

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Programa de Residência Integrada em Medicina Veterinária  
Colegiado do Curso de Pós-Graduação

LEISHMANEMIA- RELATO DE ACHADOS LABORATORIAIS

Carla Perpétuo de Magalhães

BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA- UFMG  
2014

Carla Perpétuo de Magalhães

## **LEISHMANEMIA- RELATO DE ACHADOS LABORATORIAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Minas Gerais como  
requisito parcial do Programa de Residência  
Integrada em Medicina Veterinária.  
Área de concentração: Patologia Clínica  
Veterinária  
Orientadora: Prof. Fabíola de Oliveira Paes Leme

**BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG  
2014**

**Monografia defendida e aprovada em 19 de março de 2014, pela Comissão Examinadora constituída por:**

---

Prof.<sup>a</sup> Fabíola de Oliveira Paes Leme  
Presidente

---

Prof. Paulo Ricardo de Oliveira Paes

---

Prof.<sup>a</sup> Adriane Pimenta da Costa Val

## **Agradecimentos:**

À Deus, por ter me dado forças para conseguir realizar até o final esta especialização.

Aos meus familiares, por acreditarem em mim e terem me incentivado e me dado forças para realizar este grande sonho.

Aos professores Fabíola e Paulo Ricardo, por toda a paciência e disposição em me transmitir seus conhecimentos e por todo incentivo.

À minha Bettyinha, que foi o incentivo de toda a minha carreira profissional, e me deu todo o conforto e carinho durante todo o tempo em que ficamos juntas.

Aos meus amigos da PUC que mesmo distante, tiveram a paciência de me ouvir nos melhores e piores momentos deste período.

Aos meus colegas de residência, que de uma forma ou outra ajudaram para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Anna, pela ajuda, conselhos e companheirismo durante a nossa missão, só nós sabemos como foi sofrida, mas CONSEGUIMOS!

Às funcionárias do laboratório, Renata, Joelma e Creuzinha, pela ajuda, força, incentivo em todo o período da especialização e pelos momentos de confraternização, momentos inesquecíveis e deliciosos que serão lembrados eternamente.

À Pamela, amiga e confidente, sempre com palavras de ânimo, força e alegrando o ambiente, tornando a jornada menos pesada.

Aos amigos Carol e Leandro, por toda a ajuda e paciência nos momentos iniciais do curso e espero que tenhamos contato profissional e pessoal para sempre.

## **Sumário:**

Resumo	6
1. Introdução	7
2. Revisão de Literatura	10
3. Relato de casos	13
4. Discussão	15
5. Considerações finais	24
6. Referências bibliográficas	24

## Resumo

A Leishmaniose está entre as principais doenças consideradas zoonóticas, transmitida ao homem e a outros animais por dois gêneros de flebotomíneos: *Phlebotomus* na Ásia, África e Europa e *Lutzomyia* nas américas. Foram observadas formas amastigotas de *Leishmania sp.* em esfregaços sanguíneos de 12 animais durante a observação de lâmina para contagem diferencial de leucócitos. Em 100% dos hemogramas foi observada anemia, sendo a classificação normocítica normocrômica a mais prevalente (41,7%). Hiperproteinemia plasmática foi observada em 33% dos hemogramas. As principais alterações leucocitárias observadas foram: leucocitose (33,3%), leucopenia (33,3%), neutrofilia (41,6%), neutropenia (25%), linfopenia (75%), eosinopenia (91,7%), monocitopenia (33,3%) e monócitos ativados (33,3%). Foi observada trombocitopenia em 50% dos animais. Na análise bioquímica, as alterações mais encontradas foram: aumento da proteína total plasmática (33,3%), hipoalbuminemia (100%), hiperglobulinemia (75%), diminuição da relação A:G (87,5%), aumento das concentrações de ureia e creatinina (55,5%) e da atividade de ALT e FA (33,3%), caracterizando doenças concomitantes. Com relação aos exames de urinálises, a alteração mais frequente observada foi proteinúria. Pode-se concluir que a leishmanemia é um achado ocasional em região endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) e que, nestes casos, a anemia, trombocitopenia e disproteinemia são comuns, ao contrário do leucograma que não apresenta um padrão característico. Dessa forma a avaliação criteriosa do esfregaço sanguíneo é de suma importância.

Palavras-chave: Leishmania, cão, esfregaço sanguíneo

## **Abstract**

Leishmaniasis is considered among the major zoonotic diseases transmitted to humans and other animals by two genera of sandflies: *Phlebotomus* in Asia, Africa and Europe and *Lutzomyia* in the Americas. Amastigote forms of *Leishmania* were observed in blood smears of 12 animals during the observation blade for differential leukocyte counts. In 100% of CBCs anemia was observed, being the most prevalent normocytic normochromic classification (41.7%). Hyperproteinemia plasma was observed in 33% of blood counts. The main leukocyte changes were: leukocytosis (33.3%), leukopenia (33.3%), neutrophils (41.6%), neutropenia (25%), lymphopenia (75%), eosinopenia (91.7%), monocytopenia (33.3%) and activated monocytes (33.3%). Thrombocytopenia was observed in 50% of animals. In the analysis biochemistry, the most frequent changes were: increased plasma total protein (33.3%), hypoalbuminemia (100%), hyperglobulinemia (75%), decrease of the A: G (87.5%), increased concentrations of urea and creatinine (55.5%) and the activity of ALT and ALP (33.3%), characterizing concomitant diseases. With regard to urinalysis tests, the most frequent alteration was observed proteinuria. It can be concluded that the leishmanemia is occasionally found in endemic region of canine visceral leishmaniasis (CVL) and that in such cases, anemia, thrombocytopenia and disproteinemia are common, unlike the WBC that does not show a characteristic pattern. Thus a careful evaluation of the blood smear is of paramount importance.

