

BRUNO DE QUEIROZ CASTILHOS



MIELOGRAMA: AVALIAÇÃO LABORATORIAL E APRESENTAÇÃO DE CASO CLÍNICO.

Monografia apresentada para conclusão do Curso Treinamento em serviço em Medicina Veterinária

Orientador: Profa. Dra. Rosangela Locatelli-Dittrich

CURITIBA

2012

Dedico este trabalho a minha esposa, Kauana Brotto Xisto Castilhos, por me fazer imensamente feliz e a minha orientadora Rosangela Locatelli-Dittrich pela perseverança, empenho e grande contribuição acadêmica a mim depositada.

Agradeço aos meus colegas de trabalho no laboratório, Olair Beltrame, Marília Koch, Ana Laura Pinto D´amico Fam e Nina Medeiros pela imensa amizade e confiança. Posso afirmar que estes foram os meus melhores anos acadêmicos. A todos os meus colegas de residência do hospital veterinário, pela amizade e crescimento científico. A todos que me ajudaram de alguma forma e me permitiram ajudá-los.

"Deus dá a todos uma estrela. Uns fazem da estrela um sol. Outros nem conseguem vê-la."

Helena Kolody.

SUMÁRIO

1	Resumo.....	7
2	Introdução.....	8
3	Conceito.....	8
	3.1 Linhagens Celulares e microambiente.....	8
	3.2 Indicações para realização do mielograma.....	9
	3.3 Mielograma – Obtendo a amostra.....	9
4	Avaliação Inicial.....	10
	4.1 Celularidade.....	11
	4.2 Avaliação de megacariócitos.....	11
	4.3 Relação Mielóide:eritróide.....	12
	4.4 Avaliação de ferro corável.....	13
	4.5 Avaliação das linhagens celulares.....	13
5	Outros métodos diagnósticos.....	14
	5.1 Citometria de Fluxo.....	14
	5.2 Corantes citoquímicos.....	14
	5.3 Imunofenotipagem.....	15
	5.4 Análise citogenética.....	15
6	Caso Clínico.....	16
	6.1 Discussão.....	18
7	Conclusão.....	21
8	Referências bibliográficas.....	22

LISTAS

TABELA 1: VALORES DE ERITROGAMA DE LABRADOR FÊMEA DE 11 ANOS DE IDADE.....17

TABELA 2: VALORES DE PLAQUETOGRAMA E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE LABRADOR FÊMEA DE 11 ANOS DE IDADE.....18

TABELA 3: LEUCOGRAMAS DE LABRADORA FÊMEA DE 11 ANOS DE IDADE..19

TABELA 4: MIELOGRAMA DE CADELA LABRADORA FÊMEA DE 11 ANOS DE IDADE.....20

1. RESUMO:

O mielograma é uma ferramenta diagnóstica útil na elucidação de casos clínicos nos quais anormalidades hematológicas específicas foram detectadas em exames laboratoriais de rotina. Por tratar-se de um exame essencialmente citológico, a experiência do patologista é decisiva na boa análise das amostras de medula óssea.

Nesse trabalho foi realizada uma revisão sobre a análise da medula óssea de animais, apresentação de novas técnicas de diagnóstico possíveis de serem realizadas na medula óssea e apresentação de caso clínico com indicações laboratoriais e clínicas para avaliação da medula óssea.

2. INTRODUÇÃO:

A utilização de exames laboratoriais para diagnóstico e prognóstico é extremamente comum e necessário na prática clínica, porém, o clínico médico é surpreendido com estados patológicos que necessitam de maior investigação. A avaliação laboratorial da medula óssea auxilia o clínico no diagnóstico final e o patologista deve ter conhecimento para realizar o exame e atualizar-se quanto as novas técnicas de diagnóstico na medula óssea.

3. Conceito

A medula óssea é um tecido envolto pela cortical óssea e ossos esponjosos e composta, em sua maioria, por células hematopoiéticas, tecido adiposo e tecido de sustentação. Pode ocupar até 85% da cavidade dos ossos e pesar 1,6 a 3,7 kg em humanos adultos. (5) É o maior órgão hematopoiético e um órgão linfóide primário, responsável pela produção de eritrócitos, leucócitos e plaquetas (4, 18); estas células se originam de uma célula mesenquimal primitiva pluripotente (5). A extensão da medula óssea vermelha, que se define como aquela com atividade hematopoiética, diminui de acordo com o crescimento de neonatos até a fase adulta, mas permanece no interior de ossos do esqueleto axial (ílio, costelas, esterno e vértebras) e apendicular proximal (úmero e fêmur). (1,2)

