfonodos, baço e fígado (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; PEDROSA; ROCHA, 2004; REY, 2001b).

Na ausência de tratamento, geralmente evolui para o óbito em consequência do estado clínico do paciente, podendo atingir taxa de letalidade entre 75 e 95% (DESJEUX, 2004; REY, 2001b). No Brasil tem sido observada uma elevação na taxa de letalidade, de 3,6% em 1994 para 6,7% em 2003 (um aumento de 85%), sendo o diagnóstico tardio um dos principais fatores para o desfecho fatal (BRASIL, 2006b).

É uma doença crônica de caráter espectral. O curso clínico da infecção após a inoculação do parasita depende de diversos fatores, podendo ser definida em infecção ou doença propriamente dita, segundo a evolução clínica e laboratorial (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Formas assintomáticas são caracterizadas pela ausência de manifestações clínicas, porém com a presença de anticorpos anti-*Leishmania*. Pode refletir o início do processo infeccioso com possível evolução para a doença; autorresolução no início do processo devido ao equilíbrio da relação parasito-hospedeiro; ou imunidade residual pós-tratamento da doença. Essas formas somente são detectadas através da busca ativa de casos e não devem ser tratadas, apenas acompanhadas (BADARÓ et al., 1986; BRASIL, 2006a; GAMA et al., 2004; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Formas leves ou oligossintomáticas, também denominadas de subclínicas, são caracterizadas pela ausência de sintomas (indivíduos sem queixas) ou com manifestações clínicas não específicas ocasionais. São esporádicas e dificultam a associação com LV no diagnóstico. Gama et al. (2004) consideraram desse grupo os pacientes que apresentavam dois ou mais sintomas leves com sorologia positiva. Os achados clínicos e laboratoriais são variáveis, sendo febre a queixa principal (GAMA et al., 2004). Podem estar presentes hepato e/ou esplenomegalia discretas, tosse intermitente, diarreia, febre baixa, mal-estar (BADARÓ et al., 1986), presença de anticorpos anti-*Leishmania* e intradermorreação (IDR) geralmente positiva, com ou sem a presença do parasita na punção do órgão (BRASIL, 2006a; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). Pode progredir para forma inaparente ou para formas mais graves, principalmente se a IDR for negativa. Tais casos devem ser tratados, a menos que seja assegurado o seu acompanhamento (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Formas moderadas são caracterizadas por uma evolução clínica prolongada por semanas ou poucos meses, com febre variável, episódios de diarreia, e ocasionalmente outras manifestações, com estado clínico geral sustentado,

atividades normais durante os períodos sem febre, presença de discreta ou moderada hepatomegalia, testes sorológicos positivos, IDR ocasionalmente positiva e presença evidente de *Leishmania* na punção de medula óssea ou de outros órgãos. Exames complementares hematológicos e bioquímicos apresentam poucas alterações. Esses pacientes devem receber tratamento a fim de evitar uma possível piora do estado clínico (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

Formas graves ou clássicas são caracterizadas por progresso insidioso, resultando num diagnóstico tardio. Paciente refere histórico de meses ou anos da doença. Apresenta-se com febre variável, crescente fraqueza, palidez, perda de peso, aumento do volume abdominal, episódios de sangramento e diarreia, entre outras manifestações. Aspectos clínicos e exames laboratoriais inespecíficos indicam grave prognóstico geral, acentuada hepatoesplenomegalia, anemia progredindo a pancitopenia, funções hepática e renal moderadamente alteradas e hipoalbuminemia com inversão da relação albumina/globulina. Essas alterações podem progredir com piora do quadro clínico, evoluindo com insuficiência cardíaca e edema, perda de peso e caquexia, petéquias em mucosas ou pele, principalmente nas áreas de atrito e membros inferiores, ligeira a moderada icterícia, hipertensão arterial (geralmente com picos) e infecções bacterianas secundárias. Títulos de anticorpos são elevados, IDR é negativa e o parasita pode ser visualizado em amostras de medula óssea e outros órgãos (BRASIL, 2006a; CHAPPUIS et al., 2007; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; PEDROSA; ROCHA, 2004).

O período de incubação é variável, ocorrendo entre 10 dias e 24 meses, média entre 2 a 6 meses. Os sintomas de LV podem permanecer por várias semanas até meses antes do paciente procurar por atendimento. Por vezes, o quadro clínico inicial é confuso em virtude de coinfeções bacterianas tais como pneumonia, diarreia ou tuberculose (CHAPPUIS et al., 2007).

A febre está normalmente associada a calafrios e pode ser intermitente (BRASIL, 2006a; CHAPPUIS et al., 2007).

Alterações hepáticas, inclusive graves, podem ocorrer no início da infecção, devendo a LV ser considerada no diagnóstico diferencial de hepatites associadas a febre prolongada, assim como em síndromes colestatias. A exata etiologia dos danos hepáticos não é clara, mas pode ter uma base imunológica. Antes do tratamento são vistas células de Kúpffer e macrófagos infectados por *Leishmania* em 40% dos casos. Degeneração dos hepatócitos, fibrose das veias hepáticas terminais

e fibrose pericelular são achados comuns junto com evidências bioquímicas de disfunção hepática antes do tratamento (EL HAG et al., 1994; MEDEIROS et al., 2007).

Anemia grave, trombocitopenia e coagulopatia são fatores associados ao pior prognóstico, uma vez que o manejo fica prejudicado pelas infecções, hemorragias e disfunção hepática desencadeadas pela parasitose ou pelo tratamento instituído (MEDEIROS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010).

O comprometimento da função renal na LV em sua fase aguda foi demonstrado por Salgado Filho, Ferreira e Costa (2003), sugerindo disfunções renais glomerulares e tubulares mesmo em pacientes com nenhuma ou pouca expressão clínica de nefropatia. Nestes casos, conseqüentemente, pode-se observar albuminúria e hematúria (DUTRA et al., 1985; PRASAD; SEM; GANGULY, 1992).

A apresentação clínica da LV é semelhante em várias áreas endêmicas, mas há algumas diferenças. Por exemplo, linfonodos aumentados são raramente encontrados em pacientes indianos, enquanto são frequentes em pacientes sudaneses. Hiperpigmentação da pele, que provavelmente deu origem ao nome *kala-azar* (febre negra em hindu, hindi), tem sido descrito somente em pacientes do subcontinente indiano, mas hoje esse sintoma não é comum e era talvez uma característica da doença prolongada na época em que não havia tratamento efetivo disponível (CHAPPUIS et al., 2007).

De modo geral, as manifestações clínicas da LV são similares entre adultos e crianças. De acordo com o estudo de Caldas et al. (2006), linfadenopatia e sangramento foram predominantes em adultos, enquanto hepatomegalia e palidez de pele e mucosas foram mais frequentes em crianças. Embora ambos os grupos tenham exibido uma tendência de normalização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, maior número de crianças retornaram mais cedo para os valores normais. Entretanto, as diferenças nos parâmetros clínicos ou laboratoriais entre esses grupos não indicaram a necessidade de diferentes abordagens clínicas e terapêuticas.

Portanto, a infecção não ocorre sempre com a manifestação clínica da doença. A taxa de incidência das infecções assintomáticas em relação aos casos clínicos é variável, desde 1:2,6 no Sudão até 50:1 na Espanha. No Brasil a proporção é de aproximadamente 18 casos de infecções para um de doença

(CHAPPUIS et al., 2007). Um estudo realizado com crianças encontrou 23% de casos assintomáticos e verificou que o esfregaço e a cultura do aspirado de medula óssea geralmente são negativos para *Leishmania* na ausência de sintomas clássicos de LV (BADARÓ et al., 1986). Em Araçatuba, interior de São Paulo, a distribuição dos casos assintomáticos foi associada ao gradiente socioeconômico, de modo que regiões mais pobres apresentavam maior número de casos (BARÃO et al., 2007). Porém, em Três Lagoas (MS), onde a taxa de infecções assintomáticas relatada é de 36,4% entre contactantes de casos sintomáticos de LV, não foram observadas diferenças quanto à renda, escolaridade, sexo ou idade (OLIVEIRA et al., 2008). Em virtude desses achados, alerta-se para a possível transmissão via transfusional uma vez que doadores de sangue assintomáticos podem ser portadores das formas amastigotas (LE FICHOUX et al., 1999; MPAKA et al., 2009; OTERO et al., 2000).

Segundo Gama et al. (2004), a razão para a grande maioria dos indivíduos que se infectam permanecerem assintomáticos, bem como os fatores que determinam a gravidade das manifestações clínicas estão relacionados à idade, estado nutricional e características imunogenéticas do indivíduo acometido. Barbosa et al. (2010) encontraram mais de 50% de casos assintomáticos em uma região do Pará e associaram à importante função da resistência imune celular contra a infecção, demonstrada pela IDR.

Essas informações podem contribuir no desenvolvimento de vacinas e controle da doença, pelo entendimento dos fatores que predispõem alguns indivíduos a desenvolverem a doença ou controlar a infecção (CHAPPUIS et al., 2007).

O óbito pode advir devido ao tratamento tardio ou ausência de resposta aos medicamentos, geralmente com complicações. A morte frequentemente ocorre a partir de coinfeção bacteriana e/ou hemorragias e anemia grave (CHAPPUIS et al., 2007), por vezes antes do início ou durante os primeiros dias de tratamento para a leishmaniose (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; OLIVEIRA et al., 2010).

A letalidade pode ser superior a 10% tanto para adultos como para crianças (ALVARENGA et al., 2010; QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004). Porém, o óbito é mais frequente entre adultos com idade acima de 40 anos, possivelmente em decorrência de depressão da resposta imunológica, comorbidades, infecções bacterianas secundárias e toxicidade dos medicamentos anti-*Leishmania* ocasionando pancreatite, insuficiência renal, insuficiência hepática, alterações

cardíacas e de consciência (OLIVEIRA et al., 2010). Werneck et al. (2003) associaram o desfecho fatal à presença de anemia, febre por mais de 60 dias, diarreia e icterícia.

### 2.2.2 Aspectos laboratoriais

Diversas alterações bioquímicas e hematológicas têm sido relatadas na LV. Embora tenham aplicações limitadas no diagnóstico da doença, podem ser úteis na suspeita da parasitose e na avaliação prognóstica durante a sua evolução. As alterações laboratoriais mais constantes da LV são a pancitopenia, a hipergamaglobulinemia e a hipoalbuminemia. Entretanto, podem ser mais ou menos acentuadas dependendo da fase de evolução da doença (BRASIL, 2006a).

Dentre as alterações hematológicas geralmente descritas, a pancitopenia é uma característica marcante na LV. Trata-se de uma deficiência dos três elementos celulares do sangue (células vermelhas, células brancas e plaquetas) resultando em anemia, leucopenia e trombocitopenia (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948; RACHMILEWITZ; BRAUN; VRIES, 1947; RAI et al., 2008). A parasitose responde por 10% dos casos de pancitopenia em crianças da Índia, sendo a terceira principal causa (GUPTA et al., 2008).

As anemias são caracterizadas laboratorialmente por um decréscimo dos níveis de hemoglobina (Hb) circulante em comparação com os valores esperados em pessoas saudáveis do mesmo sexo e idade. Normalmente, estão associadas com uma redução da capacidade de transporte de oxigênio, portanto, podem causar sintomas resultantes de hipóxia tecidual como fadiga e dispnéia ao exercício (PRCHAL, 2006b).

Apesar dos fatores envolvidos na anemia não estarem totalmente esclarecidos, suas causas frequentemente são atribuídas ao persistente estado inflamatório, hiperesplenismo (destruição periférica de eritrócitos no baço aumentado), sangramento, diseritropoese, deficiência de ferro, mecanismos imunes e alteração da permeabilidade da membrana eritrocitária (CHAPPUIS et al., 2007; KAGER; REES, 1986; MAHAJAN; MARWAHA, 2007). A anemia hemolítica imune tem sido raramente relatada em pacientes com LV e, quando ocorre, apresenta teste de Coombs positivo (como resultado de autoanticorpos provavelmente produzidos pela ativação policlonal de linfócitos B), aumento de hemoglobina na urina e no

plasma, esferocitose e anisocitose. Por isso, deve-se suspeitar de LV em pacientes que apresentem febre prolongada, hepatoesplenomegalia, anemia e evidência de hemólise (DOTIS et al., 2003; MAHAJAN; MARWAHA, 2007).

Pollack et al. (1988) usando técnicas de imunofluorescência e teste de Coombs, demonstraram a presença de anticorpos associados à membrana das plaquetas, neutrófilos e eritrócitos. Após o tratamento anti-*Leishmania* com estibogluconato de sódio, esses mesmos anticorpos não foram detectados e houve restabelecimento dos níveis normais dessas células, sugerindo que a pancitopenia era causada pela destruição rápida das células opsonizadas.

Cartwright, Chung e Chang (1948) também notaram semelhanças com as alterações hematológicas de doenças relacionadas à esplenomegalia, sugerindo que a pancitopenia não é ocasionada pelo aumento de células reticuloendoteliais na medula.

De acordo com a pesquisa de Kager e Rees (1986), os eritrócitos de indivíduos com LV eram microcíticos e hipocrômicos. Adicionalmente outros estudos descrevem a presença de anisocitose e poiquilocitose (RAI et al., 2008). Cançado e Chiattonne (2002), a partir dos resultados da dosagem de ferro sérico baixa com normal a elevado nível de ferritina, atribuíram esses achados à anemia de doença crônica.

A velocidade de hemossedimentação (VHS) embora seja um exame bastante inespecífico devido à grande variedade de condições que a influenciam (COLLARES; VIDIGAL, 2004), encontra-se normalmente elevada nos pacientes com LV (BRASIL, 2006a; RAI et al., 2008).

Nos pacientes com LV, a leucopenia tem sido descrita juntamente com neutropenia e linfocitose relativa (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948; RAI et al., 2008). A redução de neutrófilos se deve, provavelmente, à destruição que ocorre no baço e no fígado em menor proporção, ou ainda, à distribuição alterada na margem do leito vascular (MUSUMECI et al., 1976). Os eosinófilos geralmente têm um decréscimo no seu número ou desaparecem completamente do sangue periférico, enquanto os basófilos ocorrem em número normal. Os linfócitos e os monócitos estão aumentados, principalmente em porcentagem, e os plasmócitos são observados ocasionalmente (BRASIL, 2006a; CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948).

A trombocitopenia ou plaquetopenia é relacionada como a principal causa das tendências hemorrágicas, sendo as mais comuns epistaxe e gengivorragia. A presença de hemorragia digestiva e icterícia deve alertar para maior gravidade do caso (BRASIL, 2006a; RAI et al., 2008). A associação da coagulação intravascular disseminada às alterações da coagulação não está clara, uma vez que há discordância entre os relatos (AL-JURAYYAN et al., 1995; KAGER; REES, 1986).

Com a progressão da doença, as alterações hematológicas (anemia, trombocitopenia e leucopenia com linfomonocitose e eosinopenia), assim como o aumento de volume do baço, tornam-se mais graves e evidentes. Geralmente, leucopenia aparece em primeiro lugar, seguida de anemia e finalmente, trombocitopenia (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948).

Quanto ao retorno aos valores normais, segundo Kager e Rees (1986), após o tratamento, plaquetas e glóbulos brancos voltaram aos níveis normais mais rapidamente, enquanto o nível de Hb levou mais tempo. Por outro lado, Cartwright, Chung e Chang (1948) relataram aumento do número de plaquetas no sangue periférico tardiamente, depois de ter havido um aumento significativo na hemoglobina e leucócitos.

Na leishmaniose visceral canina (LVC), a densidade parasitária na medula óssea tem sido relacionada com alterações fenotípicas relatadas para leucócitos no sangue periférico e apontadas como características do quadro clínico. Anemia e leucopenia acentuadas são marcas de disfunção hematológica associada com alta densidade parasitária da medula óssea (REIS et al., 2006b). Em estudos realizados com cães naturalmente infectados, têm sido descritos marcadores de disfunção hematológica como anemia, eosinopenia, linfopenia e monocitopenia, normalmente associados a animais sintomáticos ou com alta densidade parasitária no baço, enquanto o alto parasitismo cutâneo demonstra redução apenas na hemoglobina (GUERRA et al., 2009; REIS et al., 2006a). Por outro lado, um aumento na frequência de células T CD8+ foi associado a baixo parasitismo esplênico (GUERRA et al., 2009).

Quanto às alterações bioquímicas observadas na LV, a disproteinemia provocada pela exacerbada resposta imune humoral após a infecção, é uma característica marcante. Um incremento na produção de citocinas durante a progressão da infecção estimula a ativação policlonal de linfócitos B resultando na produção de grande quantidade de imunoglobulinas, principalmente IgG e IgM

contra proteínas não específicas e haptenos. O desequilíbrio protéico é explicado pelo aumento das proteínas séricas totais, hiperglobulinemia devido ao aumento significativo da fração gamaglobulina (hipergamaglobulinemia), hipoalbuminemia e conseqüentemente, inversão da relação albumina/globulina (A/G) (DENNIS et al., 1986; GOTO; LINDOSO, 2004).

Outras provas bioquímicas podem estar alteradas e serem sugestivas de internação, como creatinina sérica (acima de duas vezes o maior valor de referência), atividade de protrombina (inferior a 70%), bilirrubina (acima do maior valor de referência), enzimas hepáticas (acima de cinco vezes o maior valor de referência) e albumina (inferior a 2,5 g/dL) (BRASIL, 2006b). Albumina sérica e tempo de protrombina podem mostrar uma associação com a evolução da doença no que se refere ao tempo de duração e gravidade, e não com o número de parasitas (MEDEIROS et al., 2007).

### 2.2.3 Aspectos imunológicos

Os fagócitos são células que participam da imunidade inata ou natural, responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo contra infecções, eliminando os patógenos através de um mecanismo efetor denominado fagocitose (PUKA et al., 2005). As células fagocíticas incluem mononucleares e granulócitos polimorfonucleares (PMN). O termo PMN refere-se aos neutrófilos, eosinófilos e basófilos, que por apresentarem grande quantidade de grânulos citoplasmáticos são também denominados de granulócitos. São diferenciados conforme o comportamento desses grânulos diante dos corantes utilizados na preparação para microscopia. A linhagem fagocítica mononuclear (monócitos, macrófagos e células dendríticas) constitui o grupo mais importante de células fagocitárias de longa vida, com função de neutralização, englobamento e destruição de partículas, incluindo os agentes infecciosos, bem como de iniciação e coordenação de outras fases da resposta imunológica (PUKA et al., 2005; SOONG, 2008).

As espécies de *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios. Pelo fato do parasita não realizar penetração ativa e ser internalizado pela capacidade fagocitária das células do hospedeiro, o processo de fagocitose não se restringe aos fagócitos profissionais (neutrófilos, monócitos e macrófagos). Portanto, os relatos de sua presença em outros tipos celulares, de linhagem não monocítica ou

macrofágica, não devem ser inusitados. Embora essas células não permitam o crescimento dos parasitas, têm menor capacidade de destruição quando comparadas aos macrófagos, garantindo *in vivo* uma estratégia de sobrevivência para um pequeno número deles (RITTIG; BOGDAN, 2000).

Após a infecção, as primeiras interações ocorrem entre PMN e algumas subpopulações de células dendríticas (DC) com a forma promastigota da *Leishmania*. As células presentes e citocinas produzidas no local, bem como as interações posteriores à migração das DC para os linfonodos de drenagem, determinarão o perfil de resposta imunológica ao agente e o prognóstico da infecção (SOONG, 2008). A intensidade e o perfil de ativação dessas células dependem da espécie/cepa de *Leishmania*, fase de maturação e subpopulação de DC envolvida, opsonização e estímulos exógenos (PRINA et al., 2004; SOONG, 2008).

Depois de fagocitadas, as leishmânias contam com complexas estratégias de sobrevivência intramacrofágica, entre elas a localização intracitoplasmática e a inibição da fusão dos lisossomos ao vacúolo parasitóforo, em virtude de lipofosfoglicano (LPG) presente na superfície das promastigotas (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999; DESJARDINS, 1997).

Após a modificação em amastigotas, o parasita torna-se apto a sobreviver e se multiplicar no interior do vacúolo parasitóforo, resistindo à acidez e à digestão enzimática (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; BERMAN; DWYER; WYLER, 1979; BURCHMORE; BARRETT, 2001). Posteriormente, é capaz de alterar a responsividade das células fagocíticas, diminuir a capacidade de apresentação para as células T CD4+ *naive*, alterar a produção de citocinas, inibir a produção de superóxido e óxido nítrico, reduzir a fosforilação e/ou acelerar a degradação das moléculas chave na sinalização celular devido à presença de proteinases e oligopeptidases do parasita. Essas intervenções feitas pela *Leishmania* promovem uma inadequada ativação da resposta imunológica (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1999; KIMA, 2007; SOONG, 2008).

Dabiri et al. (1998) ao avaliarem pacientes com leishmaniose cutânea demonstraram relação inversa entre o número de parasitas e a presença de componentes de resposta celular do hospedeiro. Dessa maneira, numerosos neutrófilos, linfócitos e macrófagos tipo I (monócitos inativados) correspondiam à presença de um pequeno número de amastigotas, enquanto que elevada quantidade

de macrófagos tipo II ou III (macrófagos ativados ou epitelióides, respectivamente) associava-se com numerosas amastigostas. Estas observações apoiam a importância da imunidade mediada por células na reação do hospedeiro ao parasitismo e sugerem ainda que a imunidade celular seja o principal componente do fenômeno de erradicação na leishmaniose.

A depressão da imunidade celular é manifestada por reação de hipersensibilidade tardia negativa na pele e ausência de resposta proliferativa *in vitro* (BARBOSA et al., 2010; CARVALHO; TEIXEIRA; JOHNSON Jr, 1981). Por essa razão, a IDR é negativa durante a progressão da doença, positivando somente após a cura clínica, entre seis meses a três anos após o término do tratamento, não sendo utilizada no diagnóstico da LV (BRASIL, 2006a). No entanto, estudos recentes no norte do país, têm correlacionado os perfis clínicoimunológicos da infecção com os resultados simultâneos da IFI e da IDR em pacientes de área endêmica, sugerindo o uso combinado desses dois métodos no diagnóstico da LV (BARBOSA et al., 2010).

Em infecções humanas ou experimentais, a imunidade protetora na LV é predominantemente mediada por linfócitos T. O mecanismo de resistência envolve células T CD4+ e CD8+, interleucina-2 (IL-2), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e IL-12, esta última em um mecanismo independente de IFN- $\gamma$  e ligada à produção do fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), portanto, um perfil Th1 da resposta imunológica. Por outro lado, a susceptibilidade, correspondente ao perfil Th2, envolve IL-10 e as células B (GOTO; LINDOSO, 2004), enquanto a participação de IL-4 não é clara (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

Estudos com cães naturalmente infectados por *L. chagasi* relatam as relações entre os complexos eventos de imunidade celular, correlacionando os principais marcadores fenotípicos do sangue periférico com estado clínico e densidade parasitária esplênica e medular. Menor frequência de monócitos, células B e T circulantes são importantes indicadores de LVC grave e alto parasitismo, enquanto aumento dos níveis de linfócitos T CD8+ parece ser a principal característica fenotípica em casos assintomáticos e/ou de baixo parasitismo. Sugere-se que essa subpopulação desempenha importante papel no desenvolvimento da resposta efetiva contra *Leishmania* sp., possivelmente através de mecanismos citotóxicos.

Outros estudos correlacionam o nível de células T CD8+ não só com a proteção durante infecção por *L. infantum*/*L. chagasi*, mas também com a resposta imunogênica após administração de vacina (GUERRA et al., 2009; REIS et al., 2006b).

#### 2.2.4 Diagnóstico

O amplo espectro clínico da LV e a semelhança com outras condições patológicas impõem a necessidade de testes diagnósticos para a confirmação da suspeita clínica (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Tais testes devem ser altamente sensíveis (acima de 95%) uma vez que a parasitose pode ser fatal, mas também altamente específicos devido à toxicidade dos medicamentos atualmente em uso para o seu tratamento. Além disso, os mesmos devem ser simples e acessíveis. Considera-se ainda, que um teste ideal deve distinguir entre infecção assintomática e doença aguda, pois não há medicamentos suficientemente seguros para tratar os casos assintomáticos (CHAPPUIS et al., 2007).

Em áreas endêmicas afastadas dos grandes centros, onde há carência de profissionais para a realização do diagnóstico da LV, muitas vezes são aplicados apenas critérios básicos como características clínicas e aspectos epidemiológicos (DESJEUX, 2004; DOURADO et al., 2007; GONTIJO; MELO, 2004).

Certamente, os achados clínicos e laboratoriais, mesmo nos casos oligossintomáticos, devem sempre ser associados à epidemiologia, especialmente se os pacientes apresentarem febre e esplenomegalia. Porém, o diagnóstico definitivo é tradicionalmente obtido pela confirmação da presença do parasita em material biológico do paciente ou por métodos imunológicos (GONTIJO; MELO, 2004; PASTORINO et al., 2002; SINGH; SIVAKUMAR, 2003; SUNDAR; RAI, 2002).

Resultados de exames laboratoriais independentes da presença de *Leishmania*, tais como, pancitopenia e hipergamaglobulinemia policlonal em pacientes na África Oriental e Ásia, em função da simplicidade e baixo custo, são comumente relacionados ao diagnóstico da parasitose quando da suspeita clínica. No entanto, devido à baixa sensibilidade e especificidade desses testes para a LV, não devem ser considerados determinantes no diagnóstico (CHAPPUIS et al., 2007; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE – OPAS, 1996).

A detecção das formas amastigotas do parasita pela observação microscópica de aspirados de linfonodos, medula óssea ou baço é o método confirmatório clássico para a LV, utilizado desde 1930 (DOURADO et al., 2007). Embora a especificidade seja alta, a sensibilidade é variável, sendo maior para o baço (93-99%) do que para aspirados de medula óssea (53-86%) ou linfonodos (53-65%). O parasita pode também ser demonstrado utilizando-se o “*buffy coat*” do sangue periférico de pacientes coinfectados pelo HIV (DESJEUX, 1999; SUNDAR, 2003). Entre as desvantagens da pesquisa do parasita está a necessidade de procedimentos invasivos para obtenção do material de baço e medula óssea (SUNDAR; RAI, 2002).

A aspiração esplênica pode ser complicada por hemorragias que ameaçam a vida em aproximadamente 0,1% dos indivíduos, exigindo um especialista na técnica, instalações para ficar sob observação e é contraindicada em casos de anemia grave, gestação e quando há tendência à hemorragias (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004; SUNDAR; RAI, 2002).

Nos aspirados medulares o sucesso no encontro das formas amastigotas é diretamente proporcional à qualidade do material, experiência do observador e ao número de campos observados. Em situações ideais a sensibilidade do aspirado de medula óssea pode ser superior a 95%, para tanto é necessário que a lâmina seja exaustivamente examinada antes de ser considerada negativa (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005). A precisão do exame microscópico pode ainda ser influenciada pela qualidade dos reagentes usados (CHAPPUIS et al., 2007).

A observação de formas promastigotas em meios de cultura específicos após a inoculação da amostra biológica também constitui um diagnóstico de certeza. Embora na prática clínica o uso do isolamento *in vitro* não seja a técnica mais adequada para o diagnóstico, em virtude do período (dias a semanas) por vezes necessário para a positivação, continua sendo o método de referência para isolamento e posterior identificação específica do parasita (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1996; PIARROUX et al., 1994; SUNDAR; RAI, 2002). A hemocultura, realizada a partir de sangue periférico, embora seja uma ferramenta válida, minimamente invasiva e de fácil execução, tem as desvantagens de ser demorada (até um mês) e dificultada em casos de baixa parasitemia (DEREURE et al., 1998; HIDE et al., 2007). No Peru, estudos com lesões cutâneas têm relatado sucesso com a utilização de um novo método de cultura (microcultura) somente com

meio líquido em tubos capilares, sendo mais sensível e econômico do que as tradicionais técnicas de cultivo das espécies de *Leishmania* (BOGGILD et al., 2007).

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* – PCR), são mais sensíveis do que os outros métodos convencionais para a detecção dos parasitas no sangue ou órgãos. Porém, permanecem restritas aos hospitais de referência e centros de pesquisas, não sendo frequentemente empregadas na rotina (CHAPPUIS et al., 2007; DOURADO et al., 2007; FRAGA et al., 2010; SUNDAR; RAI, 2002; VAN DER MEIDE et al., 2008). Esses métodos permitem também a quantificação dos parasitas, podem ser aplicados em estudos de avaliação do tratamento, estudos epidemiológicos, elaboração de vacinas (VAN DER MEIDE et al., 2008) ou utilizados para rápida identificação específica do parasita (ANTINORI et al., 2007).

Embora haja discordância entre alguns estudos quanto à sensibilidade da PCR no sangue periférico e na medula óssea, a detecção de *Leishmania* no sangue periférico tem sido pelo menos equivalente à pesquisa na amostra medular de indivíduos imunocompetentes ou imunossuprimidos (ANTINORI et al., 2007) e de crianças (FRAGA et al., 2010). Por outro lado, um estudo realizado com crianças para a detecção de *L. infantum* baseada na sequência de kDNA, concluiu que as amostras de sangue periférico somente foram positivas quando o título de anticorpos anti-*Leishmania* era alto (superior a 5000). Desse modo, sugeriu-se o material medular como sendo o ideal para o diagnóstico por PCR durante o período de infecção (FAYZI et al., 2008).

A detecção de *Leishmania* por imunohistoquímica em tecidos previamente fixados em formalina e embebidos em parafina, também tem sido descrita e apresenta bons resultados, com fácil identificação de amastigotas no interior de macrófagos de diversos órgãos, alta sensibilidade e especificidade, principalmente em locais com baixo parasitismo (LIVNI et al., 1983; TAFURI et al., 2004).