Key-words: *Leishmania*, dog, blood film

## **1 - Introdução**

As Leishmanioses são um grupo de infecções causadas por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania* pertencente à família *Trypanosomatidae*, consideradas doenças zoonóticas com transmissão por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* ou *Sergentomyia* na África, Ásia e Europa e pelo *Lutzomyia* nas Américas, e reservatórios mamíferos no ciclo silvestre ou peridomiciliar (Feldman, 2000). Nos últimos dez anos, grandes avanços científicos foram realizados na prevenção, diagnóstico e tratamento da leishmaniose, facilitando a implementação de programas de controle nacionais e regionais da doença. Mesmo assim, a letalidade e a morbidade em todo o mundo demonstram uma tendência crescente e preocupante da doença (WHO, 2010).

No Brasil, a leishmaniose visceral canina (LVC) tinha, inicialmente, a característica de uma frequência maior em áreas rurais, expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte a partir da década de 80, devido à grande mobilidade dos

reservatórios e dos vetores (Belo Horizonte, 2012).

O diagnóstico da LVC vem representando um problema para os serviços de saúde pública devido a três fatores principais: variedade de sinais clínicos que se assemelham à outras enfermidades infecciosas, alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de exame diagnóstico que associe 100% de sensibilidade a especificidade (BRASIL, 2006).

Estudos com parasitos do gênero *Leishmania sp.* mostraram sua capacidade de recrutar e induzir ativamente a migração de neutrófilos para o local de infecção, através da liberação de um fator quimiotático (LCF). Além disso, os protozoários são capazes de induzir a secreção de IL-8 e inibir a produção de IP-10, este último uma quimiocina produzida por células polimorfonucleares com função de recrutar células Natural Killer (NK) e linfócitos Th1, sugerindo que o parasita consiga estabelecer infecção, evitando uma resposta imune satisfatória (van Zandbergen, 2002).

Três mecanismos podem explicar a sobrevivência de patógenos



fagocitados por neutrófilos, como: o escape dos fagossomas para o citoplasma da célula, bloqueio da fusão fago-lisossoma e inibição da indução de ação oxidante celular (Laskay et al. 2008). Laskay et al. (2003) demonstraram uma hipótese para o modelo de infecção por *Leishmania major* no qual sugerem que os neutrófilos servem de veículo para a entrada silenciosa e segura dos parasitas no organismo, sem serem “percebidos” pelos macrófagos, intitulado-os como “Cavalo de Tróia”. Esse mecanismo promove a sobrevivência do parasita nos neutrófilos através de dois processos: primeiramente, os parasitas intracelulares não tem nenhuma interação física direta com receptores de superfície de macrófagos, que consequentemente não os detectam no interior das células em apoptose e a ativação de macrófagos não acontece. Segundo, a captação de células apoptóticas silencia o macrófago, e nenhum mecanismo efetor é ativado contra a leishmania intracelular.

Um estudo realizado por Sarkar et al. (2013) com *Leishmania major* descreveram que o parasita tem capacidade de estender o tempo de vida

dos neutrófilos modulando os processos que regulam a sua apoptose, como inibição da fosforilação da via ERK1/2, regulação de proteínas anti-apoptóticas BX-1 e Bcl-2, consequentemente impedindo a liberação de citocromo c e de caspases que fazem parte do processo de apoptose espontânea. Todos esses processos sugerem que os parasitas visam aumentar o tempo de vida útil dos neutrófilos, para garantir a sua sobrevivência no organismo.

A presença de amastigotas de *Leishmania sp.* em sangue periférico é considerada rara e os primeiros relatos descritos foram de Schalm em 1979, que observou uma única inclusão de *Leishmania donovani* em um neutrófilo e de Ruiz de Gopegui e Espada em 1998 que detectaram amastigotas em um monócito, como citado por Babo-Terra (2010). Ikeda-Feitosa et al. (2003) encontraram formas amastigotas de *Leishmania sp.* no esfregaço sanguíneo em 3 cães com Leishmaniose dos 191 animais avaliados no estudo. Posteriormente, inúmeras amastigotas de *Leishmania infantum* foram observadas em um esfregaço de sangue periférico de um cão com Leishmaniose, dentro de neutrófilos e

livres (Manzillo, 2005). Foram encontradas também amastigotas de *Leishmania sp.*, em neutrófilos e monócitos no sangue periférico de seis cães na cidade de Campo Grande-MS, durante a análise hematológica, no período de 14 semanas (Babo-Terra, 2010).

Devido ao caráter endêmico da LVC em Belo Horizonte, o objetivo deste trabalho é relatar as alterações hematológicas de 12 cães naturalmente infectados, em que foram observadas amastigotas de *Leishmania sp.* no esfregaço de sangue periférico durante a realização do hemograma.

## **2 - Revisão de literatura**

A LVC é causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* transmitido pelas fêmeas de flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia*, ao homem e outros mamíferos (Brasil, 2006). A forma promastigota do parasita se desenvolve no flebotomíneo infectado e é injetada no hospedeiro vertebrado quando da alimentação do vetor. Os parasitas são fagocitados pelos macrófagos e se disseminam pelo

organismo hospedeiro, podendo permanecer por período de incubação de 1 mês a 7 anos (Nelson e Couto, 2010). A Leishmaniose, em áreas endêmicas é frequente em cães e menos frequente em felinos e equinos (Feldman, 2000).

Considerados como os principais reservatórios da doença, os cães são responsáveis pela manutenção do ciclo epidemiológico, pois a leishmaniose visceral (LV) é mais prevalente na população canina do que na humana. Além disso, os cães favorecem a infecção de vetores, pois eles apresentam mais parasitas na pele do que o homem. Em regiões endêmicas a prevalência da doença nos cães pode chegar a 40% da população canina (Ikeda-Feitosa et al., 2003).