3.1 Linhagens celulares e microambiente

As linhagens e populações celulares encontradas na medula óssea são: eritróides, mieloides (granulocíticas e monocíticas), linfóides, megacariócitos, macrófagos, osteoclastos, osteoblastos, adipócitos, fibroblastos e mastócitos. A proliferação de células tronco hematopoiéticas não ocorre espontaneamente, mas requer a presença de um microambiente com estimuladores de crescimento hematopoiéticos específicos, que podem ser produzidos localmente ou produzidos em outros tecidos e transportados para a medula óssea via sangue. Como fatores

estimulantes cita-se: eritropoietina, trombopoietina, fatores estimuladores de colônias, interleucinas e interferons.(1,4,5)

3.2 Indicações para realização do mielograma

A avaliação de medula óssea é indicada quando são detectadas anormalidades sanguíneas periféricas em exames de rotina. As anormalidades são: neutropenia persistente, trombocitopenia não esclarecida, anemia pobremente regenerativa ou não regenerativa, para avaliar se a anemia é regenerativa ou não regenerativa em equinos, pancitopenia, linfocitose, especialmente se houver linfócitos atípicos ou outra evidência de neoplasia linfóide, eritrocitose, especialmente se não houver indício de hemoconcentração, contração esplênica ou doença cardiopulmonar, granulocitose ou monocitose quando houver suspeita de leucemia crônica, mastocitemia, neoplasias metastáticas, especialmente quando linfócitos e mastócitos estão envolvidos, doenças de armazenamento de ferro, especialmente quando se considera deficiência de ferro, quando há febre de origem desconhecida ou evidência de doenças específicas: histoplasmose, leishmaniose, citoxauzoonose, micobacteriose, erlichiose, babesiose e anaplasiose são os agentes mais comumente descritos. (1,2,3,18).

3.3 Mielograma – obtendo a amostra

Os locais de coleta devem ter tecido hematopoiético ativo; sendo que em cães e gatos espera-se encontrar na crista ilíaca ou nas cavidades medulares de ossos longos como fêmur, na fossa trocantérica e úmero proximal (1,2,3). A fossa trocantérica pode não ser acessível em pacientes grandes, obesos ou muito musculosos, além disso, em animais muito idosos a cortical dos ossos da fossa trocantérica é tão densa que pode dificultar a penetração da agulha neste sítio. Em gatos e cães muito pequenos, prefere-se a fossa trocantérica como sítio de aspiração. Em equinos, a MO é mais acessível nas esternébras??, porém, a crista ilíaca também é utilizada com grande sucesso. Em bovinos, a cavidade medular de porções proximais das costelas pode ser colhida bem como da crista ilíaca. (1,2,3,4).

A maioria das amostras de medula óssea é obtida por aspirado, sendo esta a técnica mais simples e menos dispendiosa. Têm como vantagens a melhor avaliação morfológica das populações celulares e progressão da maturação, sendo que aspectos celulares displásicos ou neoplásicos podem ser mais facilmente detectados. As desvantagens são de que a arquitetura tecidual é minimamente preservada e a interpretação é limitada quando espículas medulares não são obtidas, além de erro analítico causado por contaminação sanguínea periférica na hora da coleta. Se nenhum anticoagulante é usado na seringa de coleta, os esfregaços devem ser confeccionados imediatamente, pois a medula óssea coagula rapidamente. Como anticoagulante pode-se utilizar EDTA ou heparina. Os corantes utilizados são do tipo Romanowsky, que coram estruturas ácidas e básicas, como o corante de Wright e o de Giemsa. (3,4)

Outro método de obtenção de amostras de medula óssea é a biópsia óssea. A biópsia óssea requer agulhas especiais para cortar uma amostra sólida de tecido ósseo, que é colocado em fixador, descalcificador, preparado por histotécnica e examinado microscopicamente. A biópsia óssea é mais adequada para avaliar celularidade, arquitetura tecidual e maturação das linhagens, bem como lesões focais, inflamações, mielofitoses, necroses e neoplasias metastáticas do que o aspirado, porém, é mais difícil de avaliar a morfologia celular e muitos aspectos displásicos são passados despercebidos. A combinação de exames de amostras de biópsia e aspirado fornece as informações mais completas (1,4)