Vários testes que detectam anticorpos anti-*Leishmania* estão disponíveis, mas todos têm duas grandes limitações. Primeiro, embora os níveis séricos de anticorpos reduzam após o tratamento bem sucedido, eles permanecem detectáveis por vários anos após a cura. Portanto, recidiva de LV não pode ser diagnosticada por sorologia, uma vez que não tem o poder de distinguir entre infecção ativa ou passada e, conseqüentemente, não tem valor no acompanhamento da resposta parasitológica à terapêutica específica (CHAPPUIS et al., 2007; PIARROUX et al.,

1994; SUNDAR; RAI, 2002). Segundo, uma proporção significativa de indivíduos saudáveis mora em áreas endêmicas e não possui histórico de LV doença, embora os mesmos sejam positivos para anticorpos anti-*Leishmania* devido às infecções assintomáticas. A soroprevalência em populações saudáveis varia de menos de 10% em áreas de baixa ou moderada endemicidade, até maior que 30% em focos de alta transmissão ou entre os contatos (OLIVEIRA et al., 2008). Assim, testes baseados em anticorpos sempre devem ser usados em associação com critério clínico padronizado para definir o diagnóstico de LV (CHAPPUIS et al., 2007) e, especialmente em áreas endêmicas, deve-se considerar outros diagnósticos usuais mesmo na presença de sorologia reagente (GAMA et al., 2004). Além disso, esses testes têm reduzida sensibilidade em pacientes imunocomprometidos (PIARROUX et al., 1994; SUNDAR; RAI, 2002).

Testes sorológicos baseados na detecção de anticorpos por imunofluorescência indireta (IFI ou RIFI), ensaios imunoenzimáticos (ELISA) ou *Western blott* têm demonstrado alta precisão no diagnóstico em muitos estudos, mas são pouco adaptados aos trabalhos de campo (CHAPPUIS et al., 2007; DESJEUX, 2004). A IFI, empregada a partir dos anos 60, utiliza formas promastigotas do parasita que a limitam em termos de especificidade e reprodutibilidade (DOURADO et al., 2007). Nos anos 70, a técnicas imunoenzimáticas com antígenos crus ou purificados, começaram a ser utilizadas e mostraram melhores sensibilidade e especificidade no diagnóstico, com o uso de glicoproteínas de membrana gp 63, gp 70, gp 72 e rK39, específicas do gênero *Leishmania* (ASSIS et al., 2008; DOURADO et al., 2007).

Para uso no campo, dois testes sorológicos têm sido desenvolvidos e validados: teste de aglutinação direta (DAT) e o teste imunocromatográfico (ICT) baseado no antígeno rK39 (BOELAERT et al., 2004). O DAT é um teste semiquantitativo que utiliza placas de microtítulos nas quais diluições seriadas do soro ou sangue dos pacientes são adicionadas a promastigotas mortas de *L. donovani*. Se os anticorpos específicos estão presentes, a aglutinação é visível após 18 horas a olho nu. Esse teste tem sido extensivamente validado em muitas áreas endêmicas. Em metanálise de 30 estudos, foram demonstradas sensibilidade e especificidade estimadas de 94,8% e 85,9%, respectivamente (BOELAERT et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2006).

O teste rápido (ICT) para anticorpo anti-*L. donovani* marcado com o antígeno rK39, proposto a partir dos anos 90, apresentou limitações, pois não detectava infecção em animais com títulos de IFI de 1:40 a 1:320. Atualmente, novos testes rápidos para detecção de *Leishmania* sp. (TRL), também marcados com o antígeno rK39, estão sendo testados, inclusive no Brasil (ASSIS et al., 2008; DOURADO et al., 2007). Sua validade tem sido bastante discutida, pois enquanto alguns estudos relatam altas sensibilidade (94-96%) e especificidade (95-99,7%) (ASSIS et al., 2008; BOELAERT et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2006), em outros a sensibilidade não passa de 70% (ZIJLSTRA et al., 2001). Portanto, embora ofereçam vantagens como o uso na área de campo, resultados em curto espaço de tempo e baixo custo operacional (BOELAERT et al., 2004; DOURADO et al., 2007; SUNDAR et al., 2007), devem ser usados com cautela.

Outras opções são os testes para a detecção de antígenos que, teoricamente, devem ser mais específicos do que aqueles que detectam anticorpos, pois evitam reação cruzada e podem distinguir infecções ativas de infecções passadas. Um exemplo é o teste de aglutinação em látex termicamente estável, que usa amostra de urina de pacientes com LV. Tem mostrado resultados iniciais promissores, especificidade de 100% e sensibilidade entre 68 e 100% (SUNDAR et al., 2005; SUNDAR; RAI, 2002). Estudos na África Oriental e subcontinente Indiano mostraram boa especificidade, mas apenas baixa a moderada (48-87%) sensibilidade, correlacionando-se bem com cura em alta proporção (97-100%) dos pacientes durante o tratamento. Excluída sua baixa sensibilidade, há outras limitações: a urina deve ser fervida para evitar reações falso-positivas, os reagentes devem ser mantidos refrigerados e a dificuldade na distinção entre resultados fracamente positivos de negativos, que afetam a reprodutibilidade do teste. Trabalhos para melhorar o desempenho deste teste estão em andamento (CHAPPUIS et al., 2007; SUNDAR et al., 2005).

Mesmo sabendo-se que os doentes com LV podem não apresentar todas as manifestações clínicas da doença, a ausência de esplenomegalia sempre dificulta o diagnóstico, acarretando demora para início do tratamento e pior prognóstico. Assim, o diagnóstico precoce é imprescindível para a instituição de terapia específica a fim de aumentar as chances de recuperação dos pacientes (PEDROSA; ROCHA, 2004).

Obviamente, a confirmação positiva do teste parasitológico é o melhor método recomendado, porém a sorologia tem sido útil para triagem quando há dificuldade na

pesquisa das formas amastigotas de *Leishmania* (DOURADO et al., 2007). Além disso, a somatória de dois métodos diagnósticos tem mostrado bons resultados. Pastorino et al. (2002) relataram 85,7% de positividade utilizando mielograma e/ou mielocultura, enquanto Brustoloni et al. (2007) diagnosticaram aproximadamente 100% dos casos associando o mielograma à sorologia por IFI.

Em razão das dificuldades encontradas no diagnóstico da LV em áreas endêmicas, é urgente o emprego de técnicas simples, de baixo custo, fácil execução e que apresentem elevada sensibilidade e especificidade (DESJEUX, 2004; DOURADO et al., 2007), possibilitando a realização em unidades de atenção básica de saúde com consequente redução da morbidade e da mortalidade.

### 2.2.5 Tratamento

Várias doenças infecciosas que acometem principalmente os países em desenvolvimento são consideradas negligenciadas por diversos aspectos, em especial pela falta de auxílio na investigação de novos medicamentos para o tratamento (DESJEUX, 2004).

O tratamento da LV requer um medicamento específico anti-*Leishmania* e gerenciamento rigoroso de qualquer infecção concomitante bacteriana ou parasitária, anemia, hipovolemia e desnutrição. Os antimoniais têm sido a primeira linha no tratamento da LV em várias regiões por mais de 70 anos (DESJEUX, 2004; SHARMA et al., 2008). Entre as desvantagens desses medicamentos estão os longos períodos de tratamento, a administração sistêmica e o custo. Formas genéricas estão disponíveis e parecem ser equivalentes aos produtos de marca (DESJEUX, 2004).

Os antimoniais são medicamentos frequentemente tóxicos com efeitos adversos que podem levar ao óbito. Podem acarretar distúrbios cardiovasculares (arritmia cardíaca), pancreatite aguda, alterações hepáticas e renais, além de artralgia, mialgia, dores abdominais e cefaléia (CHAPPUIS et al., 2007; RATH et al., 2003; SHARMA et al., 2008). Merecem atenção especial os pacientes com idade inferior a dois anos ou com 45 anos ou mais, com sinais de avanço da doença e/ou desnutrição grave, sob o risco de associar esses inconvenientes terapêuticos com as complicações inerentes à parasitose (CHAPPUIS et al., 2007).

Atualmente, duas apresentações dos antimoniais estão disponíveis, estibogluconato de sódio e antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®), sendo essa última utilizada no Brasil (BRASIL, 2006a; MURRAY, 2001). Estudos comparativos têm mostrado que, embora apresente a mesma eficácia, o estibogluconato de sódio é mais tóxico (BRASIL, 2006a; DEPS et al., 2000). Porém, pouco se sabe sobre a peculiar toxicidade eritróide aguda causada por essa apresentação, que pode ser responsável pela queda progressiva e drástica dos níveis de hemoglobina nos pacientes em tratamento com antimoniato. Esses pacientes, após cinco dias de tratamento apresentam o aspirado de medula óssea com hiperplasia eritróide e precursores apresentando *cariorrexis* (SHARMA et al., 2008).

Quando há contraindicações ou falência da terapia com os antimoniais, a segunda linha de tratamento baseia-se no uso de anfotericina B nas suas formulações de desoxicolato ou lipossomal (DESJEUX, 2004; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003). A anfotericina B é um antifúngico indicado como primeira escolha para tratamento de LV em pacientes gestantes ou com outros sinais de gravidade tais como: menores de seis meses ou acima de 65 anos, desnutrição grave, comorbidades, infecções bacterianas, fenômenos hemorrágicos, edema generalizado e sinais de toxemia (BRASIL, 2006b). Mesmo apresentando muitos efeitos colaterais como alterações cardíacas, hipocalcemia, insuficiência renal, alterações pulmonares, hemólise e toxicidade medular com consequente anemia, a formulação lipossomal é pouco absorvida pelos rins e tem se mostrado menos tóxica do que a convencional (BRASIL, 2006a; GRADONI; GRAMICCIA; SCALONE, 2003; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; RATH et al., 2003). No Brasil, pelo Sistema Único de Saúde (SUS) é dispensada a indivíduos que não tiveram sucesso com o desoxicolato, transplantados renais ou renais crônicos (BRASIL, 2006a).

Outros medicamentos são empregados tais como pentamidina, paromomicina e miltefosine. Porém, apresentam elevada toxicidade e ainda necessitam de estudos para serem melhor avaliados. Entre os efeitos colaterais da pentamidina estão hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e até mesmo o óbito (GRADONI; GRAMICCIA; SCALONE, 2003; RATH et al., 2003).

## 2.3 Medula óssea

### 2.3.1 Medula óssea normal

A medula localiza-se na cavidade dos ossos (osso trabecular), onde uma malha de delicadas placas ósseas e vasos dão suporte ao tecido hematopoético e seu estroma. Os espaços de tamanho e forma variados que se situam entre as trabéculas adjacentes compreendem as unidades estruturais básicas da hematopoese sendo, portanto, o principal local de produção de células sanguíneas em humanos (ABBOUD; LICHTMAN, 2006; WILKINS, 1992).

A arquitetura trabecular e vascular do osso medular são próprias de modo a fornecer a estrutura básica, nutrição e sistema de remoção de resíduos pela hematopoese. O estroma consiste de um mistura heterogênea de adipócitos, fibroblastos e células como macrófagos e células-tronco hematopoéticas, juntamente com uma complexa matriz extracelular de reticulina, proteínas de ligação, incluindo fibronectina e proteoglicanos (ABBOUD; LICHTMAN, 2006; WILKINS, 1992).

O sistema microvascular frequentemente é composto por uma arteríola que continua numa rede de sinusoides dilatada ou poligonal. Os capilares observados usualmente são *shunting* de uma arteríola para sinusóide que continua em vênula pós-sinusoidal (McCLUGAGE; McCUSKEY Jr; MEINEKE, 1971).

A hematopoese ocorre nos espaços extravasculares entre os sinusoides da medula e é controlada por um complexo de citocinas estimulatórias e inibitórias, pelo contato célula-célula e o efeito dos componentes do estroma medular sobre as células próximas (ABBOUD; LICHTMAN, 2006; BURKHARDT; FRISCH; BARTL, 1982; WILKINS, 1992). O microambiente medular pode ser influenciado com consequente modificação da fisiologia da célula-tronco e de células progenitoras. Tem-se observado a matriz extracelular e as células estromais da medula óssea promovendo modificações na modulação da atividade do fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor* – GM-CSF), nos processos de interação celular e, portanto, de sinalização, interferindo na capacidade de autorrenovação, de proliferação e de diferenciação da célula-tronco hemopoética (VITURI et al., 2008). É relatada a interdependência entre as células do parênquima medular e as células endoteliais da rede vascular na

modulação do processo de diferenciação das células progenitoras (KOPP et al., 2005).

Numa visão tridimensional (reconstrução assistida por computador), megacariócitos e precursores eritroides estão associados à parede dos sinusoides; precursores de granulócitos junto às trabéculas e arteríolas centrais; enquanto granulócitos maduros localizam-se nos espaços intertrabeculares (ABBOUD; LICHTMAN, 2006; BURKHARDT; FRISCH; BARTL, 1982; WILKINS, 1992). Células eritropoéticas localizadas principalmente ao redor dos sinusóides formam uma contínua rede ou cordão. Assim, a estrutura unitária da medula tem sido definida como um cordão hematopoético com uma arteríola central rodeada por sinusoides (ABBOUD; LICHTMAN, 2006).

Neste ambiente único ocorre a diferenciação das *stem cells*, ou células-tronco, nas linhagens de células sanguíneas. Células maduras são produzidas e liberadas para manter os níveis normais no sangue. O sistema também responde ao aumento na demanda por células adicionais como consequência de perda de sangue, hemólise, inflamação, citopenias imunes e outras causas (ABBOUD; LICHTMAN, 2006; WILKINS, 1992).

O tecido hematopoético (medula vermelha) regride após o nascimento até a adolescência, quando se concentra na parte inferior do crânio, vértebras, pelve, gradil torácico, ombro, esterno e nas partes proximais dos ossos longos (fêmur e úmero). As células adiposas substituem as células hematopoéticas nos ossos das mãos, pés, pernas e braços constituindo a medula amarela. O tecido gorduroso ocupa aproximadamente 50% do espaço da medula vermelha no adulto. Em indivíduos mais velhos, pode ocorrer uma transformação do tecido adiposo em material mucoide gelatinoso denominado medula branca. A medula amarela pode ser revertida e tornar-se hematopoeticamente ativa se houver uma demanda prolongada, bem como em casos de anemia hemolítica crônica. Então, a hematopoese pode ser expandida pelo aumento do volume da medula vermelha (ABBOUD; LICHTMAN, 2006; HUTCHISON; DAVEY, 1999).

No processo de hematopoese grande quantidade de proteínas e demais nutrientes são requeridos, por isso em casos de desnutrição protéico-energética (DPE) é comum o encontro de alterações hematológicas (SOBRINHO et al., 1979).

### 2.3.2 Hematopoese

As células do sangue (eritrócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas) são constantemente removidas e para manter a homeostase cada sistema deve ser capaz de se renovar. A renovação e proliferação celular ocorrem por divisão celular e maturação. Esse sistema de renovação contém células-tronco hematopoéticas (*stem cells*), que podem ser definidas como células capazes de originar células filhas com aparência e potencial idênticos à célula mãe (autorrenovação), bem como serem capazes de diferenciação celular (BONDURANT; KOURY, 1999; HUTCHISON; DAVEY, 1999). As células-tronco hematopoéticas mais primitivas são caracterizadas por expressarem o seguinte fenótipo: CD34+/CD45-/CD38-/Rh-123 de baixa retenção (CARVALHO et al., 2009).

A produção de células sanguíneas (hematopoese) inicia-se no primeiro mês de vida pré-natal, ainda na fase embrionária, quando surgem as primeiras células no saco vitelino. Há o predomínio de eritroblastos primitivos, que são grandes e megaloblásticos (HUTCHISON; DAVEY, 1999). As *stem cells* embrionárias migram para o fígado, baço, medula óssea e timo, que passam a constituir os órgãos hematopoéticos.

A partir da sexta semana já é detectada a hematopoese hepática. Porém, a partir da segunda metade da vida fetal, a medula óssea torna-se cada vez mais importante na produção das células sanguíneas, enquanto o papel do fígado diminui. Logo após o nascimento, as células-tronco hematopoéticas e as células progenitoras comprometidas são mantidas na medula, que passa a ser o principal órgão hematopoético em condições normais (HUTCHISON; DAVEY, 1999). As células progenitoras comprometidas sofrem influência de diversos fatores e citocinas, de modo que aquelas comprometidas com a linhagem linfóide dão origem aos precursores de linfócitos e células *natural killer* (NK), enquanto as progenitoras mieloides originam as unidades formadoras de colônias (*colony-forming unit* – CFU) com os precursores de eritrócitos e megacariócitos; e granulócitos e macrófagos (KAUSHANSKY, 2006).

O termo eritropoese refere-se à produção de células vermelhas do sangue, os eritrócitos. É um processo altamente regulado por fatores de transcrição e citocinas, principalmente pela eritropoetina, que influencia o comprometimento, proliferação, apoptose, diferenciação e o número de divisões desde as células progenitoras

jovens até os eritroblastos tardios. A produção é alterada de acordo com a oxigenação tecidual, envolvendo um mecanismo sincronizado entre a resposta celular, metabolismo de ferro e hemoglobina, entre outros, assegurando a produção de células vermelhas para satisfazer as necessidades corpóreas. Quando uma célula precursora multipotente é comprometida com essa linhagem, sofre sucessivas divisões e alterações morfológicas até serem reconhecidos os eritroblastos, precursores eritroides (PRCHAL, 2006a).

Por outro lado, a granulopoese refere-se à produção dos granulócitos, células brancas do sangue, e ocorre de forma semelhante para os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Neste caso, a produção medular sofre ação principalmente de três citocinas: IL-3, GM-CSF e fator estimulante de colônia de granulócitos (*Granulocyte Colony Stimulating Factor* – G-CSF). Um dos fatores que pode acelerar esse processo é a presença de inflamação (SMITH, 2006). O mieloblasto é a célula mais imatura comprometida com a granulopoese e é idêntico morfológicamente para os três tipos de granulócitos. Segue-se uma sequência de maturação até a formação final de granulócitos com seus grânulos específicos e segmentação nuclear, por isso também denominados de polimorfonucleares (PMN) (BONDURANT; KOURY, 1999).

As principais características morfológicas dos tipos celulares presentes na medula óssea normal (ALVES, 2009; HAYHOE; FLEMANS, 1989; HOFFBRAND; PETTIT, 1991; LOFFLER; RASTETTER, 2002; RYAN; FELGAR, 2006) são brevemente descritas abaixo:

### Série eritrocítica

As formas mais jovens são denominadas de eritroblastos ou normoblastos. Durante a diferenciação, o núcleo progressivamente se torna menor e a cromatina nuclear mais condensada, bem como a ocorrência de um decréscimo na capacidade proliferativa. O citoplasma gradualmente perde a cor azulada, dada pelo ácido ribonucleico (RNA), que é substituído pela coloração rósea da hemoglobina e ocorre a perda do núcleo.

*Proeritroblasto*: célula grande com cerca de 15 a 20  $\mu\text{m}$ , núcleo ocupa quase toda a célula. Cromatina está presente com um padrão fino reticular ou pontilhado, porém é mais densamente corada do que a cromatina do mieloblasto. Nucléolos estão

presentes e normalmente azulados. Citoplasma tipicamente mais basofílico do que no mieloblasto.

*Eritroblasto basófilo*: menor do que a anterior e o núcleo ocupa menos espaço da célula. O padrão da cromatina é pontilhado e massas pequenas condensadas da cromatina são definidas e separadas por porções pálidas. O citoplasma é intensamente basofílico.

*Eritroblasto policromatófilo*: célula com cerca de 8 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, núcleo ocupa ainda menos espaço na célula, o padrão da cromatina é mais condensado com grandes massas definidas e separadas por porções pálidas. O citoplasma é cinza ou rosa-acinzentado devido à intensa síntese de hemoglobina.

*Eritroblasto ortocromático*: apenas ligeiramente maior do que o eritrócito maduro com 7 a 10  $\mu\text{m}$  de diâmetro, núcleo pequeno e picnótico. Citoplasma com coloração muito semelhante a dos eritrócitos maduros.

*Reticulócito*: frequentemente um pouco maior do que os eritrócitos adultos e não possui núcleo. Visível após a coloração supravital com azul brilhante de cresil, enquanto nas preparações pelo método de Romanowsky pode, algumas vezes, ser detectado pela coloração azul ou púrpura (policromasia).

*Eritrócito*: célula vermelha madura desprovida de núcleo com cerca de 7 a 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro. É caracterizada pela coloração mais fraca no centro do que na periferia devido à sua estrutura bicôncava.

Os eritroblastos dispõem-se em agrupamentos denominados ilhotas eritroblásticas. No centro das ilhotas pode ser identificado um macrófago com prolongamentos citoplasmáticos envolvendo os eritroblastos.

### Série granulocítica ou mieloide

Referem-se às células precursoras ou maduras dos leucócitos caracterizados por grânulos neutrofílicos, eosinofílicos ou basofílicos no citoplasma, nos estágios mais maduros do desenvolvimento. Sofrem gradual redução do tamanho nuclear, maior condensação da cromatina e segmentação nuclear.

*Mieloblasto*: seu diâmetro varia de 12 a 20  $\mu\text{m}$ , o núcleo ocupa quase toda a célula, cromatina muito fina, com dois a cinco nucléolos presentes. Citoplasma basofílico, porém menos do que as células da série eritroide. Grânulos não estão presentes.

*Promielócito*: maior do que o mieloblasto com 20 a 25  $\mu\text{m}$  de diâmetro, o padrão da cromatina é mais grosseiro do que o célula anterior, mas nucléolos usualmente estão presentes. Citoplasma basofílico com área clara do complexo de Golgi que é caracterizada por um pequeno número de grânulos vermelhos – primários, não específicos = grânulos azurófilos.

*Mielócito*: ligeiramente menor do que o prómielócito, seu diâmetro varia de 14 a 20  $\mu\text{m}$ , é a célula mitótica mais madura da linhagem mieloide. Núcleo redondo ou oval e geralmente excêntrico. A cromatina é mais condensada e sem nucléolos. A principal característica é a presença de grânulos específicos no citoplasma ligeiramente basofílico, que identificam a linhagem celular. Os grânulos podem ser neutrofílicos (finos, de tamanho variável, cor lilás); eosinofílicos (grandes, redondos, laranja-avermelhado); ou basofílicos (maiores, tamanho irregular, azul escuro). Os grânulos aparecem primeiramente na área perinuclear.

*Metamielócito*: tamanho semelhante ao mielócito, apresenta núcleo entalhado em formato de ferradura ou de “U”, cromatina mais condensada e citoplasma menos basofílico.

*Bastão*: é caracterizado por um núcleo com cromatina densa com formato de ferradura ou lobulado, mas não segmentado; os lobos rudimentares são unidos por uma espessa banda de cromatina. Citoplasma rosa amarelado ou quase incolor.

Grânulos específicos da linhagem são abundantes no citoplasma. O diâmetro das formas bastão e segmentada varia de 10 a 15  $\mu\text{m}$ .

*Granulócitos segmentados* (polimorfonucleares): diferem dos bastões pela segmentação nuclear (multilobulados). Pelo menos dois lobos separados são necessários para definir, com ou sem a visualização de um fino filamento unindo-os. Cromatina nuclear é muito densa. O eosinófilo maduro tipicamente tem dois lóbulos, enquanto o núcleo da maioria dos neutrófilos tem dois a quatro lóbulos. Os núcleos dos basófilos frequentemente estão cobertos por grânulos basofílicos abundantes.

### Série monocítica

*Monócitos*: nesta série na medula óssea são idênticos morfológicamente àqueles encontrados no sangue, isto é, são pleomórficos cujo tamanho varia de 12 a 20  $\mu\text{m}$ . Seu citoplasma frequentemente possui bordas irregulares e cora-se de azul-acinzentado, o núcleo raramente é redondo e geralmente possui entalhes e lobulações (reniforme), seu padrão de cromatina é delicado e frouxo raramente com nucléolos. Os promonócitos têm cromatina muito delicada, nucléolos visíveis, frequentemente com poucos finos grânulos e citoplasma um pouco mais basofílico.

*Macrófagos (histiócitos)*: derivados dos monócitos, porém são maiores. Núcleo oval com cromatina delicada reticular e um ou dois pequenos nucléolos. O citoplasma varia do cinza azulado até o pálido e incolor e podem conter células fagocitadas, detritos de células em degeneração e vacúolos. Quando no seu interior são visualizados restos de núcleos fagocitados são denominados de *tart-cell* ou células em torta (HAYHOE; FLEMANS, 1989), e no caso de eritrócitos ou precursores de células sanguíneas fagocitados denomina-se hemofagocitose.

### Série megacariocítica

*Megacarioblastos*: são os precursores da série com 8 a 24  $\mu\text{m}$ , citoplasma basofílico, sendo que as menores formas são diploides.

*Pró-megacariócitos*: medem cerca de 30  $\mu\text{m}$ , o citoplasma é mais abundante e menos basofílico com núcleo lobulado e intensa endomitose.

*Megacariócitos*: células facilmente reconhecidas pelo seu grande tamanho, 30 a 150  $\mu\text{m}$ . Coloração sombreada, citoplasma azul ou eosinofílico, e as células mais maduras contêm grânulos vermelhos. Apresentam núcleo polilobulado irregularmente e desprovido de nucléolo. Plaquetas adjacentes podem ser visualizadas do centro para a periferia.

### Série linfocítica

*Linfócitos*: semelhantes aos encontrados no sangue periférico, com 5 a 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro, núcleo redondo ou riniforme corado por púrpura com cromatina densa ocupando aproximadamente 90% da célula. Número variável, dependendo do nível de hemodiluição. As células linfoides mais jovens têm alta razão entre núcleo e citoplasma, a cromatina é moderadamente densa, mas finamente distribuída e com nucléolos. São mais frequentemente vistos em crianças.

*Plasmócitos*: variam em tamanho de 14 a 20  $\mu\text{m}$ , são redondos ou ovais. Núcleo redondo excêntrico e densamente corado por púrpura. Cromatina grosseira e aglutinada e nucléolos não são visíveis. Citoplasma azul escuro (basofílico), frequentemente com zona clara perinuclear. Na medula normal são encontradas formas binucleadas.

As células de Mott também podem ser encontradas e correspondem a plasmócitos diferenciados produtores de anticorpos. São caracterizadas por inclusões citoplasmáticas (corpos de Russell) ou nucleares (corpos de Dutcher) contendo as imunoglobulinas. Plasmócitos flamejantes são caracterizados pelo citoplasma eosinofílico na sua periferia, contrastando com a basofilia do restante do citoplasma (HAYHOE; FLEMANS, 1989; HOFFBRAND; PETTIT, 1991).

### Outros tipos celulares

*Mastócitos*: reconhecidos por grânulos azul escuro e usualmente preenchem completamente o citoplasma e podem obscurecer o núcleo, que quando visto é redondo ou oval com cromatina de padrão vesicular. Na medula normal são encontrados em pequeno número.

*Células adiposas*: representam um constituinte importante da medula óssea e são utilizadas comparativamente para avaliar a quantidade de tecido hematopoético na medula normal. Sua morfologia simples não representa dificuldade na identificação. A quantidade do tecido adiposo aumenta com a idade e é o elemento predominante no idoso.

*Osteoclastos e osteoblastos*: são incomuns, vistos mais frequentemente na medula de crianças e adultos com hiperparatireoidismo ou reações osteoblásticas a tumor. Os osteoclastos são grandes, 100  $\mu\text{m}$ , lembram os megacariócitos, mas contêm múltiplos núcleos separados com cromatina fina e nucléolos. Os osteoblastos são células ovais, 30  $\mu\text{m}$  no maior diâmetro, frequentemente vistas em grupos e com núcleos excêntricos quase saindo da célula.

### 2.3.3 Análise da medula óssea

A avaliação microscópica da medula óssea é essencial na investigação de várias desordens hematológicas. A medula deve ser examinada quando o histórico clínico, contagem celular no sangue periférico ou outros testes laboratoriais sugerirem a possibilidade de uma desordem hematológica primária ou secundária, na qual o seu estudo possibilite o diagnóstico, acompanhamento da doença e a avaliação da resposta ao tratamento (KNOWLES; HOFFBRAND, 1980a; RYAN; FELGAR, 2006). São exemplos de situações onde a observação medular pode ser útil: leucopenia, trombocitopenia, anemias carenciais, talassemia e outros tipos de anemia (RYAN; FELGAR, 2006); distúrbios imunológicos, toxicológicos, oncológicos e hematopoéticos (BURKHARDT; FRISCH; BARTL, 1982; KNOWLES; HOFFBRAND, 1980a; WILKINS, 1992). Além disso, o diagnóstico de doenças

infectoparasitárias, especialmente em indivíduos imunossuprimidos, tem sido realizado pela cultura do tecido medular (LORAND-METZE, 2009).

Quando da indicação de análise medular, deve-se avaliar a necessidade de aspirado ou biópsia. Este estudo deve ser baseado no conhecimento do tecido hematopoético normal, suas diferentes linhagens celulares, variações dependentes da idade, e integrado com os dados clínicos e laboratoriais do paciente (ALVES, 2009; LORAND-METZE, 2009).