A LV restringia-se somente à região nordeste do Brasil até os anos 80. Após esse período a doença tornou-se frequente em algumas capitais como São Luís, Campo Grande, Teresina, Palmas e Belo Horizonte, apresentando casos autóctones diagnosticados, nos últimos anos, em outras capitais como São Paulo e Brasília (Dias, 2008).

Os sinais clínicos clássicos desta enfermidade incluem: início da doença-lesões cutâneas no espelho nasal e orelha, pequenas úlceras principalmente na cauda, orelha e focinho e pelo opaco; fases mais adiantadas- onicogribose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, ceratoconjuntivite, apatia, diarreia, edema de patas e vômitos. Dentre os achados observados na fase final da doença estão a ocorrência de paresia de membros posteriores, caquexia, inanição e óbito (BRASIL, 2006). Lesões inflamatórias não supurativas na pele, fígado, intestino, rins, olhos e ossos são sinais clínicos resultantes da ação direta dos parasitas nos tecidos, podendo ocorrer ainda danos indiretos causados pela deposição de imunocomplexos nas membranas basais dos rins, vasos sanguíneos e olhos, levando a uveítes, artrites, vasculites e glomerulonefrites. Pode ocorrer também aumento de órgãos como fígado, linfonodos e baço pela ação direta do parasita, que é responsável pela hipertrofia e hiperplasia das células do sistema retículo endotelial (Dias, 2008). A maior parte dos animais morre ou sofre eutanásia em consequência da doença renal crônica, entretanto alguns podem

permanecer sem sinais clínicos por algum tempo (Nelson e Couto, 2010).

Os achados laboratoriais mais comentados encontrados são hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, proteinúria, atividades aumentadas das enzimas hepáticas, trombocitopenia, azotemia, linfopenia, leucocitose com desvio para a esquerda e anemia, geralmente de característica normocítica hipocrômica (Feldman et al., 2000; Nelson e Couto, 2010). Infecções por *Leishmania sp.* também podem induzir a Coagulação Intravascular Disseminada (CID), trombopatias, tempo de trombina (TT) prolongado, aumento da fibrina e/ou dos produtos de degradação da fibrina (Feldman et al., 2000). A disproteinemia na LVC ocorre devido à ativação policlonal de linfócitos B e consequente produção de anticorpos (Ikeda-Feitosa et al., 2003).

A presença de anemia em cães infectados com *Leishmania sp.* pode ser causada por diferentes mecanismos. Segundo Stockham e Scott (2011) citocinas liberadas no processo inflamatório conseguem prejudicar a produção eritrocitária, através de processos que levam as células eritróides a ficarem refratárias ao

aumento da eritropoetina. Essas citocinas também estão envolvidas em distúrbios no metabolismo de ferro e na remoção de eritrócitos, diminuindo o tempo de vida dos mesmos. A hematopoese pode ser suprimida mediante a infecção do parasita, levando a uma hipoplasia ou aplasia medulares (Costa-Val, 2004). De acordo com De Luna et al. (2000) citado por Costa-Val (2004) a infecção por *Leishmania sp.* pode levar ainda à diminuição da fluidez da membrana dos eritrócitos, o que altera o mecanismo de cito aderência dos mesmos, levando a redução de sua meia vida. Outra provável causa da anemia na leishmaniose é a disfunção renal crônica que, assim como a azotemia levam a diminuição da produção de eritropoetina e conseqüentemente da produção de eritrócitos e da resposta da medula óssea. A ocorrência da anemia, ainda, pode ser causada pelos níveis aumentados de ureia, que reduz o tempo de vida das hemácias por sua ação toxêmica, além de diminuir a ação da eritropoietina na medula óssea (Costa-Val 2004; Stockham e Scott, 2011).

Apesar da leucocitose, citada por alguns autores ser um achado comum

nesta enfermidade, Ikeda-Feitosa et al. (2003) observaram leucocitose em, apenas, 27,2% de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* na cidade de Araçatuba-SP. Já Medeiros et al. (2008), Dias (2008), Sa e Leite (2013) relataram resultados dentro dos valores de normalidade para o leucograma de animais com leishmaniose. Coutinho (2005) também demonstrou, em um estudo com 23 cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi*, em áreas endêmicas da região metropolitana de Natal-RN, resultados com valores médios dentro da normalidade para contagem de leucócitos totais.

O diagnóstico definitivo de LVC pode ser feito através do exame parasitológico direto, quando da observação microscópica de amastigotas de leishmanias em esfregaços corados obtidos de órgãos ou tecidos infectados, como medula óssea, linfonodo, pele ou sangue periférico. A técnica de PCR para detecção de DNA do protozoário também pode ser utilizada como diagnóstico com essas mesmas amostras, além da capa leucocitária e do “swab” conjuntival (Maia e Campino, 2008). Os parasitas

também podem ser observados no citoplasma de macrófagos no fígado, bexiga, lâmina própria intestinal, plexo coroide, fluído cerebrospinal, urina, sêmen e líquido peritoneal. Além dos macrófagos, os parasitas podem ser observados, ainda, em outros tipos celulares como neutrófilos, eosinófilos, células endoteliais e fibroblastos (Feldman, 2000). A especificidade do método parasitológico direto é de aproximadamente 100% e, a sensibilidade de aproximadamente 80% para cães sintomáticos e, menor para os animais assintomáticos. Outros exames ainda podem ser realizados para diagnóstico de LVC, como as provas sorológicas de Imunofluorescência indireta (RIFI), Ensaio Imunoenzimático (ELISA), fixação de complemento e aglutinação direta (BRASIL, 2006).

O tratamento para LVC frequentemente apresenta melhora dos sinais clínicos da doença com a administração de drogas, mas o prognóstico é variável e na maioria dos casos a recidiva é frequente. Nenhuma droga ou combinação obteve sucesso na eliminação do parasita (Nelson e Couto, 2010). Terapias administradas com

antimoniato de meglumina, anfotericina B e alopurinol estão entre as principais drogas utilizadas no tratamento, sendo que outras drogas também já foram testadas, como pentamidina, metronidazol, cetoconazol, estibogluconato de sódio e aminosidina. Apesar de haver melhora dos sinais clínicos da doença, diminuição da carga parasitária e dos títulos de anticorpos circulantes, o tratamento consegue apenas diminuir a capacidade infectante do animal para o mosquito transmissor (Costa-Val, 2004). Animais com doença renal crônica apresentam um prognóstico ruim mas estudos recentes demonstraram que a administração de alopurinol seja benéfica para estes animais (Nelson e Couto, 2010). As ações preconizadas pelo Ministério da Saúde são o diagnóstico e tratamento de casos humanos, controle do vetor e eutanásia de animais soropositivos, não sendo recomendado o tratamento de cães (BRASIL, 2006).

### **3 – Relato de casos**

Durante a realização dos hemogramas de 12 animais da rotina do laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário da UFMG, foram observadas formas amastigotas de

*Leishmania sp.*, no interior de neutrófilos (Fig. 1) e/ou monócitos, durante a contagem diferencial de leucócitos e observação morfológica das células em esfregaços sanguíneos, dos anos de 2008 a 2014.

Todos os animais foram avaliados quanto ao hemograma, no entanto, em apenas 9 animais foram determinados analitos bioquímicos e em 3 animais foram realizados exames de urina.

Os hemogramas foram realizados através de contador hematológico automático Abacus Júnior Vet (Ditatron®) e a proteína total plasmática (PTP) de cada amostra foi determinada por refratometria (Schalm, 1979). A descrição das características morfológicas das células sanguíneas, a contagem diferencial de leucócitos e a conferência da contagem de plaquetas foram realizadas pela avaliação

microscópica de esfregaços sanguíneos corados na rotina (Panótico - Newprov®). Os resultados obtidos foram analisados de acordo com os valores de referência estabelecidos por Jain (1993).

A determinação dos analitos bioquímicos foi realizada no aparelho espectrofotômetro automático Cobas Mira (Roche®), utilizando kits específicos seguindo a metodologia e valores de referência estabelecidos de acordo com o fabricante (SynerMed®).

A urinálise foi realizada de acordo com a técnica estabelecida no Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária, consistindo de exames físico, químico, com fitas de urinálise BioColor (Bioeasy®) e análise do sedimento, através da microscopia óptica.

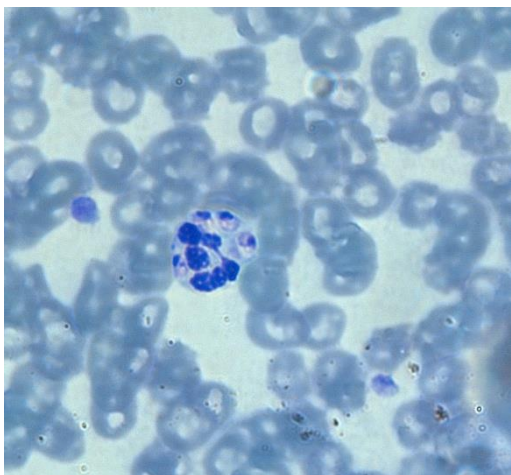


Figura 1 – Amastigotas de *Leishmania sp.* em um neutrófilo em esfregaço sanguíneo de cão naturalmente infectado. Panótico. 1000x.

#### **4 - Discussão**

Os resultados dos hemogramas (Tab. 1) mostraram que 100% dos cães apresentaram anemia, sendo 41,7% caracterizadas como normocítica normocrômica, 33,4% normocítica hipocrômica, 16,6% macrocítica hipocrômica e, 8,3% macrocítica normocrômica. Foram observadas alterações eritrocitárias comumente encontradas em processos regenerativos durante a avaliação morfológica das células sanguíneas de 10 animais, estes descritos na tabela 1. policromasia (50%), anisocitose (50%), metarrubricitos (25%) e corpúsculo de Howell-Jolly (16,6%). Costa-Val (2004) e Medeiros et al. (2008) também observaram o predomínio de anemia normocítica normocrômica em animais

naturalmente infectados com *Leishmania sp.* Já, Lima et al. (2013) encontraram a anemia normocítica hipocrômica como a mais frequente (60%). As alterações eritrocitárias relatadas nesse estudo são incomuns em anemias arregenerativas, porém, podem ser justificadas pela associação de processos secundários, como proposto por Stockham e Scott (2011). A anemia encontrada neste estudo, tanto pode ser atribuída ao processo inflamatório causado pela ação dos parasitas, quanto por alterações medulares como hipoplasia ou aplasia, já descritos por Costa-Val (2004) e Stockham e Scott (2011). A anemia também pode ser justificada pela disfunção renal observada em torno de 60% dos animais

avaliados, com valores dos analitos bioquímicos ureia e creatinina aumentados, o que pode ter influenciado na redução da liberação da eritropoetina pelos rins, com consequente redução da eritropoiese medular, como descrito por Stockham e Scott (2011) ou ainda pela conjugação de dois ou mais fatores já citados.

Dos 12 hemogramas realizados, 33,3% apresentaram PTP acima do valor de

referência, o que esta de acordo com os dados citados por Feldman et al. (2000) que relatam esse achado como decorrente da ativação policlonal de linfócitos B e posterior aumento na produção de gama globulina nesta doença.

Tabela 1 – Resultados dos eritrogramas de 12 animais com LVC em que foram observadas amastigotas de *Leishmania sp.*, em esfregaços sanguíneos de rotina hematológica do Hospital Veterinário da UFMG.