A biópsia de medula óssea (BMO) é um incômodo procedimento para o paciente e oferece alguns riscos, portanto, deve ser realizada somente quando há uma clara indicação clínica (BAIN, 2001b), normalmente como exame complementar aos achados no sangue periférico e aspirado medular. A histologia é indicada principalmente para diagnóstico e avaliação de prognóstico nas síndromes mielodisplásicas, leucemia mieloide crônica, mielofibrose e mieloesclerose (WINFIELD; POLACARZ, 1992). Permite avaliar a quantidade do tecido hematopoético (celularidade), estrutura e arquitetura medular, seu estroma e a ocorrência de granulomas, fibrose, necrose e metástases de neoplasias, sendo útil, ainda, nos casos de falha ou aspirado inadequado (ALVES, 2009; BAIN, 2001b; CURY, 2003; KNOWLES; HOFFBRAND, 1980a; LOKEN et al., 2009; LORAND-METZE, 2009; RYAN; FELGAR, 2006).

O mielograma (punção aspirativa) é um procedimento mais simples e confortável do que a BMO (CURY, 2003). A citologia oferece qualidade na análise morfológica, pois preserva indiscutivelmente as características minuciosas das células hematopoéticas, permite quantificá-las e a realização de estudo citotóxico completo. Um exemplo são as granulações celulares que são menos visíveis na biópsia do que na punção aspirativa (ALVES, 2009, BAIN, 2001b; KNOWLES; HOFFBRAND, 1980a; LOKEN et al., 2009; LORAND-METZE, 2009; RYAN; FELGAR, 2006).

Para a realização do aspirado ou da biópsia medular, o melhor local é a crista ilíaca posterior. Em adultos pode-se utilizar também o esterno ou crista ilíaca anterior para aspirado, enquanto em crianças menores de um ano (particularmente os recém-nascidos) a tíbia é outra opção (BAIN, 2001a; RYAN; FELGAR, 2006). Quando ambos são necessários a crista ilíaca posterior é o local de eleição (KNOWLES; HOFFBRAND, 1980a). Anestesia e sedação são úteis para reduzir a

ansiedade e, como salienta Bain (2001a), a preocupação com relação ao conforto e segurança do paciente deve estar sempre presente.

A preparação a partir do aspirado medular (esfregaço) deve ser feita imediatamente após a coleta, antes do material coagular ou ser manipulado. Após a aspiração, aproximadamente 0,5 mL (uma gota) do material sem qualquer anticoagulante é colocado em lâmina de vidro limpa e desengordurada. Ao restante é adicionado anticoagulante, porém não em excesso, e reservado para outras análises que sejam necessárias (citogenética, bioquímica, inoculação em meio de cultura) (BAIN, 2001a; KNOWLES; HOFFBRAND, 1980b; RYAN; FELGAR, 2006). A escolha do anticoagulante, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) ou heparina, é feita de acordo com os testes complementares a serem realizados (BAIN, 2001a). O excesso de EDTA ou heparina pode resultar em prejuízo à qualidade da coloração e artefatos tais como, aglutinação de leucócitos e plaquetas e precipitação de proteínas (DALAL; BRIGDEN, 2002).

As lâminas devem ser completamente secas antes de serem fixadas a fim de evitar artefatos, como por exemplo a aparente dispersão do conteúdo nuclear para o citoplasma dos eritroblastos, um aspecto que pode ser mal interpretado como diseritropoese. Quando seca, a lâmina deve ser cuidadosamente fixada em metanol ou outro fixador indicado para a citoquímica (HUTCHISON; DAVEY, 1999). Bain (2001a) recomenda para os esfregaços a utilização de corantes derivados de Romanowsky, com preferência à coloração de May-Grümwald Giemsa. É uma excelente opção para a avaliação citológica da medula óssea devido às suas qualidades tintoriais o que é fundamental para obter-se um resultado seguro, além da rapidez no tempo de coloração. Como os esfregaços de medula óssea são mais espessos e têm maior celularidade do que os de sangue periférico pode ser necessário maior tempo de coloração ou dupla coloração para melhor qualidade (HUTCHISON; DAVEY, 1999). Para avaliação dos estoques de ferro, o ideal é que seja confeccionada uma lâmina, com pelo menos um fragmento, corada pela técnica de Perls. Como em qualquer outra rotina, as lâminas coradas devem ser identificadas com o nome do paciente, data (não omitindo o ano) e número de registro, quando houver (BAIN, 2001a).

A qualidade do aspirado é altamente dependente do procedimento usado para a obtenção da medula. Frequentemente há quantidade variável de contaminação com células maduras do sangue periférico, sendo que grandes

alíquotas aumentam a contaminação (hemodiluição). Para contornar esse problema, deve-se coletar o mínimo necessário ou dispor a primeira alíquota para a realização do esfregaço, substituindo a agulha em seguida. Neutrófilos maduros correspondem a uma população celular que está predominantemente no sangue com poucas formas na medula. É, portanto, uma população para avaliação da contaminação, sendo aceitável uma proporção de no máximo 30% no aspirado de medula óssea (BAIN, 2001a; LOKEN et al., 2009; RYAN; FELGAR, 2006).

Assim, a primeira questão na interpretação da medula é se a amostra é adequada para o diagnóstico. No momento do procedimento, a presença de partículas da medula no aspirado é o melhor indicador de que a agulha penetrou a cavidade medular e foi aspirada com sucesso. Os fragmentos medulares são ossos com aparência brilhante devido às partículas de gordura. Espécimes contendo osso cortical, músculo ou outro tecido com pouca ou nenhuma medula são inadequados para interpretação do mielograma. A cavidade medular foi obtida se o aspirado apresentar partículas medulares ou precursores hematopoéticos (megacariócitos e células vermelhas nucleadas) não encontrados no sangue periférico (RYAN; FELGAR, 2006).

A avaliação da celularidade pela observação direta do aspirado é mais difícil devido à perda da estrutura histológica e à mistura com sangue periférico. Porém, pode ser estimada pela observação cuidadosa das espículas presentes no esfregaço que funcionam como “mini-biópsias” e contêm elementos hematopoéticos e gordurosos suficientes para dar uma ideia da celularidade. Por outro lado, a avaliação da celularidade pelo *buffy coat* após a centrifugação do aspirado não é real (RYAN; FELGAR, 2006).

Entende-se por celularidade a quantidade de tecido hematopoético aproximada em relação ao tecido adiposo dentro da cavidade medular, expressa em porcentagem. A celularidade da medula óssea depende ainda da idade e local da punção, entretanto, as biópsias geralmente são consideradas como normais se 40-60% das células são hematopoéticas, variando de 100% em recém-nascidos até 20% nos mais idosos (WILKINS, 1992). Pode-se também considerar três fases de involução: 1) até os 35 anos o tecido hematopoético ocupa mais de 50% dos espaços medulares, chegando a 80% ou 90% na criança; 2) de 35 a 60 anos é em torno de 50%; e 3) após os 65 anos é inferior a 40% (ALVES, 2009).

Em objetiva de menor aumento (10x), avalia-se a presença de células adiposas e hematopoéticas nas partículas e o número de megacariócitos. O número de megacariócitos é bastante variável nos aspirados de pessoas normais e também é dependente da hemodiluição (RYAN; FELGAR, 2006). Em seguida os esfregaços devem ser observados em objetiva de imersão para determinar os tipos celulares presentes e avaliar a adequada diferenciação de cada linhagem hematopoética. O reconhecimento morfológico das células da medula inclui granulócitos maduros e seus precursores, precursores eritroides, linfócitos nos vários estágios de desenvolvimento, plasmócitos, monócitos, macrófagos (histiócitos), células estromais, megacariócitos e mastócitos. Pode ser realizada uma contagem diferencial de 300 a 500 células nucleadas, preferencialmente células próximas à espícula (LOKEN et al., 2009; WILKINS; O'BRIEN, 1988). A proporção de neutrófilos segmentados aumenta com os maiores volumes de aspirado, provavelmente devido à diluição das células medulares pelos leucócitos maduros do sangue (FADEM; BERLIN; YALOW, 1951; RYAN; FELGAR, 2006).

A razão entre granulócitos e eritrócitos (RGE) frequentemente é calculada pela relativa celularidade dessas duas linhagens e em medulas normais varia de 1,5:1 a 5:1, dependendo da idade. Um decréscimo nesta razão deve ser interpretado como hipocelularidade mieloide ou hiperplasia eritroide (ALVES, 2009; RYAN; FELGAR, 2006).

#### **2.4 Medula óssea na leishmaniose visceral**

Quando da suspeita de LV, o material mais utilizado para a pesquisa parasitológica é o aspirado de medula óssea, uma vez que a biópsia não favorece a identificação morfológica do parasita com nitidez (KUMAR et al., 2007). Após a preparação do esfregaço, a lâmina deve ser analisada em objetiva de 100x com óleo de imersão, em busca das formas amastigotas em pelo menos 1000 campos. As formas parasitárias possuem contorno ovóide, às vezes elíptico ou fusiforme, com pequenas dimensões (2 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento por 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  de largura) e, quando coradas pela técnica de Giemsa, caracterizam-se pelo núcleo vermelho-lilás e pelo cinetoplasto, em formato de bastão reto ou curvo quase sempre tangente ao núcleo, com coloração mais pronunciada, violeta (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 1996; REY, 2001a). As amastigotas podem ser

visualizadas no interior de células fagocíticas ou livres no esfregaço, e o microscopista deve estar atento para não confundi-las com plaquetas ou outros possíveis artefatos presentes.

A presença do parasita nos esfregaços é variável e estudos no Brasil têm descrito taxas de 75,5% a 83,6% entre crianças e adolescentes (PASTORINO et al., 2002; PEDROSA; ROCHA, 2004; QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004). A positividade do mielograma é dependente de fatores relacionados à técnica (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005) e à evolução da doença, como relatado por Brustoloni et al. (2007) que associaram a positividade no parasitológico direto ao tamanho do baço de crianças com LV no Mato Grosso do Sul. No entanto, Wickramasinghe, Abdalla e Kasili (1987) não encontraram relação da densidade parasitária na medula com a atividade da doença julgada pelo tamanho do baço.

Estudos com cobaias têm confirmado a medula óssea como local de persistente parasitismo e que, assim como o baço, sofre rápido acúmulo de amastigotas. Indicam uma acentuada associação entre as alterações na mielopoese, provavelmente orientadas por fatores estimulantes de colônia (CSF) e a expansão do parasita no local. A infecção por *L. donovani* seria responsável por um aumento do número de células progenitoras hematopoéticas na medula óssea, bem como no sangue periférico de BALB/c (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000a).

Ao contrário do que parece ocorrer em infecções por alguns vírus (Citomegalovírus – CMV, hepatites A ou B, dengue) nas quais há redução do número de células progenitoras, provavelmente devido à replicação desses agentes em subpopulações destas células resultando em toxicidade ou alterações na capacidade proliferativa das mesmas (GIBBONS; PRICE; SHELLAM, 1995), somente células estromais com características de macrófagos são hábeis a permitir longa infecção por *L. donovani*. Uma vez que as células progenitoras CD34 não parecem ser metas da infecção, as possíveis anormalidades na hematopoese na LV não podem ser atribuídas à infecção direta dessas células. Assim, a potencial modulação de hematopoese seria via efeito na função de macrófagos estromais acarretando alterações na produção de citocinas e fatores de crescimento de colônias e alterações no microambiente (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000a; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987).

A avaliação do tecido medular é variável em virtude da coleta ser realizada em diferentes fases da evolução da parasitose (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG,

1948). De modo geral, os estudos da medula óssea de pacientes com LV têm relatado uma apresentação de normo a hiperclular (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948; EL-SHOURA, 1994; KUMAR et al., 2007; RAI et al., 2008; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987).

Antes do tratamento, mostra-se com aumento da atividade eritropoética e diseritropoese, evidenciadas pela presença de aglomerados de eritroblastos e de deformações nucleares da série eritroide, eritroblastos binucleados ou multinucleados e megaloblastos (BRASIL, 2006b; SHAHRIAR et al., 1999; EL-SHOURA, 1994; KAGER; REES, 1986; KUMAR et al., 2007; RAI et al., 2008; SHEIKHA, 2004; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987).

Quanto à série granulocítica, normalmente é descrita uma redução geral e dos neutrófilos segmentados, com tendência de aumento das células mais jovens, promielócitos e mielócitos neutrófilos (BRASIL, 2006b; CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948). Por outro lado, Rai et al. (2008) relataram predomínio de células em processo final de maturação com poucos precursores presentes. Os eosinófilos (metamielócitos e células maduras) na maioria dos casos estão ausentes ou diminuídos (BRASIL, 2006b; CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948; RAI et al., 2008).

Como consequência da hiperplasia eritrocítica e/ou hipoplasia granulocítica, ocorre alteração da RGE, podendo estar invertida ou próxima de 1:1 (KUMAR et al., 2007; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987).

Há controvérsias quanto à população linfocitária, pois enquanto alguns autores relatam linfocitose absoluta (BRASIL, 2006b), outros descrevem linfopenia (SHAHRIAR et al., 1999). Ocorre um incremento no número de plasmócitos, por vezes contendo dois ou mais núcleos e visualizados em aglomerados. Células de Mott também podem ser ocasionalmente encontradas (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948; KUMAR et al., 2007).

Os megacariócitos apresentam-se normais, reduzidos ou aumentados, porém a atividade plaquetária pode estar diminuída ainda que a contagem de megacariócitos esteja normal (BRASIL, 2006b; CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948; KUMAR et al., 2007; RAI et al., 2008; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987).

Um consenso na avaliação da medula óssea na LV tem sido o acentuado aumento de macrófagos (BRASIL, 2006b; CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948).

Baço, fígado e linfonodos, assim como a medula óssea, também podem apresentar esse aumento de histiócitos com proeminente hemofagocitose, isto é, fagocitose de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e seus precursores por macrófagos (FISMAN, 2000).

Essa síndrome, também denominada de Linfohistiocitose Hemofagocítica (LHH) é caracterizada pela ativação inapropriada de linfócitos que produzem altas concentrações de citocinas, com resultante proliferação e atividade descontrolada, porém não maligna dos macrófagos. Sua severidade varia de média a grave sendo usualmente fatal se não tratada. Segundo a Sociedade de Histiocitose (protocolo HLH-2004) (HENTER et al., 2007), para o diagnóstico de LHH deve-se preencher cinco dos oito itens seguintes: febre, esplenomegalia, citopenias afetando duas ou três linhagens no sangue periférico (hemoglobina < 90 g/L, plaquetas <  $100 \times 10^9/L$ ; neutrófilos <  $1.0 \times 10^9/L$ ), hipertrigliceridemia ( $\geq 265$  mg/dL) e/ou hipofibrinogenemia ( $\leq 1.5$  g/L), evidência tissular de hemofagocitose, ausência ou pouca atividade de células *natural killer* (NK), hiperferritinemia ( $\geq 500$   $\mu\text{g/L}$ ) e elevados níveis de receptor IL-2 solúvel ( $\geq 2,400$  U/mL).

Embora a LHH secundária à LV seja relatada como uma desordem rara, o diagnóstico de ambas pode ser dificultado quando associadas (AGARWAL et al., 2006; EL-SHOURA, 1994; KILANI et al., 2006; KUMAR et al., 2007; MATHUR; SAMANTARAY; SAMANTA, 2007; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987). Enquanto o tratamento da LHH hereditária é baseado em imunoterapia, incluindo dexametasona, ciclosporina e etoposide, nos casos secundários a LV frequentemente há boa resposta com o tratamento da infecção primária, desde que o diagnóstico etiológico seja obtido em tempo útil (FILIPOVICH, 2008; FISMAN, 2000; JANKA; ZUR STADT, 2005).

Embora os macrófagos sejam as células de eleição para o parasitismo, alguns estudos relatam a presença de formas amastigotas de *L. donovani* ocasionalmente em neutrófilos e eosinófilos da medula óssea (EL-SHOURA, 1994; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987).

Shariar et al. (1999) relataram a presença de expansões citoplasmáticas (*blebbing*) de granulócitos e macrófagos e posterior desprendimento de parte do citoplasma dessas células formando estruturas reconhecíveis no esfregaço. Denominaram de *granular stippling* (GS) a esfoliação citoplasmática da série granulocítica e de *basophilic bare cells* (BBC) frações citoplasmáticas e dos

vacúolos parasitóforos de macrófagos ativados. São descritos ainda, ocasionais metamielócitos gigantes e megaloblastos (SHAHRIAR et al., 1999; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987).

Muitas desordens, de origem infecciosa ou não, podem causar formação de granuloma na medula óssea, mas a LV normalmente não é relatada entre elas (EID; CARION; NYSTROM, 1996; PEASE, 1956). No entanto, Kumar et al. (2007) descreveram várias alterações histológicas na biópsia de medula óssea como consequência de LV, tais como, granulomas, hiper celularidade, nódulos linfoides benignos, fibrose e necrose, e as relacionaram com a responsividade ao tratamento e prognóstico. Pacientes com medula hiper celular e nódulos linfoides responderam bem à terapia com glucantime, enquanto os pacientes com fibrose e necrose morreram apesar de terem recebido o mesmo tratamento. Casos que apresentaram granulomas responderam bem à anfotericina B. Por outro lado, Rocha Filho et al. (2000), utilizando glucantime, não encontraram diferenças significativas nos parâmetros clínicos e laboratoriais (hepatoesplenomegalia, hemograma, plaquetas e proteínas séricas), havendo tendência à regressão da hepatoesplenomegalia e melhora dos parâmetros laboratoriais independentemente da presença de mielofibrose secundária à LV, concluindo que a fibrose pode ser transitória, não interferindo na evolução ou na resposta a esse medicamento.

Após a terapia anti-*Leishmania*, além da ausência dos parasitas, ocorre redução gradual dos histiócitos com o aumento de neutrófilos e eosinófilos; linfócitos tornam-se mais numerosos, enquanto as células plasmáticas diminuem; os eritrócitos nucleados tornam-se menos numerosos e morfologicamente normais; RGE retorna ao normal; aumenta o número relativo de megacariócitos e a formação de plaquetas é acelerada (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948), com tendência à normalização da celularidade global da medula (KUMAR et al., 2007; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987).

Devido às alterações hematológicas observadas nas diferentes formas clínicas da LV, deve-se atentar para possíveis comorbidades que tenham quadro clínico semelhante tais como leucemias e mielodisplasia. São relatados casos de associação da parasitose com leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfóide aguda (LLA) e síndrome mielodisplásica nas três linhagens (FAKHAR et al., 2008; SAH et al., 2002; YARALI et al., 2002).

Segundo Desjeux (2004), a pesquisa básica deve ter como objetivo a obtenção de avanços para aperfeiçoamento do diagnóstico, novos medicamentos e vacinas que sejam viáveis e acessíveis ao paciente, principalmente de doenças negligenciadas como a leishmaniose. Portanto, diante de todas essas complicações hematológicas promovidas pelo parasitismo e das dificuldades em relação a diagnóstico e tratamento, tornam-se necessárias pesquisas geradoras de conhecimentos aplicáveis na rotina possibilitando redução da morbidade e mortalidade na LV.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar as lâminas de medula óssea, dados clínicos e laboratoriais de pacientes portadores de Leishmaniose Visceral atendidos no Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, diagnosticados no período de 2003 a 2008.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Traçar o perfil epidemiológico e clínico-laboratorial dos pacientes com leishmaniose visceral.

3.2.2 Analisar a celularidade das amostras de medula óssea de acordo com o grupo etário dos pacientes.

3.2.3 Descrever as alterações observadas nos esfregaços de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral.

3.2.4 Associar as alterações encontradas no material de medula óssea com alguns resultados laboratoriais dos pacientes com leishmaniose visceral.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Tipo de pesquisa**

Trata-se de uma pesquisa de corte transversal. Foram analisados dados secundários obtidos dos registros de prontuários dos pacientes e as lâminas utilizadas para o diagnóstico parasitológico de LV.

### **4.2 Local e período da pesquisa**

Os dados dos registros de prontuários foram obtidos diretamente na Seção de Arquivos Médicos (SAME) do Núcleo do Hospital Universitário da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (NHU/UFMS), que é referência para o diagnóstico e tratamento de LV no Estado.

A observação das lâminas de medula óssea foi realizada no Laboratório de Parasitologia / Departamento de Patologia / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / UFMS, onde as mesmas estão armazenadas. Na rotina de suas atividades estão incluídas a pesquisa do agente etiológico por meio de diagnóstico parasitológico direto em lâmina, ou indireto, a partir de cultura em meio bifásico (fase sólida Nicole, Novy e McNeal – NNN e fase líquida Schneider), a qual é mantida por quatro semanas em estufa com temperatura adequada.

Foram analisados lâminas e dados de pacientes diagnosticados no período de janeiro/2003 a dezembro/2008.

### **4.3 Sujeitos da pesquisa**

Foram incluídos na pesquisa os pacientes encaminhados pelos Serviços de Infectologia e Pediatria do NHU/UFMS que tiveram diagnóstico de LV no Laboratório de Parasitologia entre os anos de 2003 e 2008, pela pesquisa direta do parasita em lâminas de esfregaço medular e/ou indiretamente pelo cultivo do material biológico em meio NNN/Schneider.

Aqueles que tiveram material enviado para análise por mais de uma vez, em momentos diferentes, foram considerados apenas como um (1) caso, perfazendo o total de 282 pacientes. Foram excluídos do estudo indivíduos cujas lâminas não

foram encontradas (sete) ou estavam inadequadas para análise devido ao desgaste da coloração (30) e aqueles cujos prontuários não foram localizados ou não continham informações (43), restando, portanto, 202 sujeitos.

#### **4.4 Aspectos éticos**

Por se tratar de uma pesquisa de dados secundários (lâminas utilizadas para o diagnóstico parasitológico de LV e registros de prontuários dos pacientes), foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Diante do termo de compromisso do pesquisador, foram obtidas autorizações para utilização do material biológico armazenado e para coleta de dados dos prontuários arquivados.

O presente trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e aprovado em 05 de junho de 2009, protocolo nº 1358 (Anexo A).

#### **4.5 Análise dos dados de prontuários**

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos pela análise dos prontuários dos pacientes, que se encontram arquivados na Seção de Arquivos Médicos (SAME) do Hospital Universitário (NHU/UFMS).

Foram avaliadas as seguintes variáveis: identificação, manifestações clínicas, comorbidades, dados laboratoriais, diagnóstico e tratamento .

Identificação: foram coletados dados referentes a idade do paciente, sexo e procedência.

Manifestações clínicas: verificou-se a queixa principal no momento da admissão, presença ou ausência de sinais e sintomas tais como febre, emagrecimento, hepatomegalia, esplenomegalia, tosse, palidez, astenia, cefaléia, mialgia, hiporexia, edema, dor abdominal, escurecimento da pele, náusea e vômito, diarreia, sudorese, calafrios, fenômenos hemorrágicos, icterícia e alteração da consciência.

Comorbidades: constatou-se a presença ou ausência de patologias, infecções ou outras condições concomitantes tais como desnutrição, insuficiência renal crônica (IRC), tuberculose (TB), doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), etilismo, insuficiência cardíaca congestiva (ICC), pneumonia, diabetes *mellitus* (DM), hipertensão arterial sistêmica (HAS), gestação, cirrose, hepatites virais ou não, hemoglobinopatias, citomegalovírus (CMV), vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus T-linfotrófico humano (HTLV), *Herpes zoster*, leucemias, mieloma múltiplo, lúpus eritematoso sistêmico (LES).

Diagnóstico: foram obtidos os resultados dos diferentes métodos de diagnóstico tais como parasitológico direto, cultura em meio NNN/Schneider, sorologia por IFI e teste rápido baseado no antígeno rK-39. Para a IFI, considerou-se o resultado positivo quando título igual ou maior a 1:80 (BRASIL, 2006b).

Tratamento: observou-se a terapia instituída considerando-se o medicamento escolhido (antimoniato, anfotericina B desoxicolato e/ou lipossomal) e a duração, em dias de tratamento. Foram coletadas informações de possíveis reações adversas e/ou efeitos colaterais, bem como informações de outros medicamentos em uso.

Dados laboratoriais: foram verificados os resultados laboratoriais do hemograma, proteínas totais e frações, triglicérides e velocidade de hemossedimentação (VHS) na admissão. Foram considerados como normais os parâmetros constantes nas figuras 1 e 2 (BACHORIK; RIFKIND; KWITEROVICH, 1999; LEHMANN; HENRY, 1999; PERKINS, 1999b).

	<b>Crianças</b>	<b>Adultos</b>
<b>Hematologia</b>		
Hemoglobina (Hb)	10,3 a 12,0 g/dL	12,3 a 17,4 g/dL
Hematócrito (Ht)	31,0 a 36,0%	36,0 a 50,0%
Leucócitos totais	4.500 a 12.000/mm <sup>3</sup>	4.400 a 11.300/mm <sup>3</sup>
Bastões	até 4,0%	até 3,0%
Segmentados	33,0 a 54,0%	36,0 a 60,0%
Eosinófilos	até 3,0%	até 3,0%
Basófilos	até 1,0%	até 1,0%
Linfócitos	38,0 a 61,0%	25,0 a 45,0%
Monócitos	até 5,0%	até 5,0%
Plaquetas	150.000 a 450.000/mm <sup>3</sup>	150.000 a 450.000/mm <sup>3</sup>
<b>Bioquímica</b>		
Proteínas totais	6,0 a 7,8 g/dL	6,0 a 7,8 g/dL
Albumina	3,2 a 4,5 g/dL	3,2 a 4,5 g/dL
Globulinas totais	2,3 a 3,5 g/dL	2,3 a 3,5 g/dL
Triglicerídeos	até 200 mg/dL	até 200 mg/dL

Figura 1 – Valores de referência dos exames laboratoriais para crianças e adultos (BACHORIK; RIFKIND; KWITEROVICH, 1999; LEHMANN; HENRY, 1999; PERKINS, 1999b)

<b>Faixa etária</b>	<b>Homens</b>	<b>Mulheres</b>
Até 50 anos	até 15mm/h	até 20mm/h
50 a 85 anos	até 20mm/h	até 30mm/h

Figura 2 – Valores de referência para a velocidade de hemossedimentação de acordo com sexo e idade (LEHMANN; HENRY, 1999)

#### 4.6 Análise das lâminas de medula óssea

Rotineiramente, quatro lâminas são confeccionadas para cada paciente imediatamente após a punção medular pelo médico. Essas lâminas são encaminhadas ao laboratório de Parasitologia, onde são fixadas e coradas pela técnica de Giemsa.

Todas elas foram observadas primeiramente em menor aumento (objetiva 10x) para que se pudesse avaliar a presença de espículas, trilhas e células no

esfregaço medular. Após, foram selecionadas para observação em maior aumento (objetiva 100x, com óleo de imersão) aquelas mais representativas do tecido medular e de adequada coloração, a fim de garantir uma avaliação morfológica de qualidade (NIERO-MELO et al., 2006).

Embora a histologia seja a técnica mais recomendada para confirmação da celularidade (ALVES, 2009; BAIN, 2001b; RYAN; FELGAR, 2006), não foi possível realizá-la por se tratar de um estudo retrospectivo. Assim, para estimar a celularidade nos esfregaços analisou-se a presença ou ausência de fragmentos medulares (espículas) e/ou aglomerados celulares, considerando-se como boa celularidade quando da observação de precursores e outras células típicas da medula óssea em quantidade adequada para a idade (NIERO-MELO et al., 2006).

Para avaliar a composição da medula óssea foram selecionadas partes da lâmina próximas às espículas e aos aglomerados, preferencialmente as trilhas a fim de reduzir o efeito da contaminação por sangue periférico (BAIN, 2001a; LOKEN et al., 2009; SABHARWAL et al., 1990), e considerou-se a diferenciação celular normal conforme já descrito.

Quando havia aparente alteração de determinada linhagem celular como plasmocitose, eosinofilia e histiocitose, realizou-se análise descritiva semi-quantitativa baseada nos valores de referência conforme consta na figura 3 (PERKINS, 1999b; RYAN; FELGAR, 2006). Nestes casos, foi feita uma estimativa baseada na contagem de 100 células nucleadas (SABHARWAL et al., 1990).

<b>Tipo celular</b>	<b>Crianças</b>	<b>Adultos</b>
Eosinófilos	1,0 a 5,0%	1,0 a 4,0%
Plasmócitos	0,0 a 1,4%	0,0 a 1,3%
Macrófagos/histiócitos	0,0 a 1,3%	0,0 a 1,3%

Figura 3 – Valores de referência para alguns tipos celulares na medula óssea de crianças e adultos (PERKINS, 1999b; RYAN; FELGAR, 2006)

Considerando que a punção medular se aplica principalmente a uma avaliação qualitativa quanto aos tipos celulares e adequada diferenciação de cada linhagem hematopoética, optou-se por uma análise descritiva baseada na presença ou ausência das alterações morfológicas em cada série. Considerou-se a presença

de atipias quando igual ou maior a 10% da linhagem em questão (NIERO-MELO et al., 2006).

Observou-se também a presença de outras estruturas no esfregaço tais como fragmentos de granulócitos (*granular stippling*), expansões citoplasmáticas (*blebbing*) em todas as séries e restos celulares (*basophilic bare cells*) de todos os tipos. Várias áreas de cada lâmina foram analisadas em objetiva de 100x com óleo de imersão durante uma hora, tempo recomendado para 95% de sensibilidade do parasitológico direto em esfregaço de medula óssea (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005; SABHARWAL et al., 1990).

As atipias avaliadas em cada série foram:

Série granulocítica: alterações megaloblastoides, hipogranularidade, *donut cells* (células em rosca), fragmentos nucleares, formas imaturas bizarras, atípicas, eosinofilia com ou sem granulações basofílicas (NIERO-MELO et al., 2006).