Animal	Hemácias	Hemoglobina	HT	VCM	CHCM	PTP	Observações de lâmina
Valores de referência*	(5,5-8,5)	(12-18)	(37-55)	(60-77)	(32-36)	(6-8)	
1	4,2	8,0	28	66,3	28,5	5,8	Sem observação
2	2,6	6,6	21	78,6	31,4	7,6	Anisocitose discreta, corpúsculos de howell-jolly, 27% de metarrubricitos
3	3,2	7,9	24	73,6	32,9	8,0	Anisocitose discreta, corpúsculos de howell-jolly, 1% de metarrubricitos
4	4,3	8,8	28	65	31,3	6,0	Anisocitose discreta, policromasia moderada, 2% de metarrubricitos
5	3,8	7,9	25	67	30,5	8,4	Rouleaux, policromasia discreta
6	4,9	11,3	35	70,2	32,2	8,4	Rouleaux
7	2,7	5,6	20	73,2	28	5,6	Sem observação
8	3,9	8,0	24	61	35	7,6	Policromasia discreta, codócitos
9	2,8	6,7	26	92,8	25,7	9,0	Policromasia e anisocitose discretas
10	3,8	8,0	28	73,6	28,5	8,7	Sem observação
11	2,1	4,6	17	79,8	27	7,6	Policromasia e anisocitose moderadas, hipocromia. Reticulócitos < 1%
12	3,0	7,1	22	73,3	32,3	5,8	Plasma icterico, policromasia e anisocitose discretas

\*Valores de referência para cães adultos (Jain, 1993).

Esses mesmos autores também relatam que o achado de hiperproteinemia pode estar associado ao aumento das

globulinas, pela observação de “rouleaux” no esfregaço sanguíneo, o que foi constatado em 50% dos animais



que apresentaram o aumento das proteínas plasmáticas totais.

No que diz respeito às alterações leucocitárias (Tab.2), foram observadas porcentagens iguais para leucocitose (33,3%) e leucopenia (33,3%), sendo que 41,6% do total de leucogramas apresentaram desvio à esquerda (DNNE). Dos 12 leucogramas realizados, 41,6% demonstraram neutrofilia e 25% neutropenia, 8,3% linfocitose, 75% linfopenia, 91,7% eosinopenia, 9% monocitose e 33,3% monocitopenia e mesma porcentagem

para presença de monócitos ativados. Os resultados encontrados para contagem total de leucócitos corroboram, em parte, com os relatos de Ikeda-Feitosa et al. (2003); Medeiros et al. (2008); Dias (2008); Sa e Leite, (2013) que apresentaram resultados com predomínio de valores de normalidade para a avaliação leucocitária de cães portadores de leishmaniose.

Tabela 2 – Resultados dos leucogramas de 12 animais com Leishmaniose atendidos no Hospital Veterinário da UFMG no período de 2008 a 2014.

Animal	Leucócitos Totais (6.000-17.000)	Mielócitos (0)	Meta-mielócitos (0)	Bastonetes (0-300)	Neutrófilos Segmentados (3.000-11.500)	Monócitos (150-1.350)	Eosinófilos (100-1.250)	Linfócitos (1.000-4.800)	Basófilos (raros)
12	197.700	3.954	11.862	47.448	118.620	-	-	15.816	-
10	21.100	-	-	844	17.935	1.477	422	422	-
11	27.300	-	-	3.276	20.475	546	-	3.003	-
8	21.700	-	-	-	21.049	-	-	651	-
1	4.480	-	90	2.150	1.881	179	-	179	-
2	5.580	-	-	-	4.688	279	55	558	-
3	4640	-	-	-	2.970	650	-	1.020	-
9	3.350	-	33	236	2.546	33	-	502	-
4	9.870	-	-	-	8.488	493	99	691	99
5	13.100	-	-	-	11.528	1.179	-	393	-
6	6.580	-	-	65	5.791	724	-	-	-
7	12.300	-	-	861	10.332	123	-	984	-

\*Valores de referência para cães adultos (Jain, 1993).

Neste estudo, a leucocitose observada foi resultante da neutrofilia, resultados que estão em concordância com dados citados por Nelson e Couto (2010), como um achado frequente na

Leishmaniose. Concomitantemente a neutrofilia, foram observados linfopenia, eosinopenia e monocitopenia. Em conjunto, essas alterações sugerem resposta leucocitária

decorrente da liberação e/ou administração de corticosteroides, segundo o que descreve Thrall (2007). A autora descreve, ainda, que distúrbios metabólicos como cetoacidose diabética, insuficiência renal e doenças inflamatórias podem induzir resposta leucocitária de estresse, com liberação de cortisol pela glândula adrenal, causando alteração na contagem de vários tipos leucocitários.

Em um dos animais com leucocitose foi administrado corticosteroide, além disso, este apresentava insuficiência renal aguda e cetoacidose diabética, dados que podem justificar a leucocitose encontrada neste animal. Colangiohepatite foi detectada em outro animal com leucocitose, podendo justificar o aumento dos leucócitos, além da infecção por *Leishmania sp.* Os outros dois animais restantes que apresentaram leucocitose não apresentavam dados clínicos que evidenciasse alterações concomitantes à infecção por leishmania.

A leucocitose neutrofílica em animais com Leishmaniose, pode ser explicada pela hipótese de que os parasitas consigam realizar mecanismos eficientes de escape celular, como

mencionado por Laskay et al. (2003). Outra explicação para a neutrofilia observada pode ser a inibição da apoptose, como mencionaram Sarkar et al. (2013).

Leucopenia foi observada em 33,3% dos leucogramas avaliados, achado semelhante ao de Sa e Leite (2013) que relatam esta mesma porcentagem para a leucopenia encontrada nos resultados hematológicos de cães soropositivos para LVC na cidade de Sobral no Ceará, em 2013. A leucopenia observada em 4 animais deste estudo está associada a outros achados como anemia e trombocitopenia, caracterizando pancitopenia. Segundo Stockham e Scott (2011) a pancitopenia pode ocorrer em resposta à supressão hematopoiética medular mediante diversas infecções, como por exemplo, infecções por *Leishmania spp.* e por *Ehrlichia spp.*, infecções que foram detectadas em 2 animais destes 4 com pancitopenia, e que ajudam a justificar este achado.

Com relação à contagem de linfócitos a alteração mais frequentemente encontrada foi a linfopenia (75%). Costa-Val (2004) observou que os linfócitos parecem ser influenciados

pela evolução da doença, pois em seu estudo, nos animais que se apresentaram sintomáticos, a linfopenia era mais acentuada. Diferentemente, Ikeda-Feitosa et al. (2003) observaram resultados variados para o número de linfócitos tanto em animais com sinais clínicos brandos, quanto graves. A linfopenia pode ser resultado da destruição dos linfócitos diretamente pela presença do parasita ou pelo confinamento dos mesmos no baço e/ou linfonodo, durante a resposta à infecção, como mencionado por Bush (2004) citado por Medeiros et al. (2008).

Do total de animais, 33,3% apresentaram monócitos ativados. Foram observados, ainda, monocitopenia (33,3%) e monocitose (8,3%). A monocitopenia encontrada (33,3%) diverge do achado de Ikeda-Feitosa et al. (2003) e Medeiros et al. (2008), que observaram monocitose como a alteração mais frequente em seus trabalhos. Esses mesmos autores também relatam a presença de monócitos ativados em seus resultados, achados esse, observado no presente relato em 33,3% dos exames.

Eosinopenia foi observada em 91,7% do total de animais. Resultados

contraditórios foram observados por Ikeda-Feitosa et al. (2003), que acharam eosinofilia como alteração de eosinófilo mais frequente, em animais com Leishmaniose. As concentrações de eosinófilos são tipicamente baixas no sangue, sendo a eosinopenia isolada, considerada de pouco significado diagnóstico. Dentre os animais com leucocitose 75% apresentaram eosinopenia, o que pode ser indicativo de resposta inflamatória aguda, como postulado por Stockham e Scott (2011).

A trombocitopenia (Tab.3) foi observada 50% dos animais, porcentagem próxima aos relatos de Medeiros et al. (2008); Silva et al. (2011); Sa e Leite (2013), que acharam respectivamente 53,1%, 31,6% e 53,3% para diminuição da contagem de plaquetas em animais soropositivos para leishmaniose. A trombocitopenia pode ser causada pela presença de imunocomplexos presentes no soro, ligados às plaquetas que promovem a sua depuração imunomediada das mesmas, mas esta interação plaquetas-imunoglobulinas ainda não está totalmente esclarecida na Leishmaniose, conforme descrito por Weiss e Wardrop (2010). Foi diagnosticada também

infecção por *Anaplasma platys* em um dos animais com trombocitopenia, o que pode justificar este achado, em associação à Leishmaniose.

Tabela 3 – Resultados dos plaquetogramas de 12 animais com LVC em que foram observados amastigotas de *Leishmania* sp. em esfregaço sanguíneo.

Animal	Plaquetas	Observações
	<b>Valores de referência*</b>	<b>(175.000-500.000)</b>
1	92.000	Macroplaquetas
2	70.000	Plaquetas ativadas
3	20.000	Sem observações
4	98.000	Macroplaquetas, plaquetas ativadas
5	200.000	Macroplaquetas, plaquetas ativadas
6	236.000	Sem observações
7	124.000	Sem observações
8	488.000	Macroplaquetas
9	32.000	Plaquetas ativadas
10	515.000	Plaquetas ativadas, microagregados plaquetários
11	309.000	Sem observações
12	180.000	Sem observações

\*Valores de referência para cães adultos (Jain, 1993).

A avaliação renal realizada através dos exames bioquímicos dos 9 animais apresentou resultados aumentados para as dosagens dos analitos ureia e creatinina em 55,5% dos animais (Tab.4). A insuficiência renal observada neste estudo pode ser em decorrência da deposição glomerular de complexos imunocirculantes (CIC) (Sa e Leite, 2013). Esta alteração indica que esses animais podem estar com nefropatia inicial e, que pode evoluir juntamente

com a doença levando a insuficiência renal crônica (IRC), estágio final em que a maioria dos animais não resiste e chega a óbito (Costa-Val, 2004; Nelson e Couto, 2010). Coutinho (2005) observou resultados diferentes nas mensurações de ureia e creatinina, onde somente 17% dos animais com LVC apresentaram aumento sérico. Costa-Val (2004) encontrou valores aumentados somente para ureia nos animais de seu experimento, referindo esse aumento a uma nefropatia incipiente inicial.

Com relação às proteínas séricas, 100% dos animais, em que a albumina foi dosada, apresentaram hipoalbuminemia. A hiperglobulinemia foi a segunda alteração mais frequente (75%), com valor médio de 5,0g/dL, alterações estas que influenciaram na diminuição do valor médio da relação A:G (0,27). De acordo com Stockham e Scott, (2011), a hipoalbuminemia pode ser resultante do processo inflamatório, onde as citocinas da inflamação causam a diminuição de sua síntese, por isto é caracterizada como uma proteína de fase aguda negativa. Além disso, a redução de seus níveis pode ser em decorrência da redução da produção devido a lesão hepática crônica ou pela perda da

proteína através da urina em caso de lesões renais. A IR foi caracterizada em 55,5% dos animais deste estudo, o que pode justificar a diminuição da albumina pela urina nestes casos.

Tabela 4 – Resultados dos testes bioquímicos de nove animais com LVC em que foram observadas amastigotas de *Leishmania spp* em esfregaço sanguíneo de rotina hematológica.