Série eritrocítica: formas megaloblastoides (núcleo em "fatia de salame"), mitoses anômalas (despolarizadas), multinuclearidade, apoptose (*cariorrexis*), falhas de hemoglobinizacão, vacuolizacão citoplasmática e pontes intercitoplasmáticas (NIERO-MELO et al., 2006).

Série megacariocítica: núcleos fragmentados (hipersegmentados), monofomas, microformas (tamanho de grandes linfócitos e monócitos e que tinha núcleo único ou bilobulado, com expansões citoplasmáticas na sua superfície e emperipolese caracterizada pela presença de outras células no seu citoplasma (MUHURY et al., 2009; NIERO-MELO et al., 2006).

O número de megacariócitos foi avaliado em menor aumento, sendo considerado como normal (uma célula por 1 a 3 campos), aumentado (mais de 2 por campo) ou diminuído (uma a cada 5-10 campos) (MUHURY et al., 2009).

Para estimar a densidade parasitária, após observacão de vários campos, contou-se 10 campos de imersão consecutivos, selecionados como representativos quanto à presença de amastigotas. Se o número de parasitas estava entre 50 e 100 ou se havia 2 ou 3 macrófagos repletos nos 10 campos, a amostra foi classificada na categoria de "muitos"; entre 10 e 50, na categoria "frequentes"; entre 5 e 10, na

categoria “poucos”; e se 1 ou 2 parasitas foram encontrados após extensiva pesquisa em 10 campos, “raros” (KUMAR et al., 2007).

#### **4.7 Organização e análise dos dados**

Os dados obtidos foram organizados e expostos sob a forma de apresentação tabular.

As análises descritivas foram realizadas por percentuais, média e mediana. Para verificar a associação entre as variáveis foi utilizado o teste estatístico Qui-Quadrado; para avaliação do número de comorbidades, o teste de Mann-Whitney; e para avaliação da concordância entre os métodos diagnósticos, teste de McNemar. Foram utilizados os *software SigmaStat* versão 2.0 e *BioEstat* 5.0 (AYRES et al., 2007), considerando nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais

Foram analisadas lâminas e prontuários de 202 pacientes. A maioria, 59,9% (121) foram crianças com idade de quatro meses até 13 anos e destes, houve predomínio do número de casos em pacientes com idade inferior a cinco anos (83 ou 68,6%).

Os pacientes com 14 anos ou mais (81 ou 40,1%) foram considerados adultos e a idade máxima foi de 83 anos, sendo que destes, o maior número de casos ocorreu na faixa etária de 20 até 39 anos (37 ou 45,7%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a faixa etária, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Idade	Crianças (n=121)			Adultos (n=81)			Total (n=202)		
	Nº.	%	%*	Nº.	%	%*	Nº.	%	%*
0 ┆ 1	14	11,6	11,6	-	-	-	14	6,9	6,9
1 ┆ 2	23	19,0	30,6	-	-	-	23	11,4	18,3
2 ┆ 5	46	38,0	68,6	-	-	-	46	22,8	41,1
5 ┆ 14	38	31,4	100,0	-	-	-	38	18,8	59,9
14 ┆ 20	-	-	-	6	7,4	7,4	6	3,0	62,9
20 ┆ 40	-	-	-	37	45,7	53,1	37	18,3	81,2
40 ┆ 60	-	-	-	28	34,6	87,7	28	13,9	95,1
60 ┆ 99	-	-	-	10	12,3	100,0	10	4,9	100,0

\* percentual acumulado

Quanto à distribuição por sexo, os homens foram maioria entre os adultos (57 ou 70,4%). O sexo masculino também foi mais prevalente no grupo infantil (55,4%), porém a diferença em relação ao percentual feminino foi menor (Tabela 2). A razão entre os sexos masculino/feminino foi de 2,4:1 para os adultos e de 1,2:1 para as crianças. Houve associação entre a idade e a prevalência do sexo, teste Qui-Quadrado  $p = 0,046$ .

Apenas 171 pacientes tinham o município de procedência registrado no prontuário. Desses, 75,4% eram da capital e 24,6% do interior (Tabela 3). Dos

municípios do interior citam-se: Três Lagoas (5,3%), Aquidauana (3,5%), Terenos (2,9%) e outros (12,9%).

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o sexo e o grupo etário, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Sexo	Crianças		Adultos		Total		p
	(n=121)		(n=81)		(n=202)		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Masculino	67	55,4	57	70,4	124	61,4	0,046
Feminino	54	44,6	24	29,6	78	38,6	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Tabela 3 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a procedência e o grupo etário, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Procedência	Crianças		Adultos		Total	
	(n=97)		(n=74)		(n=171)	
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%
Campo Grande	68	70,1	61	82,4	129	75,4
Outros	29	29,9	13	17,6	42	24,6

Na admissão, a queixa principal foi febre seguida de manifestações abdominais como distensão e dor, emagrecimento e hiporexia. Nos prontuários em que constava o período de início dos sintomas (172 pacientes), a procura pelo serviço de saúde demorou de um dia até um ano, com média de 34,6 dias e mediana de 15 dias. Entre as crianças esse período foi em média de 25,7 dias enquanto entre os adultos foi de 51,3 dias.

A tabela 4 mostra que os três sinais mais prevalentes estiveram presentes nos dois grupos, porém mais intensamente nas crianças. A febre foi o mais preponderante estando presente em 92,6% dos pacientes, destacando-se também esplenomegalia e hepatomegalia com alta frequência.

A palidez respondeu pelo quarto item mais comum entre as crianças (60,3%) enquanto o emagrecimento foi mais evidente entre os adultos (66,7%).

Tabela 4 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e os sinais e sintomas, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Sinais e sintomas	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Febre	118	97,5	69	85,2	187	92,6	0,003
Esplenomegalia	118	97,5	63	77,8	181	89,6	< 0,001
Hepatomegalia	109	90,1	57	70,4	166	82,2	< 0,001
Palidez	73	60,3	39	48,1	112	55,4	0,118
Hiporexia	61	50,4	41	50,6	102	50,5	0,977
Emagrecimento	44	36,4	54	66,7	98	48,5	< 0,001
Astenia	39	32,2	44	54,3	83	41,1	0,003
Tosse	52	43,0	30	37,0	82	40,6	0,486
Dor abdominal	38	31,4	27	33,3	65	32,2	0,893
Náusea/vômito	34	28,1	25	30,9	59	29,2	0,790
Diarréia	22	18,2	23	28,4	45	22,3	0,124
Cefaléia	11	9,1	17	21,0	28	13,9	0,029
Edema	12	9,9	15	18,5	27	13,4	0,121
Mialgia	1	0,8	16	19,8	17	8,4	< 0,001
Fenômenos hemorrágicos	8	6,6	8	9,9	16	7,9	0,564
Icterícia	3	2,5	12	14,8	15	7,4	0,003
Alteração de consciência	6	5,0	7	8,6	13	6,4	0,451
Sudorese	3	2,5	9	11,1	12	5,9	0,025
Calafrios	4	3,3	7	8,6	11	5,4	0,186
Escurecimento da pele	-	-	2	2,5	2	1,0	0,311

Nota: Cada paciente pode apresentar um ou mais sinais e/ou sintomas.

Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

As comorbidades ou outras condições associadas estiveram frequentemente presentes nos pacientes e podem ser visualizadas na tabela 5.

Quando comparados adultos e crianças, os primeiros apresentaram número maior de comorbidades, teste de Mann-Whitney  $p < 0,001$ .

Tabela 5 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e as comorbidades e condições associadas, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Comorbidades e condições associadas	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	Pneumonia	21	17,4	9	11,1	30	
Insuficiência hepática/ ↑ AST/ALT	7	5,8	11	13,6	18	8,9	0,098
HIV/SIDA	1	0,8	12	14,8	13	6,4	< 0,001
Etilismo	-	-	12	14,8	12	5,9	< 0,001
Hipertensão arterial sistêmica	-	-	12	14,8	12	5,9	< 0,001
IRC/↑ uréia e/ou creatinina	1	0,8	9	11,1	10	5,0	0,003
Desnutrição	1	0,8	7	8,6	8	4,0	0,015
Diabetes <i>mellitus</i>	-	-	8	9,9	8	4,0	0,002
Tuberculose	-	-	5	6,2	5	2,5	0,021
Citomegalovírus	1	0,8	3	3,7	4	2,0	0,356
Insuficiência cardíaca congestiva	-	-	4	4,9	4	2,0	0,051
Hemoglobinopatia	-	-	4	4,9	4	2,0	0,051
Hepatite B	1	0,8	2	2,5	3	1,5	0,724
Hepatite C	-	-	3	3,7	3	1,5	0,124
<i>Herpes zoster</i>	2	1,7	1	1,2	3	1,5	0,810
Bronquite	2	1,7	-	-	2	1,0	0,662
Asma	1	0,8	-	-	1	0,5	0,412
Cirrose	-	-	1	1,2	1	0,5	0,840
DPOC	-	-	1	1,2	1	0,5	0,840
Gestação	-	-	1	1,2	1	0,5	0,840
Hepatite A	-	-	1	1,2	1	0,5	0,840
HTLV	-	-	1	1,2	1	0,5	0,840
Lupus eritematoso sistêmico	-	-	1	1,2	1	0,5	0,840
Leucemia mieloide aguda	-	-	1	1,2	1	0,5	0,840
Mieloma múltiplo	-	-	1	1,2	1	0,5	0,840
Toxoplasmose	1	0,8	-	-	1	0,5	0,412

Nota: Cada paciente pode apresentar uma ou mais condições.

Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Condições associadas estavam presentes em 61,7% (50) dos adultos. Dentre as crianças, apenas 25,6% (31) apresentaram comorbidade, e à exceção de um caso com seis patologias relatadas simultaneamente, as demais tinham no máximo três. Houve associação entre a presença de comorbidades e a idade, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença ou não de comorbidades e/ou condições associadas, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Comorbidades e/ou condições associadas	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		p
	Nº.	%	Nº.	%	
Presentes	31	25,6	50	61,7	< 0,001
Ausentes	90	74,4	31	38,3	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Nos pacientes coinfectados *Leishmania*/HIV foram observados casos de associação com CMV, TB (óbito), HTLV e *Herpes zoster* (óbito), além de dois pacientes com pneumonia (um de óbito).

Casos fatais ocorreram somente entre os adultos (25,9%), principalmente naqueles com 40 anos ou mais. Nestes casos, destacou-se a presença de emagrecimento e palidez.

Quanto à presença de comorbidades entre os pacientes adultos, os sujeitos que foram a óbito (21) apresentaram número maior de comorbidades do que aqueles que evoluíram para cura (60), teste de Mann-Whitney  $p < 0,001$  (Tabela 7). O etilismo foi encontrado como primeira condição mais prevalente entre os pacientes com desfecho fatal.

As alterações hematológicas e bioquímicas mais prevalentes podem ser visualizadas nas tabelas 8 e 9, respectivamente.

Os resultados dos exames hematológicos não constavam no prontuário de quatro adultos, portanto, para essa análise foram considerados 77 pacientes. A anemia foi marcante (96,5%) em todos os grupos, enquanto a leucopenia foi mais observada em adultos.

De modo semelhante, os resultados de exames bioquímicos somente estavam presentes no prontuário de 71 dos adultos e de 118 crianças. A trigliceridemia somente foi relatada no prontuário de dois pacientes adultos e estava acima dos valores normais em ambos.

Tabela 7 – Estatística descritiva do número de comorbidades em pacientes com leishmaniose visceral segundo o desfecho entre adultos, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Desfecho	Mediana	Quartil	Quartil	Mínimo	Máximo
		25%	75%		
Óbito	3	2	4	0	5
Cura	0,5	0	1	0	3

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste de Mann-Whitney  $p < 0,001$ .

Tabela 8 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e as alterações hematológicas, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Alterações hematológicas	Crianças		Adultos		Total		p
	(n=121)		(n=77)		(n=198)		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
↓ Hemoglobina	115	95,0	76	98,7	191	96,5	0,335
↓ Hematócrito	113	93,4	74	96,1	187	94,4	0,620
↓ Leucócitos	85	70,2	66	85,7	151	76,3	0,020
↓ Segmentados	71	58,7	21	27,3	92	46,5	<0,001
↑ Segmentados	11	9,1	19	24,7	30	15,2	0,006
↑ Bastões	63	52,1	43	55,8	106	53,5	0,709
↑ Eosinófilos	3	2,5	8	10,4	11	5,6	0,040
↑ Basófilos	1	0,8	-	-	1	0,5	0,424
↑ Linfócitos	50	41,3	21	27,3	71	35,9	0,063
Linfócitos Atípicos	38	31,4	12	15,6	50	25,3	0,020
↑ Monócitos	44	36,4	34	44,2	78	39,4	0,345
↓ Plaquetas	104	86,0	63	81,8	167	84,3	0,562
↑ VHS	36/46*	78,3	29/29*	100,0	65/75*	86,7	0,019

Nota: Cada paciente pode apresentar uma ou mais alterações laboratoriais.

\* número de observações/número de investigações.

Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Tabela 9 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e as alterações bioquímicas, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Alterações bioquímicas	Crianças (n=118)		Adultos (n=71)		Total (n=189)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
↓ Proteínas totais	17	14,4	6	8,5	23	12,2	0,326
↑ Proteínas totais	31	26,3	34	47,9	65	34,4	0,004
↓ Albumina	86	72,9	59	83,1	145	76,7	0,152
↑ Globulinas	83	70,3	58	81,7	141	74,6	0,118
Inversão A/G	63	53,4	51	71,8	114	60,3	0,019

Nota: Cada paciente pode apresentar uma ou mais alterações laboratoriais.

Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Dentre as alterações bioquímicas destaca-se a redução dos níveis de albumina sérica com o aumento das globulinas, ocasionando a inversão dessas frações protéicas. Não foi possível avaliar a contribuição de  $\gamma$ -globulinas neste incremento, pois somente sete prontuários forneciam essa informação.

O aumento da VHS foi relacionado com a elevação das globulinas, teste Qui-Quadrado  $p = 0,017$  (Tabela 10), mas não houve associação com o aumento das proteínas totais, teste Qui-Quadrado  $p = 0,673$ .

Tabela 10 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o aumento da VHS e elevação das globulinas, NHU/UFMS – 2003 a 2008

VHS aumentada	↑ Globulinas						p
	Sim (n=55)		Não (n=18)		Total (n=73)		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Sim	51	92,7	12	66,7	63	86,3	0,017
Não	4	7,3	6	33,3	10	13,7	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

## 5.2 Dados referentes aos métodos diagnósticos

Quanto ao diagnóstico da parasitose, o exame parasitológico direto foi utilizado em todos os sujeitos da pesquisa, uma vez que foi considerado critério de inclusão, e obteve 95,0% de positividade. A cultura foi realizada em apenas 190 casos e positiva em 62,6%. A sorologia por IFI foi solicitada em 83 casos e o teste rápido em 15. Embora ambos tenham apresentado percentual de positividade diferente entre crianças e adultos, esta diferença não pode ser considerada significativa para a idade, teste Qui-Quadrado  $p = 0,164$  e  $p = 0,714$ , respectivamente (Tabela 11).

Analisando os resultados da microscopia e das demais técnicas, houve discordância estatisticamente significativa em relação à cultura e sorologia, teste de McNemar  $p < 0,001$  para ambas. Quanto ao teste rápido, não foi possível essa avaliação em virtude do pequeno número de pacientes que tiveram esse exame realizado.

Tabela 11 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e os métodos diagnósticos, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Métodos diagnósticos	Crianças		Adultos		Total		<i>p</i>
	Nº./n*	%	Nº./n*	%	Nº./n*	%	
Microscopia	117/121	96,7	75/81	92,6	192/202	95,0	0,324
Cultura	69/114	60,5	50/76	65,8	119/190	62,6	0,561
Sorologia (IFI)	43/56	76,8	16/27	59,3	59/83	71,1	0,164
Teste rápido	5/8	62,5	5/7	71,4	10/15	66,7	0,714

\* N°.n= número de positivos/número de investigações

Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

## 5.3 Avaliação da medula óssea

Na análise das lâminas de medula óssea, as espículas estavam ausentes em 59,4% (Figura 4 A), enquanto em 40,6% foram visualizados fragmentos e/ou aglomerados de células medulares (Figura 4 B). Entre as crianças, 43,0% dos esfregaços apresentaram-se sem fragmentos ou aglomerados celulares, ao passo que entre os adultos as espículas estavam ausentes em 84,0% das lâminas. Houve

associação entre a presença de espículas e a idade, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de espículas e/ou aglomerados em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Espículas e/ou aglomerados	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		<i>p</i>
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	Presentes	69	57,0	13	16,0	82	
Ausentes	52	43,0	68	84,0	120	59,4	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Ainda em relação à presença de espículas, observou-se que na ausência delas a grande maioria das amostras, 95,0% (114), se apresentou com celularidade inadequada (Figura 4 C). Porém, quando os fragmentos estavam presentes (82) a celularidade foi insatisfatória em apenas 22,0% (18) dos casos. Houve associação entre a presença de espículas e boa celularidade (Figura 4 D), teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a celularidade e a presença de espículas em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Celularidade	Espículas				Total (n=202)		<i>p</i>
	Ausentes (n=120)		Presentes (n=82)		Nº.	%	
	Nº.	%	Nº.	%			
Insatisfatória	114	95,0	18	22,0	132	65,3	< 0,001
Satisfatória	6	5,0	64	78,0	70	34,7	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

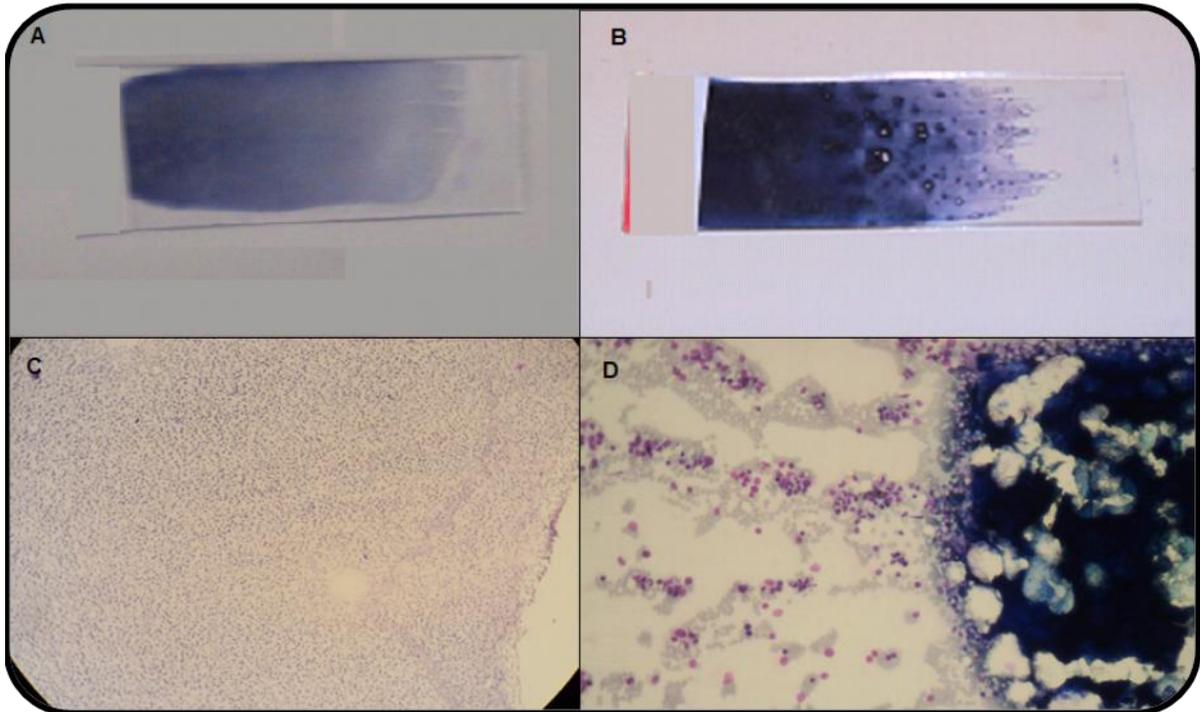


Figura 4 – Presença de espículas e celularidade em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008. A: Lâmina de material medular sem espículas; B: Lâmina de material medular com espículas; C: Celularidade insatisfatória no esfregaço sem espículas; D: Boa celularidade em esfregaço com espículas

Uma vez que a celularidade insatisfatória foi relacionada com a ausência de espículas (Figura 4 A e C) a contagem diferencial das células tornou-se inviável, pois os resultados não seriam fidedignos.

A presença ou não de espículas no esfregaço medular também foi relacionada com a presença do parasita (Figura 5) de modo que, quando as partículas estavam ausentes 15,0% tinham frequentes ou muitas formas parasitárias. Em contrapartida, na presença de espículas 30,5% das amostras apresentaram frequentes ou muitas amastigotas. Houve associação entre a presença de espículas e a frequência de amastigotas, teste Qui-Quadrado  $p = 0,014$  (Tabela 14).

Embora a maior parte das lâminas com riqueza de amastigotas fosse proveniente de AMO de crianças, não foi estabelecida diferença significativa entre a frequência do parasita e a idade dos sujeitos desse trabalho, teste Qui-Quadrado  $p = 0,096$  (Tabela 15).

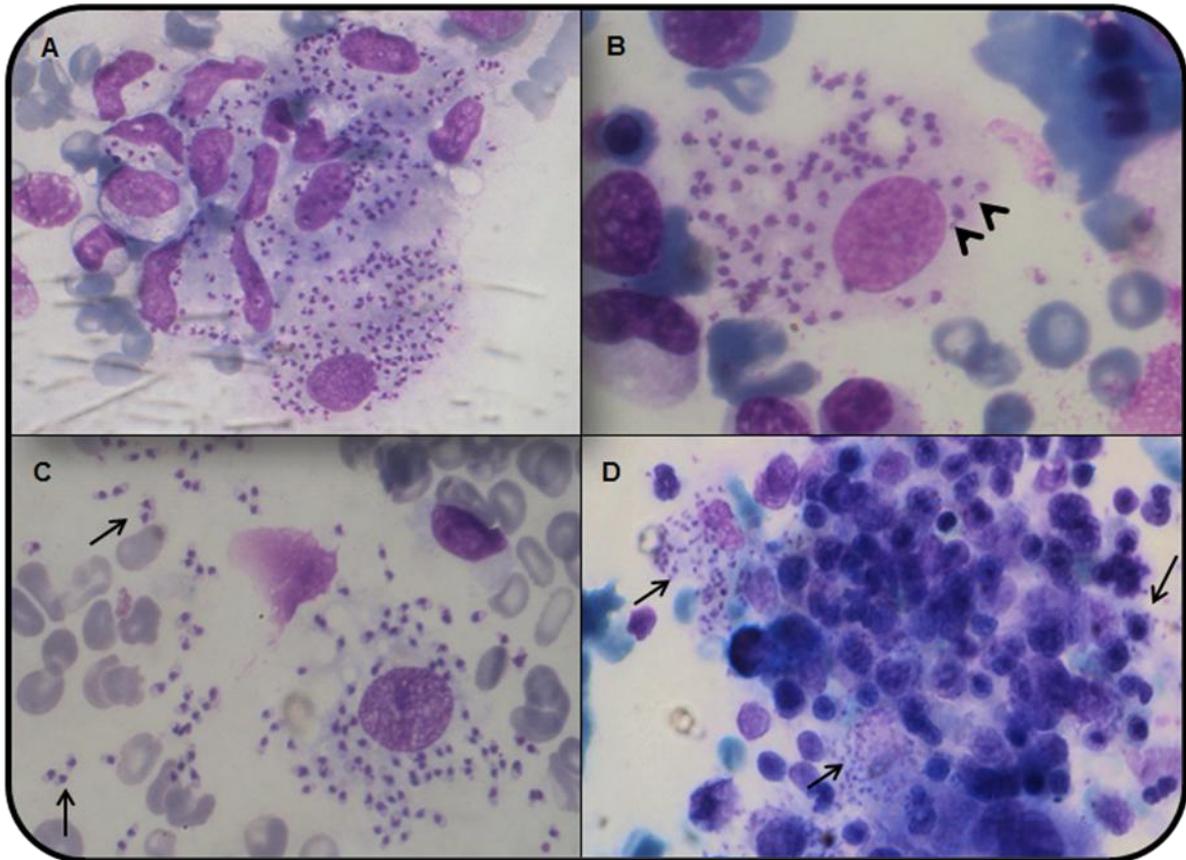


Figura 5 – Amastigotas em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008. A: Ninho de amastigotas; B: Amastigotas no interior de macrófago com detalhe para o cinetoplasto (pontas de setas); C: Amastigotas livres (setas) no esfregaço próximas a um macrófago rompido; D: Concentração de amastigotas (setas) próximas à espícula

Tabela 14 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de amastigotas e a presença de espículas em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Amastigotas	Espículas				Total		p
	Ausentes (n=120)		Presentes (n=82)		(n=202)		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Raras ou poucas	102	85,0	57	69,5	159	78,7	0,014
Frequentes ou muitas	18	15,0	25	30,5	43	21,3	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Tabela 15 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a frequência de amastigotas em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Amastigotas	Crianças		Adultos		Total		p
	(n=121)		(n=81)		(n=202)		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Raras ou poucas	90	74,4	69	85,2	159	78,7	0,096
Frequentes ou muitas	31	25,6	12	14,8	43	21,3	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Quanto à presença dos precursores plaquetários, não foram visualizados ou estavam reduzidos em 65,3% dos pacientes. Em relação à idade, 88,9% dos adultos tiveram os megacariócitos ausentes ou reduzidos. Por outro lado, entre as crianças tais células estavam ausentes ou reduzidas em apenas 49,6% dos casos. Houve associação entre a idade e a presença dos precursores plaquetários, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 16). A figura 6 mostra algumas alterações displásicas presentes nesta série tais como emperipolese, projeções citoplasmáticas e formas imaturas, além de um osteoclasto para diferenciação de megacariócito maduro.

Tabela 16 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de megacariócitos em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Megacariócitos	Crianças		Adultos		Total		p
	(n=121)		(n=81)		(n=202)		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Presentes	61	50,4	9	11,1	70	34,7	< 0,001
Ausentes ou Reduzidos	60	49,6	72	88,9	132	65,3	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Ainda avaliando a presença de megacariócitos, relacionou-se a presença dessas células naqueles indivíduos que apresentavam plaquetopenia no hemograma. Houve associação quanto à idade, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 17).

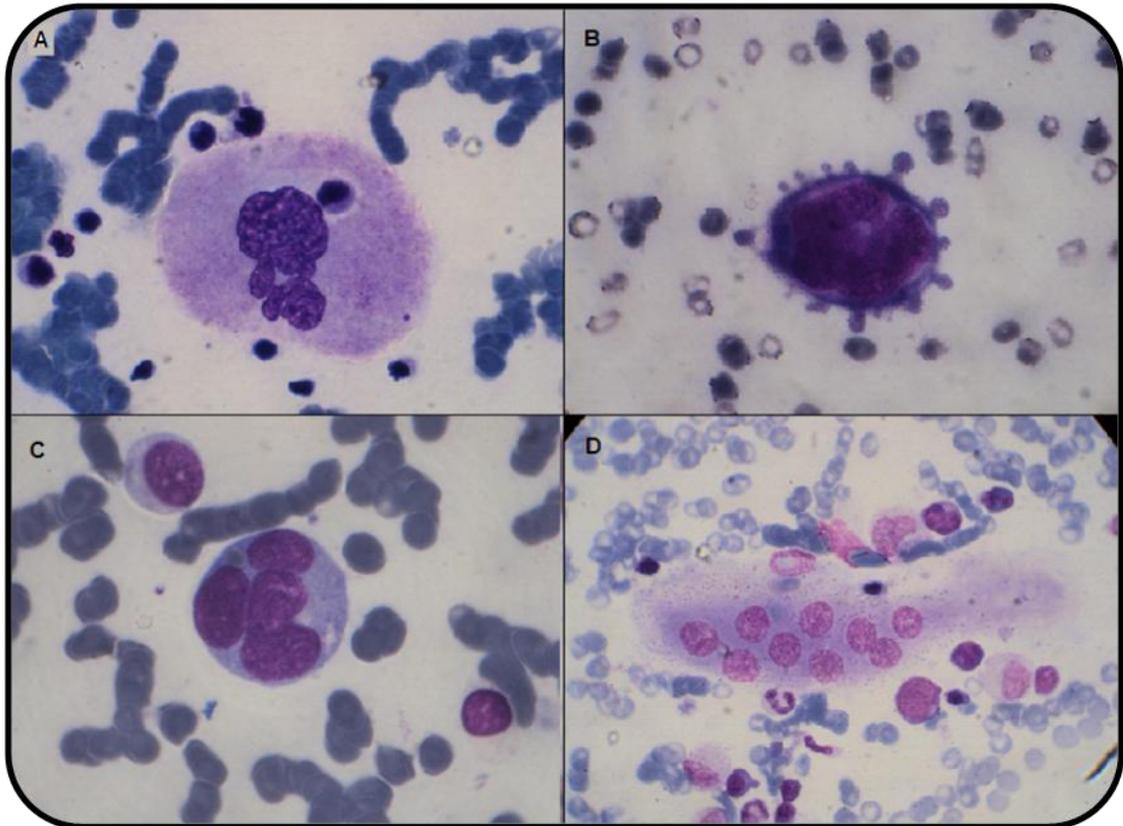


Figura 6 – Alterações displásicas na série megacariocítica em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008. A: Emperipolesse; B: Megacariócito com projeções citoplasmáticas; C: Megacariócito imaturo; D: Osteoclasto para diferenciação de megacariócito maduro

Tabela 17 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral e plaquetopenia segundo o grupo etário e a frequência de megacariócitos em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Megacariócito	Crianças (n=104)		Adultos (n=63)		Total (n=167)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Presentes	53	51,0	8	12,7	61	36,5	< 0,001
Ausentes ou reduzidos	51	49,0	55	87,3	106	63,5	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

A plasmocitose esteve presente em 63,9% dos casos. Plasmócitos e células de Mott (Figuras 7 A, B, C e D) se apresentaram de forma semelhante entre crianças e adultos, não havendo diferença estatística, teste Qui-Quadrado  $p = 0,118$  e  $p = 0,860$ , respectivamente (Tabela 18). Restos celulares de plasmócitos e células de

Mott (Figura 7 E) foram vistos comumente, e plasmócitos flamejantes foram raramente observados (Figura 7 F).