	Animal 9	Animal 8	Animal 7	Animal 2	Animal 3	Animal 5	Animal 6	Animal 1	Animal 4	Médias	(Valores de referência)
Uréia	46	155,5	252,4	135,59	56,38	256,72	153,3	47,7	15,66	124,36	(20-56)
Creatinina	0,5	3,6	4,3	1,8	1,18	7,17	5,62	1,26	0,15	2,84	(0,5-1,5)
Glicose	40	-	-	61,5	99,29	95,42	96,2	72,8	95,07	80,04	(76-119)
Alt	50	28	455	113	141,5	53,04	62,85	75,5	117,45	121,82	(0-110)
Ast	89	52	602	91,95	32,08	65,4	60,72	58,1	76,72	125,33	(0-100)
GGT	20	-	-	-	-	1,2	4,1	16,8	15,27	11,47	(1,2-25)
FA	977	71	29	169,3	46,8	43	45	48	375	200,46	(20-156)
Proteína Total	4,8	6,6	-	6,7	7,5	7,4	6,9	4,9	5,4	6,28	(5,4-7,5)
Albumina	0,2	1,1	-	1,9	1,17	1,27	1,25	1,9	1,41	1,28	(2,3-3,1)
Globulina	4,6	5,5	-	4,8	6,33	6,13	5,65	3	3,99	5,00	(2,7-4,4)
Relação A:G	0,04	0,2	-	0,39	0,18	0,2	0,22	0,6	0,35	0,27	(0,6-1,1)
Amilase	593	-	-	-	1.476	1.173	894	-	-	1.034	(500-1500)
Triglicerídeos	378	-	-	32,1	6,13	-	-	-	-	138,74	(40-169)
Colesterol	250	-	-	238,31	206,55	-	-	-	-	231,62	(135-278)
Bilirrubinas totais	7,2	-	-	-	-	-	-	-	-	7,20	(0,1-0,5)
Bilirrubina direta	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	6,50	(0,06-0,12)
Bilirrubina indireta	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,70	(0,01-0,49)
Cálcio	7,2	9,3	7,8	-	-	-	-	-	-	8,10	(9,1-11,7)
Cloreto	110	-	-	-	-	-	-	-	-	110,00	(110-1234)
Fósforo	8,6	8,6	5,6	-	-	-	-	-	-	7,60	(2,9-5,3)
Magnésio	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3,00	(1,6-2,4)

- não realizado \* Valores de referência para cães adultos (Synemed, 2007). Valores em vermelho fora do intervalo de referência.

Dois animais (16,6%) também apresentaram alterações hepáticas (doença e insuficiência hepáticas) que podem ter prejudicado a produção protéica, levando a hipoalbuminemia primária ou a conjunção de dois ou mais dos fatores citados. Em contrapartida, média acima dos valores de referência (5,0g/dl) foi encontrada para as globulinas que, ao contrário da albumina, são proteínas de fase aguda positiva no processo inflamatório (Stockham e Scott, 2011). Segundo Silva et al. (2011), o aumento na produção de anticorpos anti-leishmania (IgE, IgG, IgM e IgA) caracteriza a alteração como gamopatia policlonal e geralmente é responsável pela hipergamaglobulinemia, o que pode justificar o aumento desta proteína nos animais estudados. Em relação às mensurações das enzimas hepáticas: FA, ALT e AST apresentaram médias acima dos valores de referência, respectivamente 200,46 U/L, 121,82 U/L e 125,33 U/L. Dois animais apresentaram aumento significativo de FA, o que elevou a média final dos resultados, sendo que o aumento em um deles pode ser justificado pela colangiohepatite apresentada pelo animal, diagnóstico confirmado, em

conjunto com outros resultados alterados de bilirrubinas totais e frações, e exame anatomopatológico. As enzimas hepáticas ALT e AST apresentaram aumentos discretos em suas médias finais. Alterações hepáticas não ocorrem com tanta frequência nesta doença, mas há relatos de que pode ocorrer hepatomegalia devido à uma intensa reação inflamatória granulomatosa crônica após a visceralização do protozoário pela via sanguínea ou linfática, como descreveram Coutinho (2005). Resultados semelhantes para o aumento de FA também foram observados por este mesmo autor. Já Costa-Val (2004) observou valores de normalidade para estas mesmas enzimas nos animais em seu experimento.

As alterações na urinálise estão listadas na Tab. 5. A alteração mais frequente observada foi proteinúria. Os parâmetros observados nesses exames ajudam a confirmar os diagnósticos das outras doenças apresentadas pelos animais deste estudo, em associação à Leishmaniose.

Dentre os 12 animais avaliados, foram realizados exames de sorologia de ELISA e RIFI para Leishmaniose em

somente um animal, que apresentaram resultados não reagentes para os dois testes. O proprietário deste animal relatou ainda que anteriormente a esses exames, o animal foi submetido a três outros exames que apresentaram também resultados negativos. O proprietário de um segundo animal relatou ter feito exame para Leishmaniose 30 dias antes da consulta realizada e que este apresentou

resultado não reagente. Um terceiro animal realizou sorologia de ELISA e RIFI para Leishmaniose em um laboratório particular onde apresentaram resultados divergentes: o resultado de ELISA foi reagente, mas o resultado de RIFI apresentou-se como não reagente, resultados conflitantes pois, como recomenda o Ministério da Saúde (2006),

Tab. 5 – Alterações nos exames de urinálise de 3 animais com *Leishmania* spp observadas em esfregaço sanguíneo de rotina hematológica.

	ANIMAL 1	ANIMAL 2	ANIMAL 3	VALORES DE REFERÊNCIA
<b>PRINCIPAIS ALTERAÇÕES</b>	Proteína (+++),	Proteína (+),	Proteína (+),	Densidade: 1015-1045
	Densidade (1065),	glicose (+),	Sangue oculto (+++),	pH: 6,0-7,5
	Corpos cetônicos (+),	pH (5,0),	Densidade (1012),	Proteínas: negativo
	Bilirrubina (+++),	microbiota	Leucócitos (5-10/cp),	Glicose: negativo
	Urobilinogênio (3,0),	bacteriana (++)	Hemácias (10-15/cp),	Corpos cetônicos: negativo
	Leucócitos (15-20/cp),		presença de hemoglobina	Sangue oculto: negativo
	microbiota bacteriana (++),			Bilirrubina: negativo
	Células renais (5-7/cp),			Urobilinogênio: 0,2-1,0
	Células vesicais (2-4/cp),			Hemácias: <5
	Cristais de bilirrubina (++),			Leucócitos: <5
urato amorfo (++) , cistina (+)			Bactérias: ausentes	
			Células epiteliais: ausentes a raras	
			Cilindros: ausentes a raros	
			Cristais: ausentes	

\* valores de referência por Stockham & Scott (2002).

em caso de divergência entre as duas técnicas, considera-se o RIFI como confirmatório. O proprietário de um quarto animal mencionou ter realizado um exame particular e outro pela prefeitura para Leishmaniose e ambos demonstraram resultados negativos.

### **5 – Considerações finais**

Pode-se concluir que, a variedade dos achados laboratoriais não caracteriza a Leishmaniose. Animais que residem em regiões endêmicas para LVC e que apresentem anemia associada à hiperproteinemia com hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, podem apresentar parasitemia. Embora a literatura considere a observação de amastigotas de *Leishmania sp*, um achado raro, este relato alerta para a crescente disseminação da doença e, para a necessidade de se avaliar mais cuidadosamente esfregaços sanguíneos de rotina hematológica. Além disso, sugere-se que a confecção de lâminas obtidas a partir da capa de leucócitos seja realizada, pois pode permitir a melhor visualização de células parasitadas.

### **6 - Referências bibliográficas**

BABO-TERRA, V.J. TOLEDO, D.R. e HALVERSON, M.M. *Leishmania* spp. amastigotes in the peripheral blood of dogs. PUBVET, v.4, n.31, unpaginated, 2010.

BELO HORIZONTE, SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. 10 perguntas e respostas sobre Leishmaniose Visceral. Belo Horizonte: Secretaria Municipal da Saúde, 2012, 15p.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Série A. Normas e Manuais Técnicos, Brasília: Ministério da Saúde, 2006, 120p.

COSTA-VAL, A.P. *Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina com antimonia pentavalente encapsulado em lipossomas*. 2004. 126f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.



COUTINHO, J.F.V. *Estudo clínico-laboratorial e histopatológico de cães naturalmente infectados por Leishmania chagasi com diferentes graus de manifestação clínica*. 2005. 102f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

DIAS, C.A. *Estudo das alterações clínico-laboratoriais e histopatológicas renais em cães com Leishmaniose Visceral naturalmente infectados no Distrito Federal*. 2008. 91f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Universidade de Brasília, Brasília.

FELDMAN, B.V.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. Congenital and acquired vascular wall diseases. In: Schalm's Veterinary Hematology. 7<sup>a</sup>. ed. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cap.75, p.528-531.

IKEDA, F.A; CIARLINI, P. C; FEITOSA, M. M; GONÇALVES, M. E. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP: um estudo retrospectivo de 191 casos. *Clínica Veterinária*, n.47, p.42-48, 2003.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes: Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *TRENDS in Microbiology*, v.11, n.5, p.210-214, 2003.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*, v.213, n.4, p.183–191, 2008.

MAIA, C., CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Veterinary Parasitology*, v.158, p.274-287, 2008.

MANZILLO, V. F; PIANTEDOSI, D.; CORTESE, L. 2005. Detection of *Leishmania infantum* in canine peripheral blood. *Veterinary Record*, v.29, p.251-152, 2005.

MEDEIROS, C.M.O.; MELO, A.G.C.; LIMA, A.K.F.; SILVA, I.N.G. et al. Perfil hematológico de cães com

leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Ciência Animal*, v.8, n.1, p.43-50, 2008.

NELSON, R.W e COUTO, C.G. Infecções polissistêmicas por protozoário. In: NELSON et al. *Medicina interna dos pequenos animais*. 4<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. Cap. 99, p.1361-1374.

SA, G.J.L.; LEITE, A.K.R.M. Achados laboratoriais em cães soropositivos para Leishmaniose na cidade de Sobral, Ceará. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 20, unpaginated, 2013.

SARKAR, A.; AGA, E.; BUSSMEYER, U. et al. Infection of neutrophil granulocytes with *Leishmania major* activates ERK 1/2 and modulates multiple apoptotic pathways to inhibit apoptosis. *Med. Microbiol Immunol.*, v. 202, p. 25-35, 2013.

SILVA, A.D.F.; LIMA, M.C.J.S.; SOTO-BLANCO, B. Perfil hematológico e eletroforético de proteínas séricas em cães soropositivos para leishmaniose visceral no Estado do

Rio Grande do Norte. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, n.3, p.300-305, 2011.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Eritrócitos. In: *Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária*. 2<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, cap.3, p.90-185.

THRALL, M.A. Interpretação da resposta leucocitária nas doenças. In: *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 1<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Roca, 2007. Cap.12, p.127-140.

VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W. et al. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infection and Immunity*, v.70, n.8, p.4177–4184, 2002.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Immune-mediated thrombocytopenia. In: *Schalm's Veterinary Hematology*. 6a. ed. Wiley-Blackwell, 2010. Cap. 78, p.586-595.

WORLD HEALTH ORGANIZATION  
(WHO). Control of the leishmaniasis:  
report of a meeting of the WHO Expert

Committee on the Control of  
Leishmaniasis *W. H. O. Tech. Rep.*  
*Ser.*,v.949, 2010, 186 p.