Tabela 18 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de plasmócitos e células de Mott em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		<i>p</i>
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	<b>Plasmócitos</b>						
Normal	38	31,4	35	43,2	73	36,1	0,118
Aumentado	83	68,6	46	56,8	129	63,9	
<b>Célula de Mott</b>							
Presente	20	16,5	15	18,5	35	17,3	0,860
Ausente	101	83,5	66	81,5	167	82,7	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Avaliando a presença de plasmócitos entre os indivíduos com hiperglobulinemia, houve associação entre a presença de plasmócitos no tecido medular e a hiperglobulinemia, teste Qui-Quadrado  $p = 0,018$  (Tabela 19).

Tabela 19 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de plasmócitos em esfregaço de medula óssea e a globulinemia, NHU/UFMS – 2003 a 2008

↑ Globulinas	Plasmócito				<i>p</i>
	Normal (n=66)		Aumentado (n=123)		
	Nº.	%	Nº.	%	
Sim	42	63,6	99	80,5	0,018
Não	24	36,4	24	19,5	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

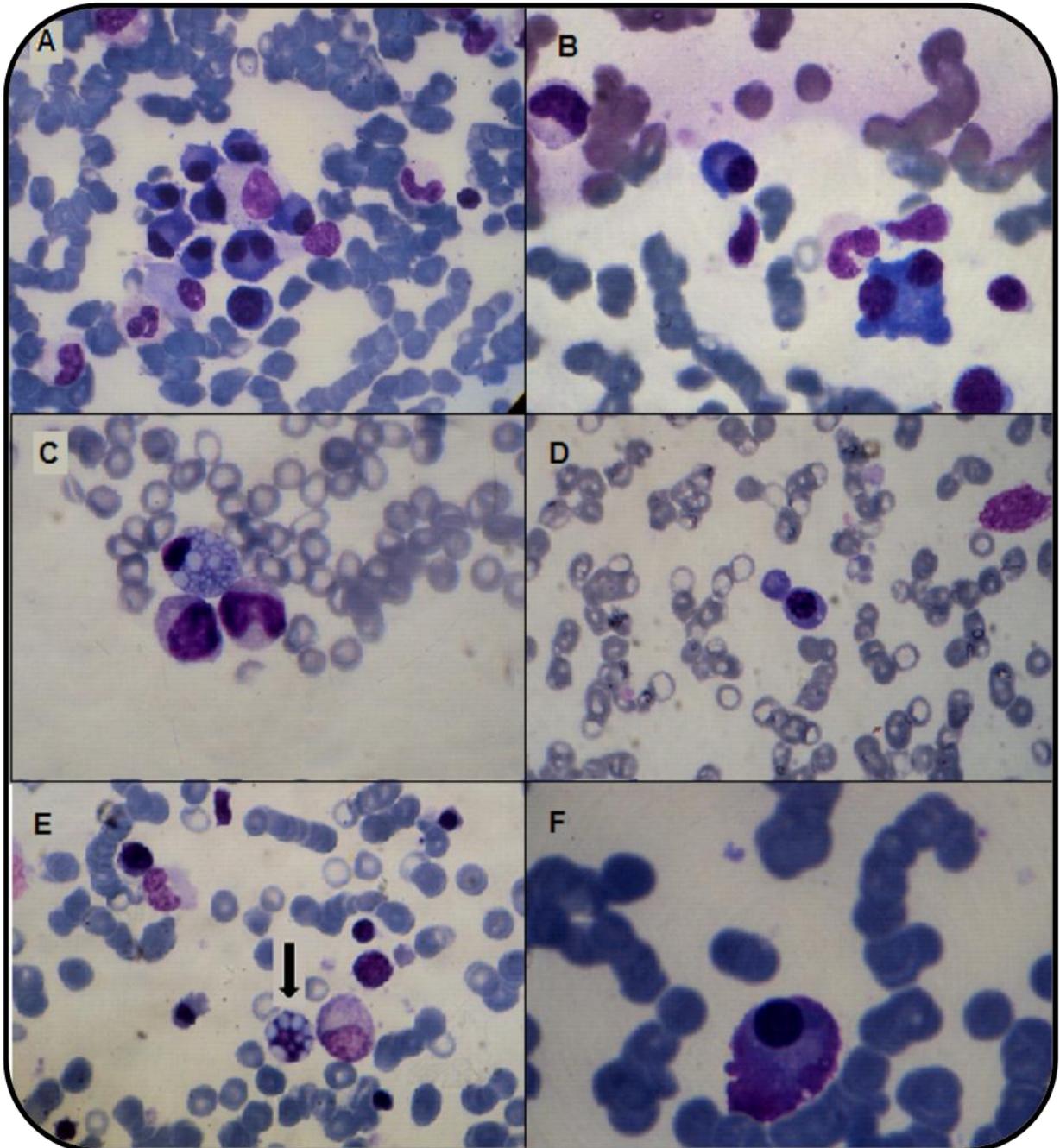


Figura 7 – Plasmócitos, células de Mott e flamejantes em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008. A: Plasmocitose; B: Plasmócitos binucleados; C: Célula de Mott; D: Plasmócito com expansão citoplasmática; E: Resto citoplasmático de célula de Mott; F: Plasmócito flamejante

A presença de *rouleaux* (Figura 8) no esfregaço não teve associação estatística com a idade, teste Qui-Quadrado  $p = 0,978$ , como pode ser observado na tabela 20.

Tabela 20 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de *rouleaux* em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

<i>Rouleaux</i>	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		<i>p</i>
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	Presente	103	85,1	68	84,0	171	
Ausente	18	14,9	13	16,0	31	15,3	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

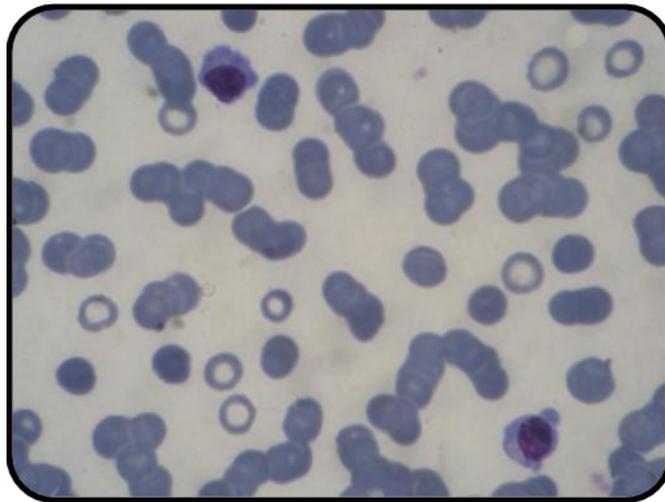


Figura 8 – *Rouleaux* em esfregaço de medula óssea de paciente com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008.

Quando analisada a relação de *rouleaux* com as alterações protéicas nos exames bioquímicos, verificou-se associação com o aumento de proteínas totais, teste Qui-Quadrado  $p = 0,015$  (Tabela 21), e com o aumento de globulinas, teste Qui-Quadrado  $p = 0,002$  (Tabela 22).

Os histiócitos estavam aumentados em 56,9% dos pacientes (Figura 9 A). Entre as crianças a histiocitose esteve presente em 66,9% dos casos, enquanto apenas 42,0% dos adultos a apresentaram. Houve associação entre a presença aumentada de histiócitos e a idade, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 23). Foram observados células blásticas e macrófagos ativados com intensa vacuolização.

Tabela 21 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a elevação de proteínas totais e a presença de *rouleaux* em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

<i>Rouleaux</i>	↑ Proteínas totais				Total (n=189)		<i>p</i>
	Sim (n=65)		Não (n=124)				
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Presente	61	93,8	98	79,0	159	84,1	0,015
Ausente	4	6,2	26	21,0	30	15,9	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Tabela 22 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a globulinemia e a presença de *rouleaux* em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

<i>Rouleaux</i>	↑ Globulinas				Total (n=189)		<i>p</i>
	Sim (n=141)		Não (n=48)				
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Presente	126	89,4	33	68,7	159	84,1	0,002
Ausente	15	10,6	15	31,3	30	15,9	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Tabela 23 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de histiócitos em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Histiócitos	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		<i>p</i>
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	Normal	40	33,1	47	58,0	87	
Aumentado	81	66,9	34	42,0	115	56,9	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

A presença de *tart cell* e/ou hemofagocitose (Figura 9 B, C, D, E e F) foi verificada em 45,0% dos pacientes. As crianças apresentaram *tart cell* e/ou hemofagocitose em 56,2% dos casos, enquanto entre adultos esse percentual foi de

apenas 28,4%. Houve associação entre a presença de *tart cell* e/ou hemofagocitose e a idade, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 24).

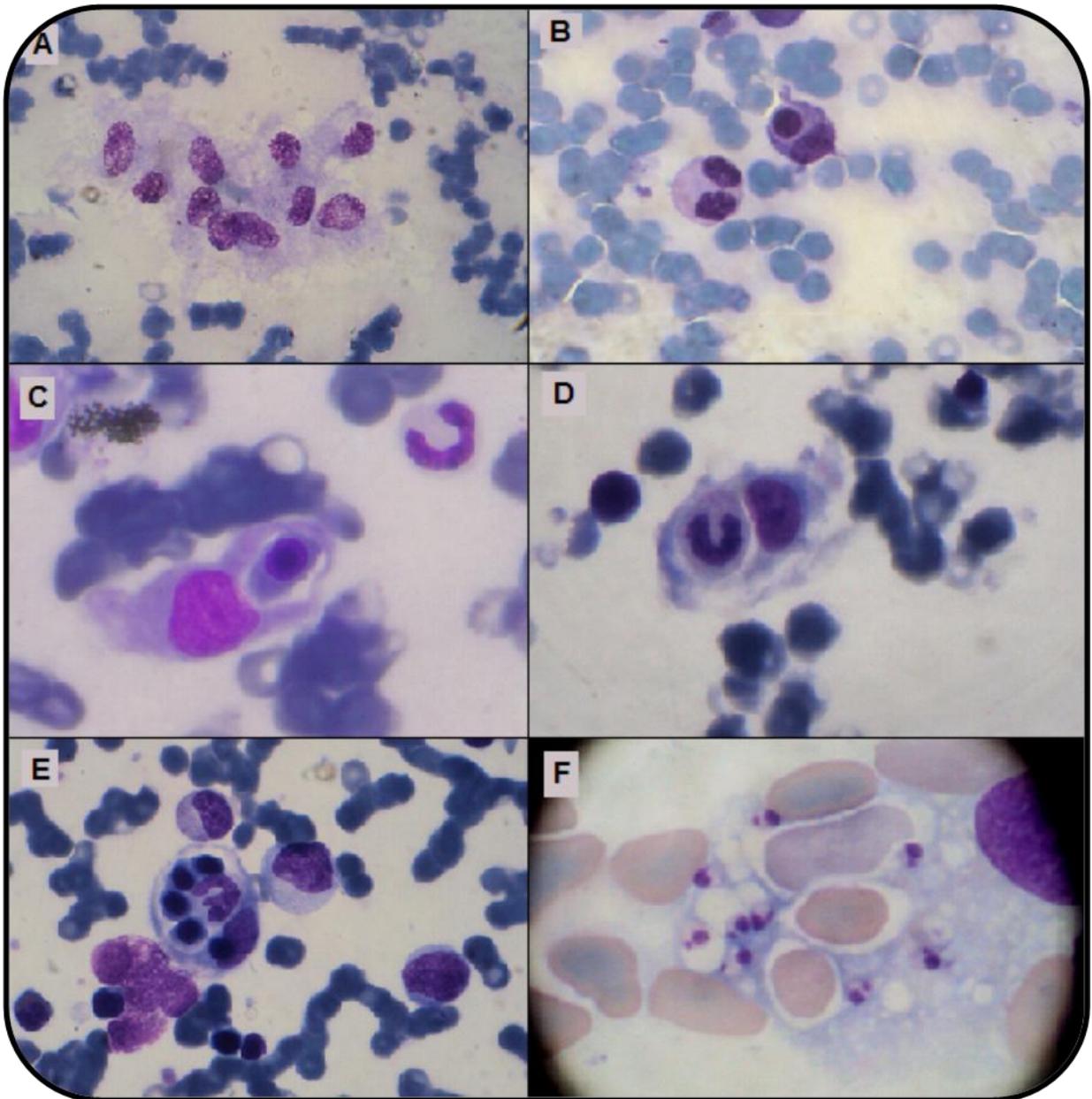


Figura 9 – Histiócitos, *tart-cell* e hemofagocitose em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008. A: histiocitose acentuada; B: *Tart-cell*; C: Fagocitose de precursor eritrocítico; D: Fagocitose de precursor granulocítico; E: Fagocitose de células diversas; F: Fagocitose de eritrócitos ou eritrofagocitose e amastigotas

Tabela 24 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de *tart cell* e/ou hemofagocitose em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

<i>Tart cell</i> e/ou hemofagocitose	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	Presente	68	56,2	23	28,4	91	
Ausente	53	43,8	58	71,6	111	55,0	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

A presença de *tart cell* e/ou hemofagocitose foi ainda relacionada com a frequência de parasitas no esfregaço medular. Do total de 202 pacientes, 45,0% (91) apresentaram esses tipos celulares, sendo que em 71,4% deles as amastigotas eram raras ou poucas e 28,6% apresentaram frequentes ou muitas amastigotas. Houve associação entre a frequência de parasitas e a presença de *tart cell* e/ou hemofagocitose, teste Qui-Quadrado  $p = 0,034$  (Tabela 25).

Tabela 25 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a presença de *tart cell* e/ou hemofagocitose e a frequência de amastigotas em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Amastigotas	<i>Tart cell</i> e/ou hemofagocitose				Total (n=202)		p
	Presentes (n=91)		Ausentes (n=111)		Nº.	%	
	Nº.	%	Nº.	%			
Raras ou poucas	65	71,4	94	84,7	159	78,7	0,034
Frequentes ou muitas	26	28,6	17	15,3	43	21,3	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Embora não usual, foram visualizados parasitas no interior de precursores e PMN neutrófilos e eosinófilos, 20,8% (Figura 10 A e B). Foram observados em 22,3% (27) das crianças e em 18,5% (15) dos adultos. Entre os casos com amastigostas frequentes no esfregaço medular, 67,4% apresentaram parasitismo em PMN; já nos casos em que havia raras ou poucas amastigostas 8,2% continham

essas células parasitadas. Houve associação entre a frequência de parasitas e a presença de parasitismo em PMN, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 26).

Tabela 26 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de amastigotas e a presença de polimormonucleares (PMN) parasitados em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

PMN parasitados	Amastigotas				Total		<i>p</i>
	Raras ou poucas (n=159)		Frequentes ou muitas (n=43)		(n=202)		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Presentes	13	8,2	29	67,4	42	20,8	< 0,001
Ausentes	146	91,8	14	32,6	160	79,2	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

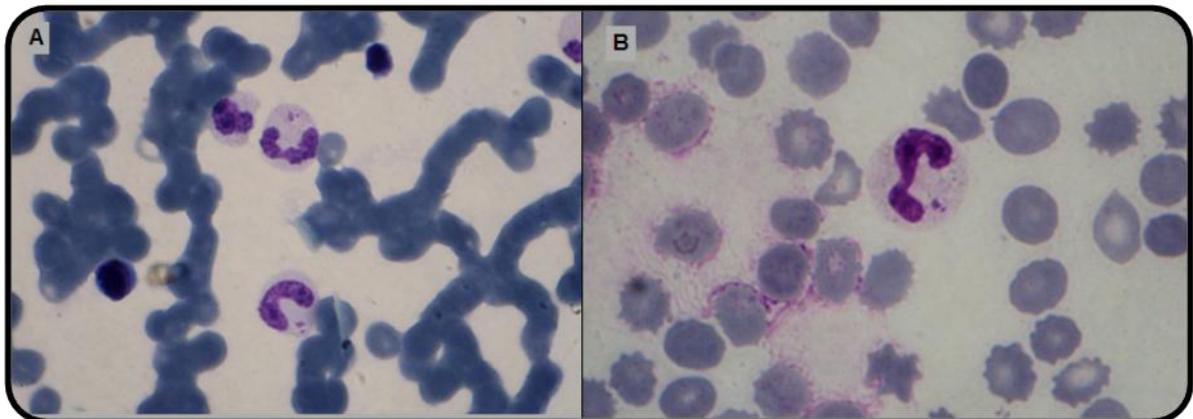


Figura 10 – Precursores de polimorfonucleares parasitados em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Verificou-se também a presença de parasitismo em eritroblastos ortocromáticos e plasmócito (Figura 11 A e B) nas lâminas de sete pacientes (3,5%) e um paciente (0,5%), respectivamente. Houve associação entre a presença de parasitas nestas células e a frequência de amastigotas, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 27).

Tabela 27 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de amastigotas e a presença de eritroblastos ortocromáticos ou plasmócito parasitados em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Eritroblasto ou plasmócito parasitado	Amastigotas				Total (n=202)		p
	Raras ou poucas (n=159)		Frequentes ou muitas (n=43)		Nº.	%	
	Nº.	%	Nº.	%			
Presentes	-	-	8	18,6	8	4,0	< 0,001
Ausentes	159	100,0	35	81,4	194	96,0	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

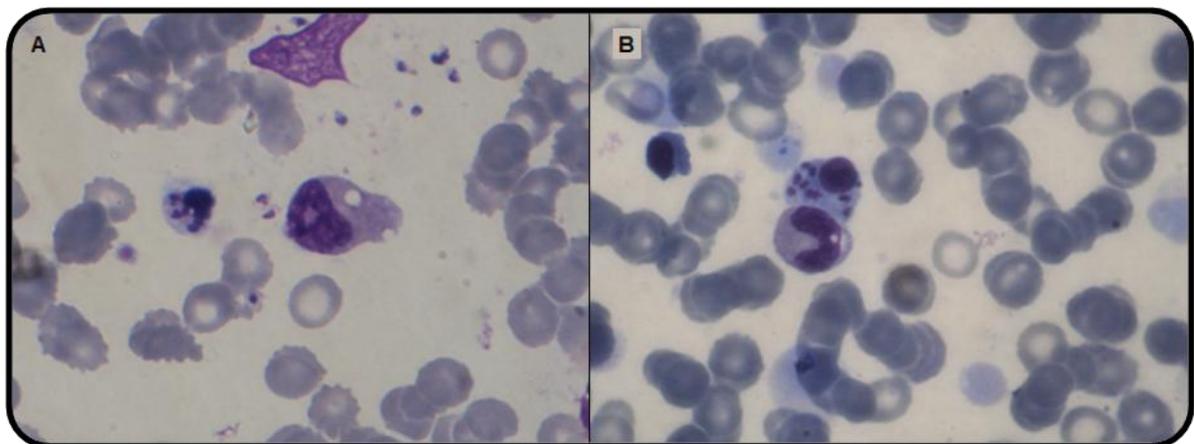


Figura 11 – Eritroblasto ortocromático (A) e plasmócito (B) parasitados em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008

O aumento de precursores eosinofílicos (Figura 12 A) no material medular foi constatado em 44,1% dos pacientes, sendo que houve eosinofilia em 53,7% das crianças e em 29,6% dos adultos. Grânulos mistos nos eosinófilos também foram observados (Figura 12 B), estando presentes em 21,3% das lâminas. Entre as crianças 28,9% os apresentaram, enquanto apenas 9,9% das amostras de adultos mostraram essa alteração celular. Houve associação entre a idade e a eosinofilia, bem como com a presença de grânulos mistos, teste Qui-Quadrado  $p = 0,002$  para ambas as análises (Tabela 28).

Não houve associação entre a presença de eosinofilia medular com o aumento dessas células no sangue periférico, teste Qui-Quadrado  $p = 0,357$  (Tabela 29).

Tabela 28 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de eosinófilos e grânulos mistos em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
<b>Eosinófilos</b>							
Ausente	31	25,6	27	33,3	58	28,7	0,002
Normal	25	20,7	30	37,1	55	27,2	
Aumentado	65	53,7	24	29,6	89	44,1	
<b>Grânulos mistos</b>							
Presentes	35	28,9	8	9,9	43	21,3	0,002
Ausentes	86	71,1	73	90,1	159	78,7	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

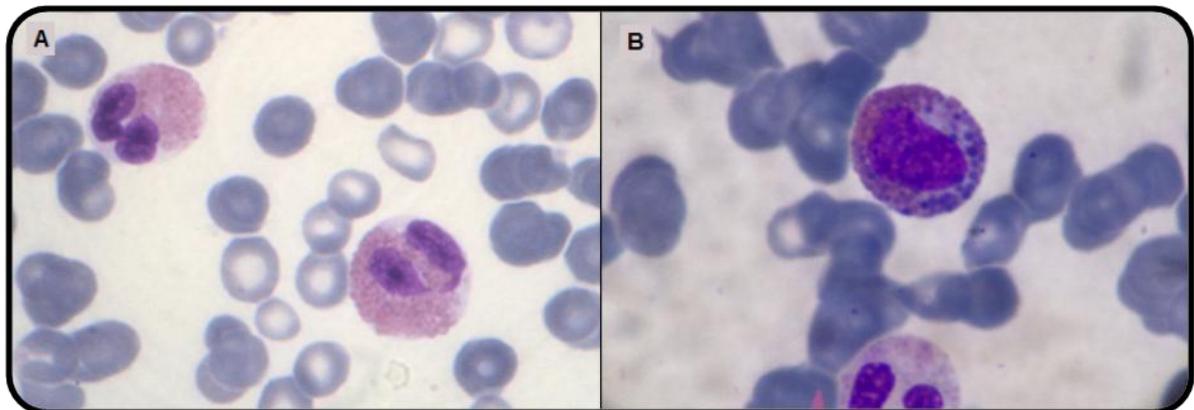


Figura 12 – Eosinofilia (A) e granulação mista em eosinófilos (B) em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Expansões citoplasmáticas (*blebbing*) nas diversas séries celulares foram vistas em 75,2% das lâminas analisadas (Figura 13 A e B). Em relação à idade, esta estrutura foi mais freqüente nas crianças (83,5%). Houve associação entre a presença de *blebbing* e a idade, teste Qui-Quadrado  $p = 0,002$  (Tabela 30).

Tabela 29 – Distribuição de pacientes com leishmaniose visceral segundo a frequência de eosinófilos no sangue periférico e no esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Eosinófilos (sangue periférico)	Eosinófilos (medula óssea)						p
	Ausente (n=58)		Normal (n=55)		Aumentado (n=89)		
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Ausente	36	62,0	36	65,5	44	49,5	0,357
Normal	19	32,8	17	30,9	39	43,8	
Aumentado	3	5,2	2	3,6	6	6,7	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado.

Tabela 30 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de expansões citoplasmáticas (*blebbing*) em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Expansões citoplasmáticas	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	Presentes	101	83,5	51	63,0	152	
Ausentes	20	16,5	30	37,0	50	24,8	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Fragmentos celulares originados de granulócitos (*granular stippling*), neutrófilos e eosinófilos, estiveram presentes em 55,0% dos esfregaços medulares, com predomínio entre as crianças 66,9% (Figura 13 C). Houve associação entre a presença dessa estrutura e a idade, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 31).

Tabela 31 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de fragmentos de granulócitos (*granular stippling*) em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Fragmentos de granulócitos	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	Presentes	81	66,9	30	37,0	111	
Ausentes	40	33,1	51	63,0	91	45,0	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

Frações citoplasmáticas de macrófagos e restos celulares diversos (*basophilic bare cell*) estavam presentes em 66,8% dos casos (Figura 13 D). Foram observados em 74,4% das crianças, enquanto que entre os adultos apenas 55,6% os apresentaram. Houve associação entre a presença de BBC e a idade, teste Qui-Quadrado  $p = 0,009$  (Tabela 32).

Tabela 32 – Distribuição de pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de restos celulares diversos (*basophilic bare cell*) em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Restos celulares diversos	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
Presentes	90	74,4	45	55,6	135	66,8	0,009
Ausentes	31	25,6	36	44,4	67	33,2	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

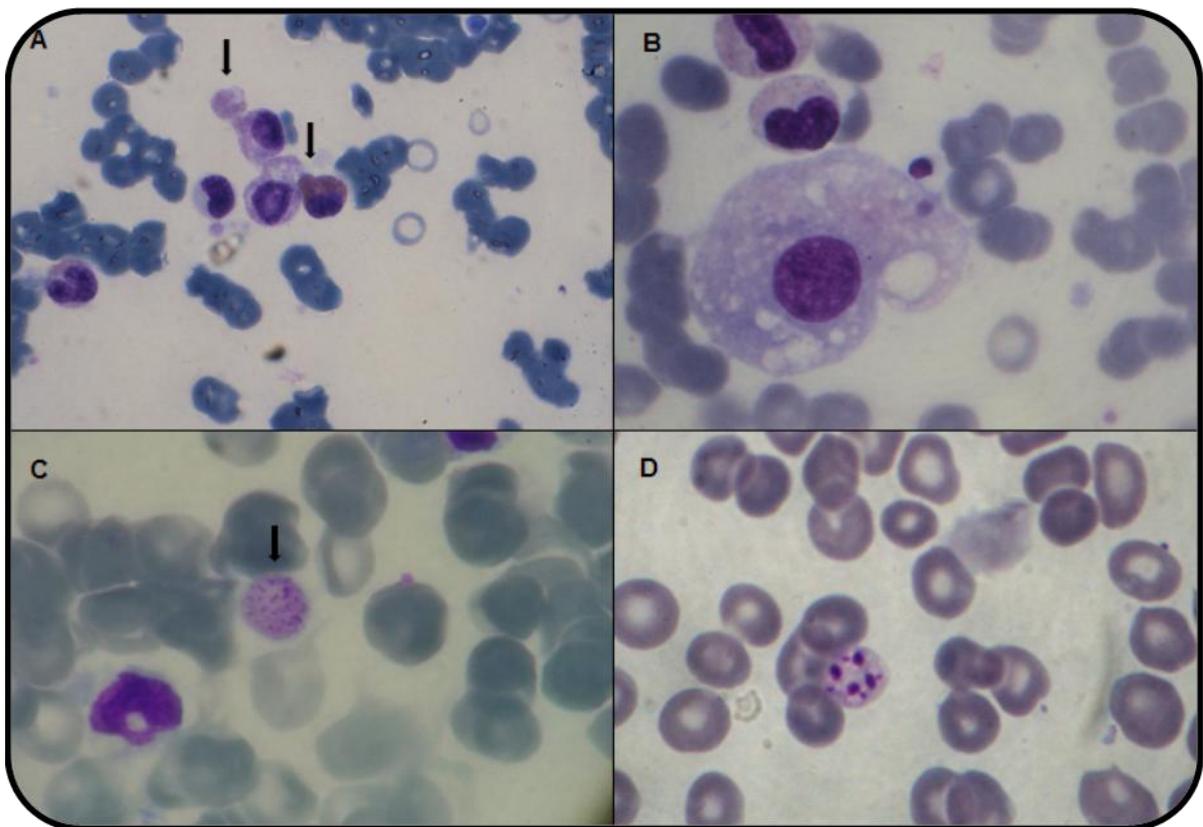


Figura 13 – Expansões citoplasmáticas (A e B), restos celulares de granulócitos (C) e de macrófagos (D) em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Nesta casuística 44,6% dos pacientes apresentaram nos esfregaços medulares transformação gelatinosa vista como material extracelular amorfo de coloração eosinofílica (Figura 14). Houve predomínio em crianças e associação com a idade, teste Qui-Quadrado  $p < 0,001$  (Tabela 33).

Tabela 33 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a presença de transformação gelatinosa em esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Transformação gelatinosa	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
	Presente	70	57,9	20	24,7	90	
Ausente	51	42,1	61	75,3	112	55,4	

Nota: Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

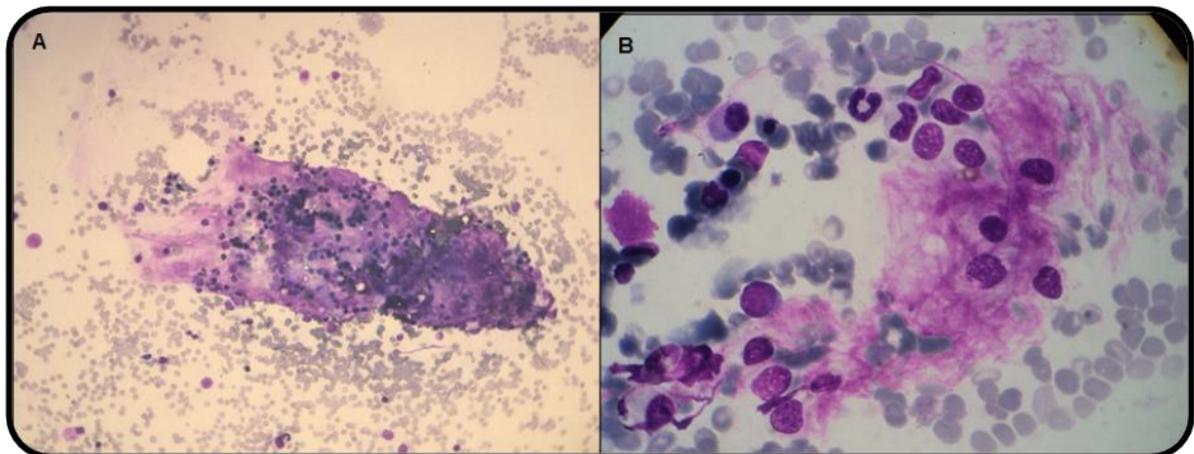


Figura 14 – Transformação gelatinosa em esfregaço de medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008, em menor (A) e maior aumento (B)

Outras alterações celulares observadas neste trabalho foram: células gigantes multinucleadas, ponteados basófilos, falha de hemoglobinização, *cariorrexis* em eritroblastos, megaloblastos, que caracterizam diseritropoese; metamielócitos gigantes, células em rosca, vacuolização citoplasmática, hipogranulação e granulação tóxica. Eventualmente foram visualizados dacriócitos e células em alvo.

Alterações apoptóticas degenerativas foram observadas em precursores neutrofilicos como pode ser visualizado na figura 15.

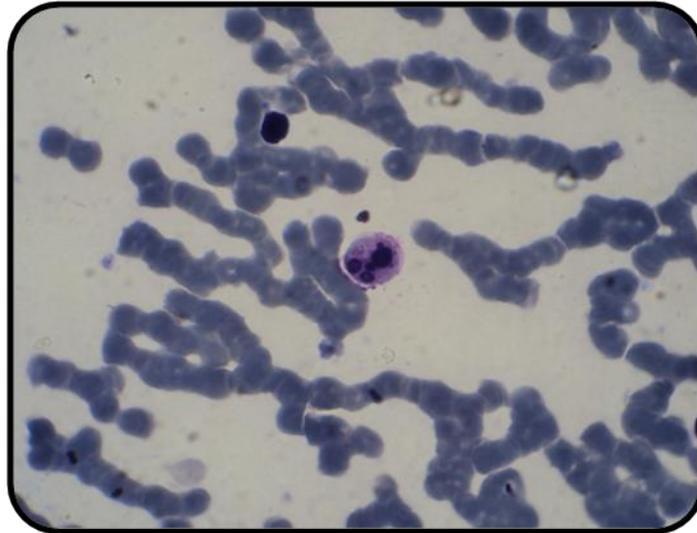


Figura 15 – Célula apoptótica em esfregaço de medula óssea de paciente com leishmaniose visceral, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Abaixo são descritos os casos de associação com leucemia mieloide aguda (um), mieloma múltiplo (um) e hemoglobinopatia (quatro).

No caso de associação com leucemia mieloide aguda o paciente, de 50 anos, desenvolveu pneumonia e foi a óbito. Quanto aos resultados laboratoriais, apresentou marcada pancitopenia com neutrofilia relativa e hiperglobulinemia. Na lâmina, as espículas e trilhas não estavam presentes, mas ainda assim a celularidade estava aumentada com muitos blastos, megacariócitos reduzidos, eosinófilos presentes em quantidade normal e raras amastigotas. Foi tratado com anfotericina B lipossomal.

O paciente com mieloma múltiplo, 61 anos, recebeu anfotericina B e teve três recidivas no período de dois anos até a ocasião do óbito por sepse. Nos exames, acentuada pancitopenia com linfocitose relativa e aumento das globulinas plasmáticas. O esfregaço medular desse paciente apresentou-se sem espículas e sem trilhas, com celularidade reduzida, poucos megacariócitos, aumento de linfócitos e plasmócitos com presença de plasmoblastos, *rouleaux*, hipocromia, eosinofilia e frações citoplasmáticas dessas células. As amastigotas presentes eram grandes e vacuolizadas, foram raras na primeira amostra medular e frequentes no material de exame posterior.

Quatro pacientes adultos eram portadores de hemoglobinopatia e todos apresentaram febre, astenia, hepatoesplenomegalia, anemia, aumento das proteínas plasmáticas com acentuada inversão da razão A/G e no tecido medular,

plasmocitose, ausência de hemofagocitose e de grânulos mistos em eosinófilos. Dois deles foram tratados com antimoniato, sendo que um desenvolveu pancreatite e o outro foi a óbito.

Os achados mais comuns, assim como os mais raros que podem estar presentes na medula óssea de pacientes com LV, encontram-se na tabela 34. Na distribuição dos mesmos foram considerados achados frequentes acima de 50%: *rouleaux*, expansões citoplasmáticas, fragmentos celulares diversos, plasmocitose, histiocitose e fragmentos de granulócitos; achados comuns entre 30 e 50%: *tart cell* e/ou hemofagocitose, transformação gelatinosa e eosinofilia; e achados raros abaixo de 30%: eosinófilos com granulação mista, polimorfonuclear parasitado, células de Mott e eritroblasto ortocromático ou plasmócito parasitado (Figura 16).

Tabela 34 – Distribuição dos pacientes com leishmaniose visceral segundo o grupo etário e a frequência das alterações na medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

Alterações na medula óssea	Crianças (n=121)		Adultos (n=81)		Total (n=202)		p
	Nº.	%	Nº.	%	Nº.	%	
<i>Rouleaux</i>	103	85,1	68	84,0	171	84,7	0,978
Expansões citoplasmáticas	101	83,5	51	63,0	152	75,2	0,002
Fragmentos celulares diversos	90	74,4	45	55,6	135	66,8	0,009
Plasmocitose	83	68,6	46	56,8	129	63,9	0,118
Histiocitose	81	66,9	34	42,0	115	56,9	<0,001
Fragmentos de granulócitos	81	66,9	30	37,0	111	55,0	<0,001
<i>Tart cell</i> e/ou hemofagocitose	68	56,2	23	28,4	91	45,0	<0,001
Transformação gelatinosa	70	57,9	20	24,7	90	44,6	<0,001
Eosinofilia	65	53,7	24	29,6	89	44,1	0,002
Eosinófilos com granulação mista	35	28,9	8	9,9	43	21,3	0,002
Polimorfonuclear parasitado	27	22,3	15	18,5	42	20,8	0,635
Células de Mott	20	16,5	15	18,5	35	17,3	0,860
Eritroblasto ou plasmócito parasitado	7	5,8	1	1,3	8	4,0	0,209

Nota: Cada paciente pode apresentar uma ou mais alterações medulares.

Se  $p \leq 0,05$  – diferença estatisticamente significativa. Teste Qui-Quadrado corrigido por Yates.

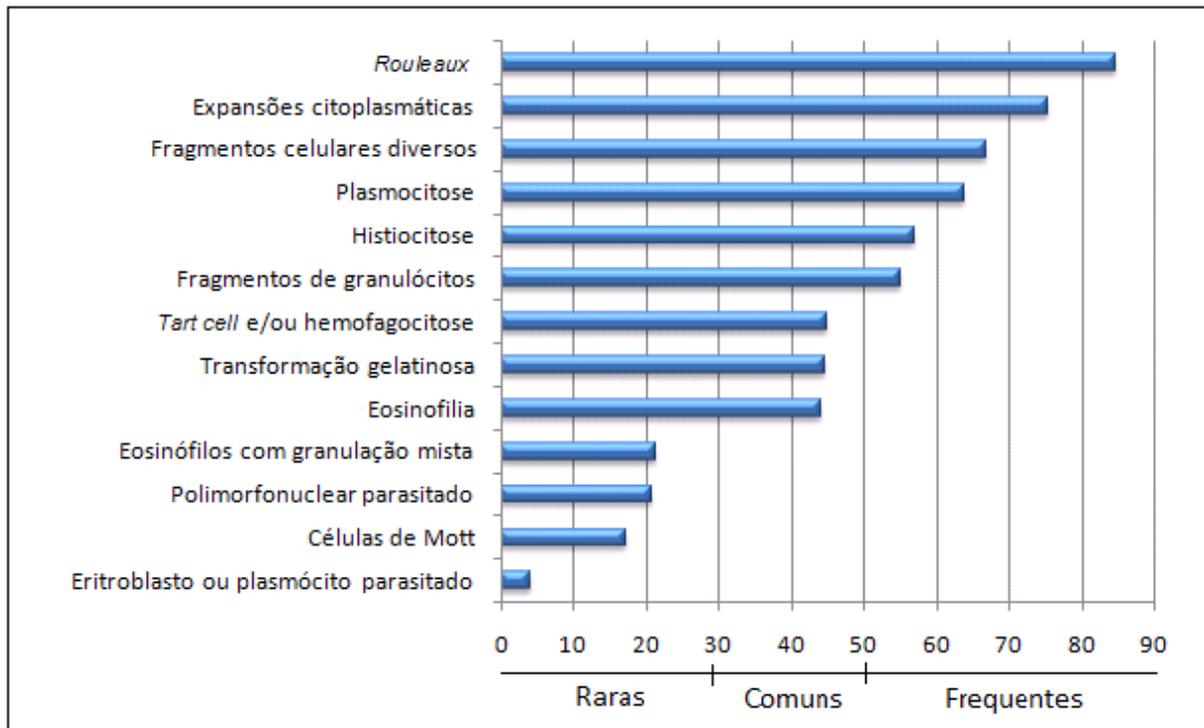


Figura 16 – Distribuição (%) dos pacientes com leishmaniose visceral segundo as alterações no esfregaço de medula óssea, NHU/UFMS – 2003 a 2008

## 6 DISCUSSÃO

A maioria dos pacientes do presente estudo foi criança com idade de quatro meses até 13 anos e predomínio em pacientes com idade inferior a cinco anos, seguindo o que é descrito na literatura (BRASIL, 2006a; PEDROSA; ROCHA, 2004; RAI et al., 2008).

Embora a maior suscetibilidade das crianças seja normalmente atribuída à imaturidade imunológica e à desnutrição (BRASIL, 2006a; COLLIN et al., 2004), neste estudo apenas um caso de desnutrição infantil foi relatado.

Entre os adultos ocorreram mais casos na faixa etária de 20 até 39 anos confirmando a tendência atual da parasitose em alguns focos urbanos nos quais se observa modificação da distribuição dos casos por grupo etário, com ocorrência de altas taxas em adultos jovens (SILVA et al., 2001).

Quanto à distribuição por sexo, os homens foram maioria entre os adultos, e em menor proporção no grupo infantil. O discreto predomínio do sexo masculino entre crianças também foi relatado por Pastorino et al. (2002). Possivelmente essa diferença na distribuição do sexo em relação à idade esteja relacionada a fatores de maior exposição como moradia, trabalho e lazer, uma vez que a infecção pode ocorrer independente do sexo (OLIVEIRA et al., 2008).

Nos últimos anos tem ocorrido uma mudança no padrão de transmissão da LV que se encontra em franca expansão e urbanização no Brasil (BRASIL, 2006a). Nesta casuística, embora em alguns prontuários não houvesse a informação de procedência não foram observados pacientes oriundos de outros estados, refletindo o caráter endêmico da parasitose em MS, que responde por 77,0% dos casos da Região Centro-Oeste; e a força de transmissão do parasita, tendo em vista o maior número de pacientes procedentes de municípios considerados de transmissão intensa ou moderada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009b).

A maior frequência de sujeitos residentes em centros urbanos como a capital e o município de Três Lagoas, entre outros, reforça o processo de urbanização da LV relatado por outros autores (BRASIL, 2006a; OLIVEIRA, A. L. L. et al., 2006).

A insuficiência de algumas informações nos prontuários, como observado em relação à procedência e outros itens da investigação, ressalta a baixa qualidade do preenchimento dos prontuários médicos no Brasil (SILVA; TAVARES-NETO, 2007)

que, além de outros inconvenientes inerentes ao seu objetivo, limitam ou dificultam os estudos baseados em dados secundários como nesta pesquisa.

A grande variabilidade na demora pela procura do atendimento médico pode explicar as diferenças encontradas quanto aos sinais e sintomas apresentados na admissão, que são proporcionais ao tempo de evolução da doença (BRUSTOLONI et al., 2007; PEDROSA; ROCHA, 2004), além de poder ser tempo insuficiente para a instalação das alterações crônicas decorrentes da LV (OLIVEIRA et al., 2010; PASTORINO et al., 2002). Ainda assim, houve homogeneidade das manifestações clínicas que compõem o quadro clínico clássico da LV descrito por outros autores (BADARÓ et al., 1986; CALDAS et al., 2006; PASTORINO et al., 2002; PEDROSA; ROCHA, 2004; OLIVEIRA, A. L. L. et al., 2006).

Caldas et al. (2006) também encontraram menor tempo entre início dos sintomas e diagnóstico para crianças (50 dias) do que para adultos (100 dias), o que permite inferir maior assistência à saúde da criança pelos responsáveis; menor valorização de sinais e sintomas pelos adultos e/ou que os profissionais não pensam na doença em adultos uma vez que esta é mais comum em crianças. Porém, deve-se mencionar que o diagnóstico precoce entre adultos poderia diminuir complicações importantes na evolução da parasitose e a mortalidade.

O número de óbitos maior entre pacientes com 40 anos ou mais, corrobora outros relatos e justifica-se pela frequência de comorbidades e pelo declínio imunológico apresentados por esse grupo (COLLIN et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010).

O emagrecimento mais evidente entre os adultos, em especial naqueles que evoluíram a óbito reforçam sua possível associação com o mau prognóstico (BADARÓ et al., 1986).

A palidez respondeu pelo quarto item mais comum entre as crianças e esteve presente em grande parte dos adultos que faleceram. Caldas et al. (2006) acharam diferença significativa entre adultos e crianças no que diz respeito à presença de palidez em pele e mucosas, podendo esta estar relacionada aos casos mais graves de anemia (STOLTZFUS et al., 1999).

A presença de comorbidades ou outras condições associadas em maior quantidade e frequência nos pacientes adultos, especialmente entre aqueles que foram a óbito, confirmam os achados de outros estudos (ALVARENGA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010) que associam comorbidade a desfecho desfavorável.

Ressalta-se a participação dos processos infecciosos como a pneumonia no quadro grave da LV tanto em adultos como em crianças, provavelmente em virtude da leucopenia, anemia e imunossupressão favoráveis a sua instalação (BARATI et al., 2008).

O etilismo foi encontrado como primeira condição mais prevalente entre os pacientes com desfecho fatal, corroborando o estudo de Oliveira et al. (2010). Aos prejuízos hepáticos causados por esse hábito somam-se as alterações provocadas pelo parasitismo neste órgão e pela toxicidade dos medicamentos utilizados (ALVARENGA et al., 2010; MEDEIROS et al., 2007; RATH et al., 2003).

Da mesma maneira, as complicações renais são relacionadas ao curso da LV e aos efeitos colaterais da terapia medicamentosa contribuindo para a gravidade (ALVARENGA et al., 2010; RATH et al., 2003; SALGADO FILHO; FERREIRA; COSTA, 2003). Aliado a isso, menciona-se a alta frequência de HAS e DM entre os pacientes que faleceram, possivelmente como consequências da idade. Segundo o Ministério da Saúde, a combinação dessas duas condições responde por 50,0% dos casos de insuficiência renal terminal e compõem a primeira causa de mortalidade e hospitalizações no Brasil (BRASIL, 2006c, 2006d). Portanto, essas comorbidades podem dificultar o manejo e tratamento, uma vez que oferecem riscos de complicações sistêmicas.

A desnutrição tem sido incluída entre os fatores que predis põem à evolução de formas sintomáticas (BADARÓ et al., 1986). Nesta pesquisa ocorreu em maior número nos pacientes que evoluíram a óbito, corroborando outros estudos que encontraram associação entre a presença de desnutrição e o risco de morte (COLLIN et al., 2004, OLIVEIRA et al., 2010).

Sabe-se que as doenças oportunistas aumentam o risco de morte em pacientes portadores de HIV independentemente da contagem de células CD4 (CHAISSON et al., 1998). Chaisson et al. (1998) ao estudarem pacientes soropositivos para HIV não encontraram associação de *Herpes zoster* com o óbito, porém a coinfeção com CMV aumentava esse risco. Nos casos de coinfeção *Leishmania*/HIV os fatores prognósticos, de sobrevida e causas de morte podem variar de acordo com o grupo estudado (ALVAR et al., 1997). Destaca-se na presente casuística a coinfeção com o vírus entre os adultos, reiterando o caráter oportunista da parasitose com infecções associadas.

Experimentalmente, há um incremento no crescimento de parasitas no interior de células derivadas da linhagem monocítica infectadas com *L. donovani* na presença de HIV-tipo1. Assim, pacientes assintomáticos podem sofrer reativação do parasitismo mediante a coinfeção com o vírus, da mesma forma que pacientes infectados com o HIV têm maior probabilidade de desenvolver a infecção por *Leishmania* (WOLDAY et al., 1998).

Os resultados laboratoriais hematológicos evidenciaram a pancitopenia tipicamente relatada na parasitose (CALDAS et al., 2006; RAI et al., 2008). Uma vez que não há relação com deficiência de ferro, vitamina B12 ou folato em alguns casos de anemia na LV sugere-se que a anormalidade da eritropoese seja uma das consequências da infecção (WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987). Por outro lado, as alterações hematológicas na parasitose são descritas como compatíveis com hiperesplenismo (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948) e com anemia de inflamação crônica (AL-JURAYYAN et al., 1995), que é caracterizada por hipoferrêmia na presença de estoques adequados de ferro (CANÇADO; CHIATTONE, 2002).

A velocidade de hemossedimentação (VHS) embora seja um exame bastante inespecífico devido à grande variedade de condições que a influenciam (COLLARES; VIDIGAL, 2004), encontra-se normalmente elevada nos pacientes com LV (BRASIL, 2006a; RAI et al., 2008). Na presente amostra não constituiu um achado raro, encontrando-se alterada em grande parte dos pacientes que tiveram esse exame realizado, e justifica-se pela influência do processo infeccioso e inflamatório presentes na LV, embora a anemia também possa acarretar essa alteração (COLLARES; VIDIGAL, 2004).

Sabe-se que as proteínas plasmáticas de alto peso molecular podem se ligar à membrana dos eritrócitos reduzindo o potencial negativo com consequente formação de *rouleaux*, caracterizado por hemácias empilhadas e aderidas e que favorece o aumento da VHS (SANTOS; CUNHA; CUNHA, 2000). Isso possivelmente explica a relação do aumento das globulinas com a alteração na VHS.

Quanto ao diagnóstico da parasitose, muitas técnicas com diferentes sensibilidade e especificidade são utilizadas, sendo a microscopia considerada o método confirmatório, porém, pelas dificuldades inerentes a esse método cogita-se sua substituição. Embora o critério de inclusão nesta pesquisa tenha sido a positividade em métodos parasitológicos, vale lembrar que a alta positividade do

parasitológico direto observada, pode ser atribuída à pesquisa sistemática de amastigotas no esfregaço do aspirado medular, uma vez que o diagnóstico só é considerado negativo após a observação de quatro lâminas, o que também já foi constatado por outros pesquisadores (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005).

O encontro de casos falso-negativos para sorologia e teste rápido na presente casuística recomenda alerta para a confiabilidade dessas técnicas. Embora a ausência de resposta sorológica em imunocomprometidos com *Leishmania* tenha sido relatada (PIARROUX et al., 1994), não se aplica a esse estudo, pois não foi encontrada essa relação entre os pacientes. Em relação à utilização do antígeno rk39 no teste imunocromatográfico, alguns estudos relatam altas sensibilidade (94-96%) e especificidade (95-99,7%) (ASSIS et al., 2008; BOELAERT et al., 2004; CHAPPUIS et al., 2006), em outros a sensibilidade não passa de 70% (ZIJLSTRA et al., 2001). Portanto, embora ofereçam vantagens como o uso na área de campo, resultados em curto espaço de tempo e baixo custo operacional (BOELAERT et al., 2004; DOURADO et al., 2007; SUNDAR et al., 2007), devem ser usados com cautela.

A baixa sensibilidade da cultura pode ser atribuída a amostras hemodiluídas ou pelo fato do paciente estar em tratamento paralelo como observado por Piarroux et al. (1994). Além disso, em alguns casos a terapia anti-*Leishmania* é iniciada antes da coleta do material para o diagnóstico. Considerando ainda a recomendação de inoculação em meio de cultura imediatamente após a obtenção do aspirado (BRASIL, 2006a; OPAS, 1996), o crescimento do parasita *in vitro* poderia estar sendo influenciado pela relativa demora no envio e processamento da amostra.

Quanto ao estudo da medula óssea, sabe-se que a presença de espículas é um fator determinante da boa qualidade da amostra (RYAN; FELGAR, 2006) e nesta casuística foi bastante prejudicado, possivelmente devido à hemodiluição pela técnica de coleta inadequada principalmente nas amostras de adultos.

Segundo Bain (2001a), a anestesia e sedação são recomendadas e podem explicar a melhor condição das amostras de crianças, uma vez que quando submetidas ao procedimento encontram-se sedadas (BRUSTOLONI<sup>1</sup>).

A celularidade medular na LV tem sido descrita como normal ou hiper celular com aumento da atividade eritropoética em diversos estudos, tanto para aspirados

---

<sup>1</sup> BRUSTOLONI, Y. M. (Setor de Pediatria, NHU/UFMS). Comunicação pessoal, 2010.

como para biópsias (DANESHOD; DEGHANI; DANESHOD, 2010; DHINGRA et al., 2010; KAGER; REES, 1986; ROCHA FILHO et al., 2000; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987). Porém, neste trabalho 65,3% das lâminas apresentaram material insatisfatório para os parâmetros de normalidade de acordo com a idade dos pacientes, contradizendo os resultados encontrados na literatura. Provavelmente a má qualidade das amostras medulares pela contaminação com sangue periférico pode justificar tal observação, como alertado por outros autores (BAIN, 2001a; LOKEN et al., 2009; RYAN; FELGAR, 2006) e, portanto, não pode ser atribuída à atividade da doença.

A presença do parasita no aspirado medular também é dependente da qualidade do material (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005). Assim, constatou-se que na ausência de espículas as amastigotas tendem à escassez, enquanto na presença delas a frequência dos parasitas era mais abundante. Aliado a isso, foi observada maior concentração de parasitas próxima às espículas, especialmente na porção final do esfregaço onde as mesmas se acumulam. Portanto, a sensibilidade da pesquisa direta, ainda que o examinador seja experiente e muitos campos sejam analisados, pode ser influenciada negativamente pela má qualidade do esfregaço. Amostras hemodiluídas e com baixa qualidade de coloração podem acarretar esfregaços inúteis e diagnósticos falsos negativos (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005).

Fica evidente a necessidade de otimizar a técnica de obtenção do aspirado medular a fim de melhorar a qualidade da amostra e conseqüentemente a sensibilidade e fidedignidade do diagnóstico.

Embora não tenha sido estabelecida associação, no presente trabalho as lâminas de crianças apresentaram maior riqueza de parasitas em concordância com o relato de Da Silva, Stewart e Costa (2005) que também encontraram um maior número de crianças fortemente parasitadas, e com o estudo de Costa et al. (2000) no qual atribuíram maior infectividade das crianças para *Lutzomyia longipalpis* e sugeriram que elas são importantes reservatórios da parasitose.

A trombocitopenia ou plaquetopenia é relacionada como a principal causa das tendências hemorrágicas na LV, determinando a gravidade do caso (BRASIL, 2006a; RAI et al., 2008). Nesta casuística os megacariócitos estavam ausentes ou reduzidos na maioria das lâminas (63,5%), entretanto, sua presença tem sido descrita como normal a aumentada em alguns pacientes com a parasitose (KUMAR

et al., 2007; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987). Essa diferença pode ser consequência do sucesso ou insucesso na coleta do aspirado medular (RYAN; FELGAR, 2006).

Em alguns casos de plaquetopenia com quantidade suficiente ou aumentada de megacariócitos no material medular, esses apresentavam-se imaturos ou com alterações morfológicas tais como microformas, hipolobulação, células em *cluster* e emperipolese, achados condizentes com a literatura (DHINGRA et al., 2010; ROCHA FILHO et al., 2000; YARALI et al., 2002). Assim, a atividade plaquetária diminuída ainda que a contagem de megacariócitos esteja normal pode ser atribuída à displasia megacariocítica. Relata-se a participação da coagulação intravascular disseminada em pelo menos alguns dos casos de coagulopatia na LV (AL-JURAYYAN et al., 1995), enquanto que em outros casos não foi observado o seu envolvimento (KAGER; REES, 1986).

A plasmocitose na LV é comumente relatada em amostras de aspirado e de biópsia medular, sendo justificada pela ativação do sistema imunológico (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010; DHINGRA et al., 2010; KUMAR et al., 2007; ROCHA FILHO et al., 2000), e foi um achado constante neste estudo.

O aumento das globulinas, ocasionando a inversão dessa fração protéica em relação à albumina, também é uma característica na evolução da LV, principalmente na sua forma clássica (BRASIL, 2006a; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; PEDROSA; ROCHA, 2004). Assim como ocorre no plasmocitoma, pela influência de hiperproteinemia (KASTNER, 1972), o aumento de plasmócitos e o aumento de globulinas constatados nesta pesquisa podem estar envolvidos na formação de *rouleaux*.

As células de Mott que têm sido descritas como achados incomuns (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010), no presente trabalho foram visualizadas principalmente nos casos de plasmocitose com células multinucleadas, assim como plasmócitos flamejantes, que são células encontradas especialmente em mieloma múltiplo de IgA e em situações de plasmocitose reativa (PANTANOWITZ; TRANOVICH; BALLESTEROS, 2001).

Um consenso na avaliação da medula óssea na LV tem sido o acentuado aumento de macrófagos, descrito com frequência (DHINGRA et al., 2010; BRASIL, 2006b) e não relacionado como causa da pancitopenia na LV (CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948). (BRASIL, 2006b; CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG,

1948). O achado de histiocitose em 56,9% dos pacientes, principalmente entre as crianças merece atenção especial devido à possível ocorrência de síndrome hemofagocítica secundária à LV, uma complicação citada como rara de acordo com alguns autores (AL-JURAYYAN et al., 1995; KUMAR et al., 2007).

A presença de *tart cell* e/ou hemofagocitose foi verificada em 45,0% dos pacientes, com predomínio em crianças e em lâminas que apresentavam riqueza de formas amastigotas. Wickramasinghe, Abdalla e Kasili (1987) analisaram a medula óssea de pacientes com LV pela microscopia eletrônica e verificaram células nucleadas anormais, sugerindo tratar-se de eritroblastos imaturos com lisossomos gigantes, e ocasionalmente eritroblastos anormais (intermediários ou tardios) que pareciam ter sido fagocitados por macrófagos.

Embora a LV seja definida como causa rara de síndrome hemofagocítica, neste estudo a proporção de pacientes com *tart-cell* e/ou hemofagocitose em AMO foi bem maior do que o encontrado, por exemplo, nos estudos de Dhingra et al. (2010) (11,11%) e Dash, Awasthi e Marwaha, (2005) (21.43%). Embora hiperferritinemia, hipofibrinogenemia e hemofagocitose no aspirado da medula óssea sejam características da linfocitose hemofagocítica (LHH), a dificuldade de diagnosticá-la quando associada com LV deve-se à semelhança das manifestações clínicas e laboratoriais da infecção e de atividade da doença (FILIPOVICH, 2008; FISMAN, 2000; TAPISIZ et al., 2007).

Além disso, os casos aqui relatados não podem ser determinados como LHH, pois trata-se de um estudo retrospectivo e não foi possível realizar os demais exames laboratoriais para a confirmação da síndrome segundo os critérios de Henter et al. (2007). Para apenas um desses pacientes constava a trigliceridemia no prontuário, que intrigantemente estava elevada (342 mg/dL). A ausência dessa informação nos prontuários evidencia que a LHH secundária à LV pode estar sendo subdiagnosticada. Alguns desses pacientes apresentavam simultaneamente emperipoese (sete), coinfeções virais, tais como HIV (quatro) e citomegalovírus (quatro), e lúpus eritematoso sistêmico (um), condições estas também relacionadas ao processo hemofagocítico (NOGUEIRA et al., 2009; SILVA et al., 2008).

De acordo com a literatura outro fator que pode dificultar o diagnóstico dessa associação é que nestes casos a presença de parasitas no aspirado medular à admissão é escassa ou reduzida, principalmente nos casos severos de hemofagocitose, que também podem ser negativos para a sorologia anti-

*Leishmania*. Em uma série de casos na França a LV não foi detectada inicialmente em cerca de 33,0% dos casos com LHH (FISMAN, 2000; GAGNAIRE; GALAMBRUN; STÉPHAN, 2000). Contrariando essas informações, a presença de *tart-cell* e/ou hemofagocitose foi associada à maior frequência de amastigotas no esfregaço medular dos pacientes aqui analisados. Ainda assim, a associação da LV com a LHH constitui um desafio, pois em alguns casos pode dificultar e retardar o diagnóstico da parasitose, o que tem impacto preponderante na mortalidade.

Embora não usual, foram visualizados parasitas no interior de precursores e PMN neutrófilos e eosinófilos. Alguns estudos têm descrito a presença de formas amastigotas no interior de células não histiocíticas (DANESHBOD; DEHGhani; DANESHBOD, 2010; DHINGRA et al., 2010). No estudo de Wickramasinghe, Abdalla e Kasili (1987) foram encontrados granulócitos parasitados e nestes casos estavam próximos a macrófagos infectados rompidos, sugerindo que os organismos localizados dentro dos granulócitos eram derivados de macrófagos danificados. Entretanto, não excluíram a possibilidade de que pelo menos alguns parasitas tenham sido liberados de macrófagos destruídos durante a aspiração medular e fagocitados pelos granulócitos no curto período entre a aspiração e a fixação do material medular para microscopia eletrônica, que foi inferior a 30 minutos. Sabe-se que os PMN desempenham um importante papel na resistência a *L. infantum* nas fases iniciais de infecções experimentais, porém aparentemente não estão envolvidos na proteção de cobaias cronicamente infectadas (ROUSSEAU et al., 2001).

Verificou-se também a presença de parasitismo em eritroblastos ortocromáticos e plasmócito, o que constitui evento raro, uma vez que tais células normalmente não desempenham papel fagocítico e na literatura pesquisada não foi encontrado relato semelhante.

Embora alguns autores relatem ausência ou reduzido número de eosinófilos em tecido medular de pacientes com LV (BRASIL, 2006b; CARTWRIGHT; CHUNG; CHANG, 1948), a eosinofilia não foi um achado raro entre os pacientes desse estudo, coincidindo com o descrito por outros autores (DANESHBOD; DEHGhani; DANESHBOD, 2010; DHINGRA et al., 2010), porém em maior frequência. Não puderam ser identificadas outras causas para a eosinofilia, portanto, não pode ser determinada sua relação com a LV.

Em infecções experimentais com diferentes espécies de *Leishmania* observou-se eosinofilia tecidual (DUARTE et al., 2010) como consequência de quimiotaxia exercida pelo parasita sobre essas células. Sugere-se que nestes casos há ativação dos eosinófilos e a quimiotaxia é independente de fatores do complemento (SAITO et al., 1996). Embora em outros processos infecciosos como na paracoccidiodomicose a eosinofilia em sangue periférico possa ser transitória e relacionar-se com a ativação de subpopulação Th2 na evolução grave da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 1992), na LV a presença de eosinófilos no sangue periférico é um índice de bom prognóstico ao final do tratamento (BRASIL, 2006a, 2006b), permitindo inferir que na redução do parasitismo medular, essas células são liberadas para a circulação periférica.

Sabe-se que a produção e função dos eosinófilos são influenciadas pela IL-5 e, portanto, estão aumentados em doenças caracterizadas pelo perfil de resposta Th2. Porém, em algumas infecções bacterianas pode ocorrer eosinopenia mesmo com a presença de proteína eosinofílica no soro, sugerindo o envolvimento de eosinófilos nos tecidos (WARDLAW, 2006), o que também pode explicar as diferenças encontradas em relação à eosinofilia medular e periférica.

Considerando que a ausência de eosinófilos foi detectada em menor proporção nesta casuística, sugere-se que quando da observação de tecido medular com eosinofilia o diagnóstico de LV não deve ser descartado.

Grânulos mistos nos eosinófilos também foram observados. Os grânulos basofílicos provavelmente são primários devido à origem comum dos eosinófilos e basófilos. A presença de células híbridas, contendo grânulos eosinofílicos e basofílicos simultaneamente, também tem sido relacionada à infidelidade no processo maturativo ocorrendo frequentemente em desordens neoplásicas (leucemias) (BOYCE et al., 1995; SCHMIDT; MLYNEK; LEDER, 1988).

Shariar et al. (1999) relataram a presença de expansões citoplasmáticas de granulócitos e macrófagos e posterior desprendimento de parte do citoplasma dessas células formando estruturas reconhecíveis no esfregaço. A destruição de macrófagos ocasiona a presença de restos citoplasmáticos ou do vacúolo parasitóforo, com ou sem a presença de amastigotas.

Esses achados são frequentes na LV (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010) e além de serem sugestivos da infecção por *Leishmania* com alta sensibilidade e especificidade, têm associação com a clínica. A formação de

todas essas estruturas parece ser consequência da destruição celular induzida pela liberação de cisteína proteinase principalmente após o rompimento dos macrófagos (SHAHRIAR et al., 1999).

A observação de fragmentos de granulócitos em esfregaços sanguíneos também tem sido associada a leucemias mieloides, infecções agudas e choque séptico (HANKER; GIAMMARA, 1983; KRAUSS et al., 1989). Nestes casos, devido à semelhança desses fragmentos com as plaquetas, deve-se atentar para uma pseudotrombocitose (DALAL; BRIGDEN, 2002).

Algumas alterações visualizadas na medula óssea destes pacientes com LV também são relatadas na mielocatexia, desordem congênita caracterizada pela hiperplasia granulocítica na medula óssea com alterações degenerativas. Os neutrófilos são típicos de apoptose, mecanismo central responsável pela hematopoese inefetiva e falência medular em síndromes mielodisplásicas (PAPADAKI; ELIOPOULOS, 2003). As alterações apoptóticas degenerativas nos precursores neutrofilicos são caracterizadas por *blebbing* da membrana citoplasmática, grânulos agregados, vacuolização citoplasmática e intensa condensação da cromatina nuclear.

Além disso, a deficiência na produção de GM-CSF poderia implicar em alterações na síntese de linhagens de células hematopoéticas, outro aparente mecanismo para a hipoplasia mieloide na LV (SHAHRIAR et al., 1999), embora Cotterell, Engwerda e Kaye (2000a, 2000b) tenham relatado o aumento seletivo de macrófagos estromais via esse mediador.

Nesta casuística foi observada nos esfregaços medulares transformação gelatinosa vista como material extracelular amorfo de coloração eosinofílica (RYAN; FELGAR, 2006). Essa alteração é caracterizada pela presença de material gelatinoso rico em ácido hialurônico, atrofia do tecido adiposo e associada com redução focal de células hematopoéticas. Frequentemente é confundida com edema, necrose ou amiloidose. Sua presença relaciona-se com grave perda de peso e caquexia, embora outros fatores como desnutrição possam desempenhar um importante papel na sua patogênese. A anemia, frequentemente vista nestes pacientes, não parece ser uma consequência da transformação gelatinosa. Além disso, é relatada em pacientes com anorexia nervosa, SIDA e estados febris agudos (DHINGRA et al., 2010; RYAN; FELGAR, 2006; SEAMAN; KJELDSBERG; LINKER, 1978). Assim, embora sejam raros os relatos dessa alteração na LV (DHINGRA et

al., 2010; VARMA et al., 1991), no presente estudo a mesma foi comum e pode ser justificada principalmente pela febre e emagrecimento presentes respectivamente em 93,3% e 44,4% dos pacientes que a apresentaram.

No presente estudo observou-se uma tendência de alterações mais evidente entre as crianças, uma vez que oito das desordens analisadas foram mais prevalentes neste grupo. Como já mencionado, embora a riqueza de parasitas no material de medula óssea não tenha sido estatisticamente relevante, outros estudos que também atribuíram maior parasitismo entre crianças (DA SILVA, STEWART E COSTA, 2005; COSTA et al., 2000) podem explicar a intensa reatividade da medula óssea nesta faixa etária.

Além das alterações celulares que caracterizam diseritropoese, mielodisplasia e/ou apoptose (DANESHBOD; DEGHANI; DANESHBOD, 2010; DHINGRA et al., 2010; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987), eventualmente foram visualizados dacriócitos e células em alvo. Embora dacriócitos sejam relacionados com fibrose medular que sabidamente ocorre na LV (KUMAR et al., 2007; ROCHA FILHO et al., 2000), na presente casuística não foi possível essa associação tendo em vista que não foi realizado o estudo por meio de biópsia e sim por aspirado. Já a presença de células em alvo geralmente é atribuída à doença hepática obstrutiva. Tais alterações nos eritrócitos são relatadas, ainda, em casos de talassemia, deficiência de ferro e síndrome mielodisplásica (BULL, 2006; SALVIOLI et al., 1978).

Assim, as disfunções hematológicas na LV podem ser atribuídas a um conjunto de fatores como: hiperesplenismo, diseritropoese e eritropoese ineficaz, hemofagocitose, hemólise, mielodisplasia, hiperplasia reticuloendotelial com retenção de ferro e inflamação crônica (AL-JURAYYAN et al., 1995; SHAHRIAR et al., 1999; WICKRAMASINGHE; ABDALLA; KASILI, 1987; YARALI et al., 2002).

A infecção por *Leishmania* em pacientes com neoplasias hematológicas como as leucemias, confirmam o caráter oportunista do parasita, uma vez que esses pacientes apresentam-se imunocomprometidos em decorrência de prejuízo nos processos de fagocitose (principalmente pela neutropenia), imunidade celular e humoral. Essa associação pode dificultar o diagnóstico e o manejo dos pacientes devido à semelhança das manifestações clínicas e laboratoriais, tendo em vista que ambas podem cursar com febre, esplenomegalia, emagrecimento, pancitopenia e alterações no tecido medular, como os casos diagnosticados na presente casuística

e na literatura (FAKHAR et al., 2008; PRASAD et al., 2009; SAH et al., 2002; YARALI et al., 2002).

Há relato da associação da LV em paciente com leucemia linfóide aguda (LLA) cursando com dores ósseas, febre prolongada e medula óssea hipocelular com muitas amastigotas (FAKHAR et al., 2008). Porém, em um caso de remissão da leucemia em que a LV foi diagnosticada incidentalmente, a febre estava ausente e os exames laboratoriais normais (MEHROTRA et al., 1995). Os pacientes eram crianças e foi relatado sucesso no tratamento com anfotericina B associada a IFN- $\gamma$ , e com pentamidina após a falência do estibugloconato de sódio, respectivamente.

Quanto à presença concomitante de LV e leucemia mieloide aguda (LMA) ou com leucemia mieloide crônica (LMC), o paciente pode apresentar febre, palidez e hepatoesplenomegalia; exames laboratoriais com anemia, plaquetas normais ou diminuídas, e acentuada leucocitose com aumento de blastos. Nestes casos há hiperplasia mieloide no mielograma, com incremento dos blastos e RGE de até 15:1 (SAH et al., 2002).

Síndrome mielodisplásica comprometendo as três linhagens também pode estar associada à LV e responde bem ao tratamento com antimoniato ou anfotericina B, com regressão das manifestações clínicas e das alterações mielodisplásicas (PRASAD et al., 2009; YARALI et al., 2002). A hematopoese ineficaz pode ser atribuída aos elevados níveis de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), sendo a mielodisplasia responsável pela pancitopenia juntamente com outros fatores tais como hiperesplenismo e hemólise. Os precursores eritroides podem apresentar alterações megaloblásticas com multinuclearidade e núcleos irregulares com pontes. Na série mieloide há lobulação anormal e alterações megaloblásticas especialmente em metamielócitos; e hiper ou hipogranulação em neutrófilos maduros. A displasia megacariocítica inclui núcleo único não lobulado ou múltiplos núcleos separados, emperipolese e microformas (YARALI et al., 2002), alterações essas também observadas no presente trabalho.

Em virtude da elevada toxicidade dos medicamentos atualmente em uso para o tratamento da LV, a instituição da terapia anti-*Leishmania* sem o diagnóstico definitivo pode ser uma conduta arriscada podendo acarretar inclusive o óbito (ALVARENGA et al., 2010; CHAPPUIS et al., 2007; RATH et al., 2003; SHARMA et al., 2008). Considerando que os recentes métodos diagnósticos incorporados na rotina têm apresentado diversas limitações, entre elas a alta frequência de

resultados falso-negativos; e que o aspirado esplênico oferece um risco de morte maior, até 50 vezes mais, quando comparado com o aspirado medular (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005), critérios que aumentem a sensibilidade e especificidade da pesquisa parasitológica em amostra de medula óssea devem ser desenvolvidos com o objetivo de reduzir a morbidade e a mortalidade na LV (SHAHRIAR et al., 1999).

Deve-se ressaltar que a maioria dos estudos sistemáticos de medula óssea citados foi realizada na Índia, China, Arábia Saudita e Irã onde as espécies causadoras de LV são *L. donovani* e *L. infantum*. Considerando que o agente etiológico nas Américas, embora questionado por alguns autores, é uma espécie diferente das outras existentes no Velho Mundo (BRASIL, 2006a); e que o único trabalho anteriormente relatado no Brasil pesquisou amostras de biópsia medular (ROCHA FILHO et al., 2000), esta é uma pesquisa pioneira. Portanto, são necessários maiores estudos a fim de elucidar as razões para as diferenças encontradas entre o presente estudo e a literatura.

O conhecimento dos achados mais comuns, assim como daqueles mais raros que podem estar presentes no material medular de pacientes com LV, pode auxiliar no diagnóstico precoce e preciso, permitindo terapêutica adequada.

A presença das alterações relatadas neste estudo deve incentivar o examinador a uma pesquisa meticulosa de formas do parasita nos esfregaços de medula óssea, principalmente se apresentarem manifestações clínicas compatíveis e/ou o paciente for proveniente de área endêmica para a parasitose. No entanto, mesmo que todas estas alterações sejam observadas em caso suspeito, o diagnóstico de LV não pode ser determinado sem a visualização de amastigotas.

Muitas das fases envolvidas na técnica estão fora do alcance do responsável pela análise laboratorial, em especial na fase pré-analítica que inclui o preparo do paciente, a coleta, manipulação e armazenamento da amostra até o momento em que o exame é realizado. Considerando que aproximadamente 80,0% das falhas nos resultados laboratoriais são atribuídos a fatores relacionados às fases pré e pós-analíticas (CARRARO; PLEBANI, 2007; LIMA-OLIVEIRA et al., 2009; PEBLANI, 2006); e que há falhas na coleta de material medular como foi mostrado aqui, sugere-se um treinamento a todos profissionais de saúde, mesmo quando não pertencem à equipe do laboratório, mas que são responsáveis pela coleta de amostras para fins diagnósticos.

Assim, a sensibilidade da microscopia poderia, por exemplo, ser aumentada com padronizações: na fase pré-analítica, quanto à coleta e confecção do esfregaço a fim de garantir a boa qualidade do material; e na fase analítica, pela pesquisa minuciosa de formas do parasita preferencialmente na porção final do esfregaço, por profissional experiente atento a todos os detalhes sugestivos como já observado por outros autores (DA SILVA; STEWART; COSTA, 2005; OPAS, 1996). Portanto, é possível uma coordenação entre os membros de diversos setores a fim de que o resultado do exame seja de qualidade e fidedigno, evitando gastos desnecessários com outros métodos, internação, tratamento inadequado e desfecho fatal.

## 7 CONCLUSÕES

A maioria dos pacientes foi crianças, do sexo masculino, procedentes de Campo Grande;

Sinais e sintomas clássicos da LV, tais como febre e hepatoesplenomegalia, estiveram presentes em alta frequência, principalmente entre as crianças;

Os exames laboratoriais evidenciaram pancitopenia, aumento da VHS, redução da albumina e aumento de globulinas séricas;

A maioria dos esfregaços medulares não apresentou espículas e megacariócitos estavam reduzidos, sugerindo insucesso na obtenção do material medular principalmente entre os adultos;

A maior parte dos esfregaços apresentou celularidade insatisfatória que foi relacionada à ausência de espículas e, portanto, não pode ser atribuída à atividade da parasitose;

Houve associação entre a ausência de espículas e escassez de parasitas nos esfregaços;

Plasmocitose foi observada em 63,9% dos casos, em associação com hiperglobulinemia, e células de Mott em 17,3%;

A presença de *rouleaux* foi verificada em 84,7% dos casos;

Histiocitose foi observada em 56,9% das lâminas e *tart cell* e/ou hemofagocitose em 45,0% dos esfregaços, principalmente nas amostras de crianças;

Polimorfonucleares parasitados foram visualizados em 21,3% dos casos, especialmente na presença abundante de formas parasitárias;

A presença de parasitismo em eritroblastos ortocromáticos e plasmócito é pela primeira vez relatada e foi associada à frequência de parasitas na lâmina;

Eosinofilia no tecido medular foi observada em 44,1% dos casos e grânulos mistos também foram observados;

Estruturas relacionadas à parasitose tais como expansões citoplasmáticas (75,2%), restos celulares diversos (66,8%) e fragmentos de granulócitos (55,0%) foram visualizadas nos esfregaços medulares;

Alteração medular característica de transformação gelatinosa foi observada em 44,6% das lâminas;

Outras alterações observadas eram características de diseritropoese, mielodisplasia e/ou apoptose.

## 8 RECOMENDAÇÕES

Diante do exposto, sugere-se o desenvolvimento de um protocolo com orientações quanto à obtenção do aspirado de medula óssea e à análise do esfregaço, com o objetivo de contribuir para o melhor desempenho da microscopia no diagnóstico da LV.

O protocolo deverá conter a descrição de técnicas reforçando as boas práticas nos procedimentos de coleta e manipulação da amostra medular, a fim de obter um material de boa qualidade para a análise.

Deverão constar também, sugestões e ilustrações que facilitem e otimizem a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* nos esfregaços de medula óssea, voltadas para os profissionais do laboratório.

## REFERÊNCIAS

ABBOUD, C. N.; LICHTMAN, M. A. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: WILLIAMS, W. J.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Hematology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. chap. 4, p. 35-72.

AGARWAL, S.; NARAYAN, S.; SHARMA, S.; KAHKASHAN, E.; PATWARI, A. K. Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Pediatrics**, New Delhi, v. 73, p.445-446, May 2006.

AL-JURAYYAN, N. A.; AL-NASSER, M. N.; AL-FAWAZ, I. M.; AL AYED, I. H.; AL HERBISH, A. S.; AL-MAZROU, A. M.; AL SOHAIBANI, M. O. The haematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 41, n. 3, p. 143-148, June 1995.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 112, p. 2993-3002, 1999.

ALVAR, J.; MOLINA, R.; SAN ANDRES, M.; TESOURO, M.; NIETO, J., VITUTIA, M.; GONZALES, F.; SAN ANDRES, M. D.; BOGGIO, J.; RODRIGUES, F. Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Germantown, v. 88, p. 371–378, 1994.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR, B.; JIMENEZ, M., LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; MOLINA, R.; MORENO, J. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 10, n. 2, p. 298-319, Apr. 1997.

ALVARENGA, D. G.; ESCALDA, P. M. F.; DA COSTA, A. S. V.; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.43, n. 2, p. 194-197, mar./abr. 2010.

ALVES, A. C. Histologia da medula óssea. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 183-188, 2009.

ANTINORI, S.; CALATTINI, S.; LONGHI, E.; BESTETTI, G.; PIOLINI, R.; MAGNI, C.; ORLANDO, G.; GRAMICCIA, M.; ACQUAVIVA, V.; FOSCHI, A.; CORVASCE, S.; COLOMBA, C.; TITONE, L.; PARRAVICINI, C.; CASCIO, A.; CORBELLINO, M. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 44, p. 1602–1610, June 2007.

ASSIS, T. S. M.; BRAGA, A. S. C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C.; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BIÁ, M.; CALDAS, A. J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 107-116, abr./jun. 2008.

AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá, 2007.

BACHORIK, P. S.; RIFKIND, B. M.; KWITEROVICH, P. O. Lipídeos e dislipoproteinemias. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999. cap. 10, p. 208-236.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; CARVALHO, E. M.; SAMPAIO, D.; REED, S. G.; BARRAL, A.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON Jr, W. D. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago v. 154, n. 6, p. 1003-1011, Dec. 1986.

BAIN, B. J. Bone marrow aspiration. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 54, p. 657-663, 2001a.

BAIN, B. J. Bone marrow trephine biopsy. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 54, p. 737-742, 2001b.

BARÃO, S. C.; CAMARGO-NEVES, V. L. F.; RESENDE, M. R.; SILVA, L. J. Human asymptomatic infection in visceral leishmaniasis: a seroprevalence study in an urban area of low endemicity. Preliminary results. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 77, n. 6, p. 1051-1053, 2007.

BARATI, M.; SHARIFI, I.; DAIE PARIZI, M.; FASIHI HARANDI, M. Bacterial infections in children with visceral leishmaniasis: observations made in Kerman province, southern Iran, between 1997 and 2007. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Germantown, v. 102, n. 7, p. 635-641, Oct. 2008.

BARBOSA, R. N. P.; CORRÊA, Z. J. C.; JESUS, R. C. S.; EVERDOSA, D. R.; BRANDÃO, J. A.; COELHO, R. N.; MONTEIRO, A. J. O.; MACHADO, R. S.; LUZ, J. B. P.; MARTINS, A. F. P.; BRANDÃO, R. C. F.; LIMA, J. A. N.; BARATA, I. R.; PINHEIRO, M. S. B.; LEÃO, E. F.; SILVA, F. M. M.; SILVA, M. G. S.; CAMPOS, M. B.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; SILVEIRA, F. T. Novas evidências sobre o valor diagnóstico da reação de imunofluorescência indireta e reação intradérmica de hipersensibilidade tardia na infecção humana por *Leishmania (L.) infantum chagasi* na Amazônia, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Belém, v. 1, p. 33-44, 2010.

BEENA, K. R.; RAMESH, V.; MUKHERJEE, A. Identification of parasite antigen, correlation of parasite density and inflammation in skin lesions of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, v. 30, p. 616-620, 2003.

BERMAN, J. D.; DWYER, D. M.; WYLER, D. J. Multiplication of *Leishmania* in human macrophages in vitro. **Infection and Immunity**, Washington, v. 26, n. 1, p. 375-379, Oct. 1979.

BOELAERT, M.; RIJAL, S.; REGMI, S.; SINGH, R.; KARKI, B.; JACQUET, D.; CHAPPUIS, F.; CAMPINO, L.; DESJEUX, P.; LE RAY, D.; KOIRALA, S.; VAN DER STUYFT, P. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 70, n. 1, p. 72-77, 2004.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 22-28, 1999.

BOGGILD, A. K.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; ESPINOSA, D.; AREVALO, J.; ADAUI, V.; TULLIANO, G.; LLANOS-CUENTAS, A.; LOW, D. E. Evaluation of a microculture method for isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions of patients in Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, n. 11, p. 3680-3684, Nov. 2007.

BONDURANT, M. C.; KOURY, M. J. Origin and development of blood cells. In: LEE, G. R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J. P.; RODGERS, G. M. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. chap. 8, p. 145-168 (volume 1).

BOTELHO, A. C. A.; NATAL, D. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 42, n. 5, p. 503-508, set./out. 2009.

BOYCE, J. A.; FRIEND, D.; MATSUMOTO, R.; AUSTEN, F.; OWEN, W. F. Differentiation in vitro of hybrid eosinophil/basophil granulocytes: autocrine function of an eosinophil developmental intermediate. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 182, p. 49-57, July 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose visceral grave: normas e condutas**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Cadernos de atenção básica: hipertensão arterial sistêmica (nº 15)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Cadernos de atenção básica: diabetes mellitus (nº 16)**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006d.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2008.

BRUSTOLONI, Y. M.; CUNHA, R. V.; DORVAL, M. E.; OSHIRO, E. T.; PONTES, E. R. J. C.; OLIVEIRA, A. L. L.; HILLEBRAND, L.; RIBEIRO, L. F. Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children of the Center-West region of Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 1, p. 106-109, 2007.

BULL, B. S. Morphology of the erythron. In: WILLIAMS, W. J.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Hematology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. chap. 28, p. 369-385.

BURCHMORE, R. J. S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, Oxford-New York, v. 31, p. 1311-1320, 2001.

BURKHARDT, R.; FRISCH, B.; BARTL, R. Bone biopsy in haematological disorders. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 35, p. 257-284, 1982.

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 Tropica**, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 252-258, 2006.

CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Anemia de Doença Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 127-136, 2002.

CARRARO, P.; PLEBANI, M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 1338-1342, 2007.

CARTWRIGHT, G. E.; CHUNG, H. L.; CHANG, A. Studies on the pancytopenia of kala-azar. **Blood**, New York, v. 3, p. 249-275, Mar. 1948.

CARVALHO, E. M.; TEIXEIRA, R. S.; JOHNSON Jr, W. D. Cell-mediated immunity in american visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 33, n. 2, p. 498-502, Aug. 1981.

CARVALHO, J. M.; SOUZA, M. K.; BUCCHERI, V.; RUBENS, C. V.; KERBAUY, J.; OLIVEIRA, J. S. R. CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogenic donors. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 127, p. 12-8, 2009.

CHAISSON, R. E.; GALLANT, J. E.; KERULY, J. C.; MOORE, R. D. Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. **AIDS**, London, v. 12, n. 1, p. 20-33, Jan. 1998.

CHAPPUIS, F.; RIJAL, S.; SOTO, A.; MENTEN, J.; BOELAERT, M. A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. **British Medical Journal**, London, v. 333, p. 723-726, 2006.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, Basingstoke, v. 5, n. 11, p. 873-882, Nov. 2007.

COLLARES, G. B.; VIDIGAL, P. G.; Recomendações para o uso da velocidade de hemossedimentação. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 14, n. 1, p. 52-57, 2004.

COLLIN, S. M.; 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. **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 38, n. 5, p. 612-619, Mar. 2004.

COSTA, C. H.; GOMES, R. B.; SILVA, M. R.; GARCEZ, L. M.; RAMOS, P. K.; SANTOS, R. S.; SHAW, J. J.; DAVID, J. R.; MAGUIRE, J. H.; Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 182, p. 997-1000, Sep. 2000.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 2, p. 223-228, mar./abr. 2001.

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**, New York, v. 95, p. 1642-1651, 2000a.

COTTERELL, S. E. J.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1840-1848, Apr. 2000b.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Estudos sobre o parasito. In: Leishmaniose Visceral Americana, nova entidade mórbida do homem na América do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 329-337, 1937.

CURY, P. M. Biópsia de medula óssea e sua interpretação – o papel do hematopatologista. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 79-80, 2003 .

DA SILVA, M. R. B.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Sensitivity of bone marrow aspirates in the diagnosis of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 72, n. 6, p. 811-814, 2005.

DABIRI, S.; HAYES, M. M. M.; MEYMANDI, S. S.; BASIRI, M.; SOLEIMANI, F.; MOUSAVI, M. R. A. Cytological features of “dry-type” of cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Cytopathology**, New York, v. 19, n. 3, p. 182-185, 1998.

DALAL, B. I.; BRIGDEN, M. L. Artifacts that may be present on a blood film. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 22, n. 1, p. 81-100, Mar. 2002.

DANESHBOD, Y.; DEHGHANI, S. J.; DANESHBOD, K. Bone marrow aspiration findings in kala-azar. **Acta cytologica**, Baltimore, v. 54, p. 12-24, Jan./Feb. 2010.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 117-118, Feb. 2006.

DASH, S.; AWASTHI, A.; MARWAHA, R. K. Haematological profile of childhood visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Hyderabad, v. 48, n. 1, p. 4-6, Jan. 2005.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J. W. O. Deltamethrin-impregnated dog collars have a potent anti-feeding and insecticidal effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 6, p. 839-847, Aug. 2001.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 419-421, 1954.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 47, p. 75-87, 1955a.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**, Rio de Janeiro, v. 48, p. 61-76, 1955b.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 4, p. 198-212, 1962.

DENNIS, V. A.; LUJAN, R.; CHAPMAN, W. L. JR; HANSON, W. L. *Leishmania donovani*: cellular and humoral immune responses after primary and challenge infections in squirrel monkeys, *Saimiri sciureus*. **Experimental Parasitology**, St. Louis, v. 61, n. 3, p. 319-334, Jun. 1986.

DEPS, P. D.; VIANA, M. C.; FALQUETO, A.; DIETZE, R. Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil glucamina e do Estibogluconato de Sódio BP 88<sup>R</sup> no tratamento da leishmaniose cutânea localizada. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 6, p. 535-543, nov./dez. 2000.

DEREURE, J.; PRATLONG, F.; REYNES, J.; BASSET, D.; BASTIEN, P.; DEDET, J. P. Haemoculture as a tool for diagnosing visceral leishmaniasis in HIV-negative and HIV-positive patients: interest for parasite identification. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 76, n. 2, p. 203-206, 1998.

DESJARDINS, M.; Descoteaux, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 185, n. 12, p. 2061-2068, June 1997.

DESJEUX, P. Global control and *Leishmania* HIV co-infection. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 17, p. 317-3325, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, New York, v. 27, p. 305-318, 2004.

DOTIS, J.; RITSAS, I.; TSANTALI, C.; TSIOURIS, J.; HARALABIDIS, S.; ROILIDES, E. Immune haemolytic anaemia due to visceral leishmaniasis in a young child. **European Journal of Pediatrics**, Berlin- Heidelberg, v. 162, p. 49-50, 2003.

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 3, p. 205-214, set./dez. 2007.

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 Journal of Pathology and Microbiology**, Chandigarh, v. 53, n.1, p. 96-100, Jan./Mar. 2010.

DUARTE, I. R. M.; ARRUDA, C. C. P.; ANDRADE, A. R. O.; NUNES, V. L. B.; SOUZA, A. I. ; DOURADO, D. M.; COSTA, S. C. G. Comportamento biológico de *Leishmania (L.) amazonensis* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 1, p. 33-40, jan./mar. 2010.

DUTRA, M.; MARTINELLI, R.; DE CARVALHO, E. M.; RODRIGUES, L. E.; BRITO, E.; ROCHA, H. Renal involvement in visceral leishmaniasis. **American Journal of Kidney Diseases**, Duluth, v. 6, n. 1, p. 22-27, July 1985.

EID, A.; CARION, W.; NYSTROM, J. S. Differential diagnoses of bone marrow granuloma. **Western Journal of Medicine**, San Francisco, v. 164, n. 6, p. 510-515, June 1996.

EL HAG, I. A.; HASHIM, F. A.; EL TOUM, I. A.; HOMEIDA, M.; EL KALIFA, M.; EL HASSAN, A. M. Liver morphology and function in visceral leishmaniasis (Kala-azar). **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 47, p. 547-551, 1994.

EL-SHOURA, S. M. Visceral leishmaniasis: III. Effect of parasitaemia level on the bone marrow ultrastructure. **Applied Parasitology**, Bonn, v. 35, n. 1, p. 61-69, Feb. 1994.

FADEM, R. S.; BERLIN, I.; YALOW, R. Comparisons between bone marrow differentials prepared from particles and from random samples of aspirate and determinations of the dilution of aspirate with peripheral blood utilizing radioactive phosphorus (P32). **Blood**, New York, v. 6, p. 160-174, Feb. 1951.

FAKHAR, M.; ASGARI, Q.; MOTAZEDIAN, M. H.; MONABATI, A. Mediterranean visceral leishmaniasis associated with acute lymphoblastic leukemia (ALL). **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, p. 473-475, 2008.

FAYZI, M. A. H.; FANID, L. M.; FAYZI, A. A. H.; POUR, M. A. M.; FARAJNIA, S.; NAKHLBAND, A. Detection of *Leishmania infantum* minicircle kinetoplast DNA in bone marrow and peripheral blood samples of paediatric patients from Children's Hospital of Tabriz Medical University. **Biotechnology**, Stoneham, v. 7, p. 175-181, 2008.

FILIPOVICH, A. H. Hemophagocytic lymphohistiocytosis and other hemophagocytic disorders. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, Philadelphia, v. 28, p. 293-313, 2008.

FISMAN, D. N. Hemophagocytic syndromes and infection. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 6, n. 6, p. 601-608, Nov./Dec. 2000.

FRAGA, T. L.; BRUSTOLONI, Y. M.; LIMA, R. B.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, J.; OLIVEIRA, A. L. L.; PIRMEZ, C. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 3, p. 310-313, May 2010.

FURLAN, M. B. G. Epidemia de leishmaniose visceral no município de Campo Grande-MS, 2002 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 15-24, jan./mar. 2010.

GAGNAIRE, M.-H.; GALAMBRUN, C.; STÉPHAN, J. L. Hemophagocytic syndrome: a misleading complication of visceral leishmaniasis in children — A series of 12 cases. **Pediatrics**, Evanston, v. 106, p. E58, 2000.

GALATI, E. A. B.; NUNES, V. L. B.; CRISTALDO, G.; ROCHA, H. C. Aspectos do comportamento da fauna flebotomínea (Diptera:Psychodidae) em foco de leishmaniose visceral e tegumentar na Serra da Bodoquena e área adjacente, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 32, n. 2, p. 235-261, 2003.

GAMA, M. E. A.; COSTA, J. M. L.; GOMES, C. M. C.; CORBETT, C. E. P. Subclinical form of the american visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 8, p. 889-893, Dec. 2004.

GIBBONS, A. E.; PRICE, P.; SHELLAM, G. R. Analysis of hematopoietic stem and progenitor cell populations in cytomegalovirus-infected mice. **Blood**, New York, v. 86, n. 2, p. 473-481, 15 July 1995.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Brasília, v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, p. 615-623, 2004.

GRADONI, L.; GRAMICCIA, M.; SCALONE, A. Visceral Leishmaniasis treatment, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 9, n. 12, p. 1617-1620, Dec. 2003.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 6, n. 3, p. 230-250, July 1993.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 41, p. 687-725, 1989.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESON, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 2, p. 494-501, 2002.

GUERRA, L. L.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; REIS, A. B.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, Berlin, v. 104, p. 611-622, 2009.

GUPTA, V.; TRIPATHI, S.; TILAK, V.; BHATIA, B. D. A study of clinico-haematological profiles of pancytopenia in children. **Tropical Doctor**, London, v. 38, p. 241-243, Oct. 2008.

HANKER, J. S.; GIAMMARA, B. L. Neutrophil pseudoplatelets: their discrimination by myeloperoxidase demonstration. **Science**, New York, v. 220, n. 4595, p. 415-417, Apr. 1983.

HAYHOE, F. G. J.; FLEMANS, R. J. **Um atlas colorido de Citologia Hematológica**. 2. ed. Tradução por Mihoko Yamamoto, Jose Orlando Bordin, Marcus Antonio Mieza e Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chanffaille. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989. 240 p.

HENTER, J.-I.; HORNE, A. C.; ARICÓ, M.; EGELER, M.; FILIPOVICH, A. H.; IMASHUKU, S.; LADISCH, S.; McCLAIN, K.; WEBB, D.; WINIARSKI, J.; JANKA, G.

HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Pediatric Blood & Câncer**, Hoboken, v. 48, p. 124-131, 2007.

HIDE, M.; SINGH, R.; KUMAR, B.; BAÑULS, A. L.; SUNDAR, S. A microculture technique for isolating live *Leishmania* parasites from peripheral blood of visceral leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 102, n. 3, p. 197-200, 2007.

HOFFBRAND, A. V.; PETTIT, J. E. **Hematologia Clínica Ilustrada**. Tradução por Jacob Israel Lemos. São Paulo: Manole, 1991. Tradução de: Clinical Haematology Illustrated.

HUTCHISON, R. E.; DAVEY, F. R. Hematopoiese. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999. cap. 25, p. 594-616.

JANKA, G.; ZUR STADT, U. Familial and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. **Hematology**, Washington, v. 1, p. 82-88, 2005.

JHA, A.; SAYAMI, G.; ADHIKARI, R. C.; PANTA, A. D.; JHA, R. Bone marrow examination in cases of pancytopenia. **Journal of Nepal Medical Association**, Kathmandu v. 47, n. 1, p. 12-17, Jan./Mar. 2008.

KAGER, P. A.; REES, P. H. Haematological investigations in visceral leishmaniasis. **Tropical and Geographical Medicine**, Amsterdam, v. 38, n. 4, p. 371-379, 1986.

KASTNER, M. R. Q. Estudo dos elementos celulares na medula humana dos adultos I. Linhagem plasmocitária. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 70, n. 3, p. 269-284, 1972.

KAUSHANSKY, K. Hematopoietic stem cells, progenitors, and cytokines. In: WILLIAMS, W. J.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Hematology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. chap. 15, p. 201-220.

KILANI, B.; AMMARI, L.; KANOUN, F.; CHAABANE, T. B.; ABDELLATIF, S.; CHAKER, E. Hemophagocytic syndrome associated with visceral leishmaniasis. **International Journal of Infectious Diseases**, St. Louis, v. 10, p. 85-86, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, St. Albans, v. 4, p.1-24, 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; FOCHEUX, C.; DEREURE, J.; PUECH, M. P.; CADIERGUES, M. C. Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, St. Albans, v. 11, p.105-111, 1997.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 37, p. 1087–1096, Aug. 2007.

KNOWLES, S.; HOFFBRAND, A. V. Bone-marrow aspiration and trephine biopsy (1). **British Medical Journal**, London, p. 204-205, 19 July 1980a.

KNOWLES, S.; HOFFBRAND, A. V. Bone-marrow aspiration and trephine biopsy (2). **British Medical Journal**, London, p. 280-281, 26 July 1980b.

KOPP, H-G.; AVECILLA, S. T.; HOOPER, A. T.; RAFII, S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. **Physiology**, Bethesda, v. 20, p. 349-356, 2005.

KRAUSS, J. S.; DOVER, R. K.; KHANKHANIAN, N. K.; TOM, G. D. Granulocytic fragments in sepsis. **Modern Pathology**, v. 2, n. 4, p. 301-305, July 1989.

KUMAR, P. V.; VASEI, M.; SADEGHIPOUR, A.; SADEGHI, E.; SOLEIMANPOUR, H.; MOUSAVI, A.; TABATABAEI, A. H.; RIZVI, M. M. Visceral leishmaniasis: bone marrow biopsy findings. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, New York, v. 29, n. 2, p. 77-80, Feb 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press. v. 1, p. 1-120, 1987.

LE FICHOUX, Y.; QUARANTA, J. F.; AUFEUVRE, J. P.; LELIEVRE, A.; MARTY, P.; SUFFIA, I.; ROUSSEAU, D.; KUBAR, J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1953-1957, June 1999.

LEHMANN, H. P.; HENRY, J. B. Unidades SI. In: HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19. ed. São Paulo: Manole, 1999. apêndice 4, p. 1449-1465.

LIMA-OLIVEIRA, G. S.; PICHETH, G.; SUMITA, N. M.; SCARTEZINI, M. Controle da qualidade na coleta do espécime diagnóstico sanguíneo: iluminando uma fase escura de erros pré-analíticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 6, p. 441-447, dez. 2009.

LIVNI, N.; ABRAMOWITZ, A.; LONDNER, M.; OKON, E.; MORAG, A. Immunoperoxidase method of identification of *Leishmania* in routinely prepared histological sections. **Virchows Archiv - A - Pathological Anatomy and Histopathology**, Berlin, v. 401, 147-151, 1983.

LOFFLER, H.; RASTETTER, J. **Atlas Colorido de Hematologia**. 5. ed. Tradução por Cláudia Lúcia Caetano de Araújo. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 414 p. Tradução de: Atlas of Clinical Hematology.

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

LORAND-METZE, I. A importância da integração de dados do diagnóstico das hemopatias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 189-191, 2009.

MAHAJAN, V.; MARWAHA, R. K. Immune mediated hemolysis in visceral leishmaniasis. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 53, n. 4, p. 284-286, 2007.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2941-2947, dez. 2008.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, suppl. 2, p. s359-s375, 1994.

MATHUR, P.; SAMANTARAY, J. C.; SAMANTA, P. Fatal haemophagocytic syndrome and hepatitis associated with visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Bhubaneswar, v. 25, n. 4, p. 416-418, Oct./Dec. 2007.

MATO GROSSO DO SUL (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. **Número Absolutos de Casos de Leishmaniose Visceral, Mato Grosso do Sul, 1999-2010**, SINAN, 2010. Disponível em: <[http://www.sgi.ms.gov.br/pantaneiro/sites/saude/index.php?templat=list&voltar=home&id\\_comp=634](http://www.sgi.ms.gov.br/pantaneiro/sites/saude/index.php?templat=list&voltar=home&id_comp=634)>. Acesso em: 23 jun. 2010.

MAURÍCIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

McCLUGAGE, S. G.; McCUSKEY Jr, R. S.; MEINEKE, H. A. Microscopy of living bone marrow in situ. **Blood**, New York, v. 38, n. 1, p. 87-95, July 1971.

MEDEIROS, F. S.; TAVARES-NETO, J.; D' OLIVEIRA Jr, A.; PARANÁ, R. Alteraciones hepáticas en la leishmaniasis visceral (Kalazar) en niños: revisión sistemática de la literatura. **Acta Gastroenterológica Latinoamericana**, Buenos Aires, v. 37, n. 3, p. 150-157, Sept. 2007.

MEHROTRA, R.; CHOUDHRY, V. P.; SAXENA, R.; KAPILA, K.; SARAYA, A. K. Asymptomatic visceral leishmaniasis in a child with acute lymphoblastic leukaemia. **Journal of Infection**, London, v. 30, p.157-159, Mar. 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2008**, SINAN, 2009a. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_conf\\_lv\\_brasil\\_gr\\_uf\\_1990\\_2008.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_lv_brasil_gr_uf_1990_2008.pdf)>. Acesso em: 20 maio 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de Situação: Mato Grosso do Sul**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2009b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, ano 2, n. 6, 13 dez. 2002. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_eletronico\\_06\\_ano02.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_06_ano02.pdf)>. Acesso em: 16 jun. 2010.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 4, p. 337-340, jul./ago. 2006.

MORAES-SILVA, E.; ANTUNES, F. R.; RODRIGUES, M. S.; JULIÃO, F. S.; DIAS-LIMA, A. G.; LEMOS-DE-SOUSA, V.; ALCANTARA, A. C.; REIS, E. A.; NAKATANI, M.; BADARÓ, R.; REIS, M. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; FRANKE, C. R. Domestic swine in a visceral leishmaniasis endemic area produce antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resist to *L. infantum* infection. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 98, p. 176-182, 2006.

MPAKA, M. A.; DANIIL, Z.; KYRIAKOU, D. S.; ZAKYNTHINOS, E. Septic shock due to visceral leishmaniasis, probably transmitted from blood transfusion. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v. 3, p. 479-483, 2009.

MUELLER, M.; RITMEIJER, K.; BALASEGARAM, M.; KOUMMUKI, Y.; SANTANA, M. R.; DAVIDSON, R. Unresponsiveness to AmBisome in some Sudanese patients with kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 101, p. 19-24, 2007.

MUHURY, M.; MATHAI, A. M.; RAI, S.; NAIK, R.; PAI, M. R.; SINHA, R. Megakaryocytic alterations in thrombocytopenia: a bone marrow aspiration study. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Rajahmundry, v. 52, n. 4, p. 490-494, Oct./Dec. 2009.

MURRAY, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2185-2197, Aug. 2001.

MUSUMECI, S.; D'AGATA, A.; SCHILIRO, G.; FISCHER, A. Studies of the neutropenia in kala-azar: results in two patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 70, p. 500-503, 1976.

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. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 167-174, 2006.

NOGUEIRA, M. V.; VIDAL, L.; TERRA, B.; PAGOT, T.; SALLUH, J. I.; SOARES, M. Hemophagocytic syndrome associated with cytomegalovirus infection in a severely immunocompromised AIDS patient: case report. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 13, n. 1, p. 72-73, Feb. 2009.

OLIVEIRA, A. G.; GALATI, E. A. B.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA G. R.; ESPINDOLA, I. A. C.; DORVAL, M. E. C.; BRAZIL. R. P. Abundance of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and urban transmission of visceral leishmaniasis in Campo Grande, state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 8, p. 869-874, Dec. 2006.

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. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 5, p. 446-450, set./out. 2006.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; SANCHES, M. A.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R. B.; PAULA, F. H.; PEREIRA, L. G.; CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Asymptomatic infection in family contacts of patients with human visceral leishmaniasis in Três Lagoas, Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 12, p. 2827-2833, dez. 2008.

OLIVEIRA, C. D. L.; MORAIS, M. H. F.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Visceral leishmaniasis in large Brazilian cities: challenges for control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, p. 2953-2958, dez. 2008.

OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 43, n. 2, p. 188-193, mar./abr. 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Manual de controle da leishmaniose visceral**. Brasília: OPAS, 1996.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; MARR, K. A.; REX, J. H.; COHEN, S. H. Amphotericin B: time for a new "gold standard". **Clinical Infectious Diseases**, Boston, v. 37, n. 3, p. 415-425, Aug. 2003.

OTERO, A. C. S.; DA SILVA, V. O.; LUZ, K. G.; PALATNIK, M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; SOUSA, C. B. P. Short report: occurrence of *Leishmania donovani* DNA in donated blood from seroreactive Brazilian blood donors. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 62, p. 128-131, 2000.

PANTANOWITZ, L.; TRANOVICH, V.; BALLESTEROS, E. Flaming plasma cells. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, Chicago, v. 125, p. 1394-1395, Oct. 2001.

PAPADAKI, H. A.; ELIOPOULOS, G. D. The role of apoptosis in the pathophysiology of chronic neutropenias associated with bone marrow failure. **Cell Cycle**, v. 2, n. 5, p. 447-451, Sept./Oct. 2003.

PASTORINO, A. C.; JACOB, C. M. A.; OSELKA, G. W.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 78, n. 2, p. 120-127, 2002.

PEASE, G. L. Granulomatous lesions in bone marrow. **Blood**, New York, v. 11, p. 720-734, 1956.

PEDROSA, C. M. S.; ROCHA, E. M. M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 37, n. 4, p. 300-304, jul./ago. 2004.

PERKINS, S. L. Examination of the blood and bone marrow. In: LEE, G. R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J. P.; RODGERS, G. M. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999a. chap. 2, p. 9-35 (volume 1).

PERKINS, S. L. Normal blood and bone marrow values in humans. In: LEE, G. R.; FOERSTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J. P.; RODGERS, G. M. **Wintrobe's Clinical Hematology**. 10. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999b. appendix A, p. 2738-2748 (volume 2).

PIARROUX, R.; GAMBARELLI, F.; DUMON, H.; FONTES, M.; DUNAN, S.; MARY, C.; TOGA, B.; QUILICI, M. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 32, n. 3, p. 746-749, Mar. 1994.

PLEBANI, M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 44, n. 6, p. 750-759, 2006.

POLLACK, S.; NAGLER, A.; LIBERMAN, D.; OREN, I.; ALROY, G.; KATZ, R.; SCHECHTER, Y. Immunological studies of pancytopenia in visceral leishmaniasis. **Israel Journal of Medical Sciences**, Tel Aviv-Jerusalem, v. 24, p. 70-74, Feb. 1988.

PRASAD, L. S. N.; SEN, S.; GANGULY, S. K. Renal involvement in Kala-azar. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 95, p. 43-46, Jan. 1992.

PRASAD, R.; MUTHUSAMI, S.; PANDEY, N.; TILAK, V.; SHUKLA, J.; MISHRA, O. P. Unusual presentations of Visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Pediatrics**, Calcutta, v. 76, n. 8, p. 843-845, Aug. 2009.

PRCHAL, J. T. Production of erythrocytes. In: WILLIAMS, W. J.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Hematology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006a. chap. 30, p. 393-403.

PRCHAL, J. T. Clinical manifestations and classification of erythrocyte disorders. In: WILLIAMS, W. J.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Hematology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006b. chap. 32, p. 411-418.

PRINA, E.; ABDI, S. Z.; LEBASTARD, M.; PERRET, E.; WINTER, N.; ANTOINE, J.-C. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of

*Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 117, n. 2, p. 315-325, 2004.

PUKA, J.; MATTOS, H. H. R. V.; GAVRON, A. C.; VIANNA, S.-E. O.; VAZ, R. S. Origem e tipos de fagócitos. **Revista UnicenP de Biologia e Saúde**, Curitiba, v.1, n.1, p.17-24, jan./mar. 2005.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

RACHMILEWITZ, M.; BRAUN, K.; VRIES, A. Hematologic observations in a case of kala-azar. **Blood**, New York, v. 2, p. 381-385, 1947.

RAI, M. E.; MUHAMMAD, Z.; SARWAR, J.; QURESHI, A. M. Haematological findings in relation to clinical findings of visceral leishmaniasis in Hazara Division. **Journal of Ayub Medical College**, Abbottabad, v. 20, n. 3, p. 40-43, 2008.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; JUNIOR-ANDRADE, H. F.; TEMPANE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, jul./ago. 2003.

REGO Jr, F. A.; NUNES, V. L. B.; PEREIRA, M. J. S.; CAVALHEIROS, M. E. M.; SILVA, R. P.; BARROS, E. Ocorrência de casos de leishmaniose em cães no município de Corumbá- MS. In: **Resumos do VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia**, São Paulo, 1983, p. 2.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, London, v. 81, p. 68-75, 2006a.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 146, p. 303-311, 2006b.

REY, L. *Leishmania* e leishmaníases: os parasitos. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001a. cap. 15, p. 214-226.

REY, L. O complexo "*Leishmania donovani*" e a leishmaníase visceral. In: \_\_\_\_\_. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001b. cap. 19, p. 253-266.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 16, n. 7, p. 292-297, 2000.

ROCHA FILHO, F. D.; FERREIRA, F. V. A.; MENDES, F. O.; FERREIRA, F. N. H.; KARBAGE, A.; ALENCAR, M. L.; COSTA, D. Bone marrow fibrosis (pseudomyelofibrosis) in human kala-azar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 4, p. 363-366, jul./ago. 2000.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America – a systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, p. e584, Jan. 2010.

ROUSSEAU, D.; DEMARTINO, S.; FERRUA, B.; MICHIELS, J. F.; ANJUÈRE, F.; FRAGAKI, K.; LE FICHOUX, Y.; KUBAR, J. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiology**, London, v. 1, p. 17, 2001.

RYAN, D. H.; FELGAR, R. E. Examination of the marrow. In: WILLIAMS, W. J.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Hematology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. chap. 3, p. 21-31.

SABHARWAL, B. D.; MALHOTRA, V.; ARUNA, S.; GREWAL, R. Comparative evaluation of bone marrow aspirate particle smears, imprints and biopsy sections. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 36, p. 194-198, 1990.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 453-483, Oct. 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, Basingstoke, v. 2, p. 845-858, Nov. 2002.

SAH, S. P.; RIJAL, S.; BHADANI, P. P.; RANI, S.; KOIRALA, S. Visceral leishmaniasis in two cases of leukemia. **Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, Bangkok, v. 33, n. 1, p. 25-27, Mar. 2002.

SAITO, S.; HAMADA, A.; WATANABE, N.; OBATA, T.; KATAKURA, K.; OHTOMO, H. Eosinophil chemotactic activity in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 82, n. 6, p. 485-489, July 1996.

SALGADO FILHO, N.; FERREIRA, T. M. A. F.; COSTA, J. M. L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 36, n. 2, p. 217-221, mar./abr. 2003.

SALVIOLI, G.; RIOLI, G.; LUGLI, R.; SALATI, R. Membrane lipid composition of red blood cells in liver disease: regression of spur cell anaemia after infusion of polyunsaturated phosphatidylcholine. **Gut**, v. 19, p. 844-850, 1978.

SANTOS, M. A.; MARQUES, R. C.; FARIAS, C. A.; VASCONCELOS, D. M.; STEWART, J. M.; COSTA, C. H. N. Predictors of an unsatisfactory response to

pentavalent antimony in the treatment of American visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 6, p. 629-633, Nov./Dec. 2002.

SANTOS, S. O.; ARIAS, J.; RIBEIRO, A. A.; HOFFMANN, M. P.; FREITAS, R. A.; MALACCO, M. A. F. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Medical and Veterinary Entomology**, St. Albans, v. 12, p. 315-317, July 1998.

SANTOS, V. M.; CUNHA, S. F. C.; CUNHA, D. F. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 46, n. 3, p. 232-236, 2000.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L. S.; KOUTINAS, A. F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V. I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 73, n. 1, p. 82-86, July 2005.

SCHMIDT, U.; MLYNEK, -I.; LEDER, L. -D. Electron-microscopic characterization of mixed granulated (hybridoid) leucocytes of chronic myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 68, p. 175-180, 1988.

SEAMAN, J. P.; KJELDSBERG, C. R.; LINKER, D. A. Gelatinous transformation of the bone marrow. **Human Pathology**, v. 9, n. 6, p. 685-692, Nov. 1978.

SHAHRIAR, D.; REZA, M. P. A.; REZA, A. M. M; FARAMARZ ,S. Cytological clues of bone marrow findings in Kala-Azar. **Diagnostic Cytopathology**, New York, v. 20, n. 4, p. 208-211, 1999.

SHARMA, S.; MALHAN, P.; PUJANI, M.; RATH, B. Acute erythroid toxicity in visceral leishmaniasis: a rare complication of antimonial therapy. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, Rajahmundry, v. 51, p. 546-547, Oct./Dec. 2008.

SHEIKHA, A. Dyserythropoiesis in 105 Patients with visceral leishmaniasis. **Laboratory Hematology**, v. 10, n. 4, p. 206-211, Dec. 2004.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; HIGAKI, Y.; UIP, D. E.; MORI, N. S.; DEL NEGRO, G.; MELO, N. T.; HUTZLER, R. U.; AMATO NETO, V. Comprometimento da medula óssea e eosinofilia na paracoccidiodomicose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 34, n. 2, mar./abr. 1992.

SILVA, E. S.; CARVALHO, F. G.; SILVA, E. A.; FIOZI, E.; OLIVEIRA, A. G.; BRAZIL, R. P. Primeiro relato de leishmaniose visceral canina em área urbana do município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. In: **Resumos do XXXVI Congresso Brasileiro de Medicina Tropical**, São Luís, 2000, p. 318.

SILVA, E. S.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; FIUZA, V. O. P.; BRAZIL, R. P. Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas

Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 3, p. 285-291, Apr. 2001.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis*, vetor principal da leishmaniose visceral americana, em Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 40, n. 4, p. 420-425, jul./ago. 2007.

SILVA, F. G.; TAVARES-NETO, J. Avaliação dos prontuários médicos de hospitais de ensino do Brasil. **Revista Brasileira de Educação Médica**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 113-126, 2007.

SILVA, D. F. R.; ANUNCIAÇÃO, F. A. C.; ARCOVERDE, J. C.; COSTA, L. P.; MARQUES, I. D. B.; PINHEIRO, G. S.; MOREIRA, M. S. T. A. Síndrome hemofagocítica: uma apresentação inicial do lúpus eritematoso sistêmico. **Acta Reumatológica Portuguesa**, Lisboa, v. 33, p. 91-97, 2008.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 49, p. 55-60, Jan./Mar. 2003.

SIRVENT-VON BUELTZINGSLOEWEN, A.; MARTY, P.; ROSENTHAL, E.; DELAUNAY, P.; ALLIERI-ROSENTHAL, A.; GRATECOS, N.; CASSUTO, J. P. Visceral leishmaniasis: a new opportunistic infection in hematopoietic stem-cell-transplanted patients. **Bone Marrow Transplantation**, Basingstoke v. 33, p. 667-668, Mar. 2004.

SMITH, C. W. Production, distribution, and fate of neutrophils. In: WILLIAMS, W. J.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Hematology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. chap. 61, p. 855-861.

SOBRINHO, A. H.; OLIVEIRA, C. A. C.; BALDACCI, E. R.; BREVIGLIERI, J. C.; GRISI, S. J. F. E. ; POMMER, V. M. Hemograma, mielograma, coagulação sanguínea e teste do NBT na desnutrição infantil. **Pediatria**, São Paulo, v. 1, p. 243-248, 1979.

SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 180, p. 4355-4360, Apr. 2008.

STOLTZFUS, R. J.; EDWARD-RAJ, A.; DREYFUSS, M. L.; ALBONICO, M.; MONTRESOR, A.; THAPA, M. D.; WEST JR., K. P.; CHWAYA, H. M.; SAVIOLI, L.; TIELSCH, J. Clinical pallor is useful to detect severe anemia in populations where anemia is prevalent and severe. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 9, p. 1675-1681, 1999.

SUNDAR, S. Indian kala-azar: better tools needed for diagnosis and treatment. **Journal of Postgraduate Medicine**, Mumbai, v. 49, p. 29-30, 2003.

SUNDAR, S.; AGRAWAL, S.; PAI, A.; CHANCE, M.; HOMMEL, M. Detection of leishmanial antigen in the urine of patients with visceral leishmaniasis by a latex

agglutination test. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 73, p. 269–271, 2005.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 9, n. 5, p. 951–958, Sept. 2002.

SUNDAR, S.; SINGH, R. K.; BIMAL, S. K.; GIDWANI, K.; MISHRA, A.; MAURYA, R.; SINGH, S. K.; MANANDHAR, K. D.; BOELAERT, M.; RAI, M. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 284-289, Feb. 2007.

TAFURI, W. L.; SANTOS, R. L.; ARANTES, R. M. E.; GONÇALVES, R.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; TAFURI, W. L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 292, p. 17– 23, 2004.

TAPISIZ, A.; BELET, N.; ÇİFTÇİ, E.; INCE, E.; DOGRU, U. Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with visceral leishmaniasis. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 53, p. 359-361, 2007.

THAKUR, C. P.; KUMAR, A.; MITRA, G.; THAKUR, S.; SINHA, P. K.; DAS, P.; BHATTACHARYA, S. K.; SINHA, A. Impact of amphotericin-B in the treatment of kala-azar on the incidence of PKDL in Bihar, India. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 128, , p. 38-44, July 2008.

VAN DER MEIDE, W.; GUERRA, J.; SCHOONE, G.; FARENHORST, M.; COELHO, L.; FABER, W.; PEEKEL, I.; SCHALLIG, H. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 46, n. 1, p. 73-78, Jan. 2008.

VARMA, N.; BHORIA, U.; BAMBERY, P.; DASH, S. Gelatinous transformation of the bone marrow and *Leishmania donovani* infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 94, n. 5, p. 310-312, Oct. 1991.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides *in vitro* no modelo de desnutrição protéica em camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 3, jul./set. 2008.

WARDLAW, A. Eosinophils and their disorders. In: WILLIAMS, W. J.; LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U.; KAUSHANSKY, K.; PRCHAL, J. T. **Hematology**. 7. ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006b. chap. 62, p. 863-878.

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**, Munich, 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. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 40, p. 267-275, 1987.

WILKINS, B. S.; O'BRIEN, C. J. Techniques for obtaining differential cell counts from bone marrow trephine biopsy specimens. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 41, p. 558-561, 1988.

WILKINS, B. S. Histology of normal haemopoiesis: Bone marrow histology I. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 45, p. 645-649, 1992.

WINFIELD, D. A.; POLACARZ, S. V. Bone marrow histology 3: value of bone marrow core biopsy in acute leukaemia, myelodysplastic syndromes, and chronic myeloid leukaemia. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 45, p. 855-859, 1992.

WOLDAY, D.; AKUFFO, H.; FESSAHAYE, G.; VALANTINE, A.; BRITTON, S. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 30, n.1, p. 29-34, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of leishmaniasis**. Geneva: WHO, 2006.

YARALI, N.; FISGIN, T.; DURU, F.; KARA, A. Myelodysplastic features in visceral leishmaniasis. **American Journal of Hematology**, New York, v. 71, p. 191-195, 2002.

ZIJLSTRA, E. E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALIL, E. A. G.; EL-HASSAN, A. M.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test: experience from the Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 108-113, Feb. 2001.

**ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**



**Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS**



## *Carta de Aprovação*

*A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 1358 da Pesquisadora Suelen Castilho intitulado "Avaliação da medula óssea de pacientes com leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 04 de junho de 2009, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.*

*Prof. Paulo Roberto Haidamus de Oliveira Bastos*

*Coordenador em exercício do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS*

*Campo Grande, 05 de junho de 2009.*

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>  
[bioetica@propp.ufms.br](mailto:bioetica@propp.ufms.br)  
fone 0XX67 345-7187