4 AVALIAÇÃO INICIAL

Aspirados de medula óssea contêm células do sangue periférico, porém, as melhores amostras são aquelas que possuem pequena quantidade de sangue contaminante. Uma amostra representativa contém tipicamente pequenos pedaços de tecidos conhecidos como fragmentos, unidades ou espículas. A celularidade hematopoiética das espículas reflete a celularidade hematopoiética medular. Quanto maior o número de espículas analisado, melhor é a avaliação; porém, a celularidade da medula óssea é melhor estimada através de cortes histológicos. Quando uma

interpretação não puder ser feita com certeza, a amostra citológica da medula óssea deve ser interpretada juntamente com uma lâmina de sangue periférico. (18)

4.1 Celularidade

Como os esfregaços de medula óssea têm celularidade heterogênea, a avaliação celular geral pode ser um tanto dificultosa e subjetiva, especialmente naquelas amostras hemodiluídas. Pode-se estimar a celularidade avaliando a proporção de gordura presente versus a quantidade de células hematopoiéticas. Normalmente uma proporção de 1:1 entre gordura e células hematopoiéticas é esperada.

Quando as partículas analisadas na lâmina contêm mais de 75% de células a medula óssea é interpretada como hiper celular, ao passo que se há mais de 75% de gordura, a MO é classificada com hipocelular, porém, alguns cuidados devem ser tomados nesta interpretação, uma vez que espículas nem sempre estão presentes nas amostras, resultando em interpretação errônea de hipocelularidade. Nota-se um aumento da celularidade quando há uma maior produção de linhagens celulares mielóides ou eritróides em resposta à necessidades periféricas, como as que ocorrem devido a anemias ou inflamações purulentas e distúrbios autoimunes que aumentam a taxa de destruição celular. Os distúrbios mielo e linfoproliferativos também são causas importantes de aumento da celularidade medular. Pode-se notar menor celularidade nos casos de distúrbios infecciosos, mielofibrose, intoxicações medicamentosas e por quimioterápicos, radiações e distúrbios imunomediados que causem lesão nas células tronco. (1,2,3,4,5)

4.2 Avaliação de Megacariócitos:

A avaliação da população de megacariócitos é o segundo passo no mielograma, após a avaliação geral da celularidade. É melhor avaliada em amostras biopsiadas. A frequência e morfologia dos megacariócitos deve ser avaliada em menor aumento (10X), quando amostras citológicas são avaliadas. Esta avaliação é muito subjetiva e

altamente dependente da boa qualidade da amostra. Em animais hígidos, nota-se pelo menos um megacariócito por espícula. As literaturas divergem quanto ao número esperado de megacariócitos para a classificação de hipoplasia e hiperplasia megacariocítica, porém, valores como 10-20 megacariócitos por espícula geralmente reflete hiperplasia e valores menores do que um por espícula pode refletir hipoplasia.

A experiência do patologista e achados de hemograma devem ser levados em consideração na avaliação. As anormalidades morfológicas devem ser anotadas, tais como aumento no número de formas imaturas ou micromegacariócitos .(1,2,18)

4.3 Relação mielóide: eritróide

A relação mielóide: eritróide é frequentemente estimada, mas pode ser calculada utilizando a contagem diferencial de células mieloides e eritróides, compreendendo, geralmente, a diferenciação de 500 células, porém, pode ser ajustada de acordo com a celularidade da MO. São excluídos da contagem diferencial mielóide os linfócitos, plasmócitos, macrófagos e células do estroma. Alguns autores defendem que diferenciar as linhagens mieloides e eritróides tem poucas conclusões clínicas, além de ser exaustiva e frustrante, podendo ser substituída pela classificação adequada apenas das células mieloides e eritróides. A relação esperada de leucócitos não linfóides para precursores eritróides varia de acordo com a espécie e individualmente e possui uma ampla variação em cães e gatos. Considera-se valores normais entre 0,75:1 e 2,0:1, porém, estes valores podem variar de 0,6:1 a 4,4:1. (1,18).

Uma relação M:E pode estar aumentada quando há hiperplasia granulocítica ou hipoplasia eritróide. A celularidade da medula óssea deve guiar tais conclusões, sendo que se a medula encontra-se hipercelular, a hiperplasia mielóide está contribuindo para o aumento na relação M:E, se a medula encontra-se hipocelular, a hipoplasia eritróide está contribuindo para o aumento. Caso se tenha dúvida, os resultados de hemograma devem auxiliar na interpretação. A relação M:E diminuída pode ser causada por hipoplasia mielóide ou hiperplasia eritróide. Se a celularidade

hematopoiética estiver aumentada, a hiperplasia eritroide está contribuindo para a diminuição; e se a celularidade medular estiver diminuída, a hipoplasia granulocítica é responsável pela baixa relação M:E. (1, 2, 18,)

4.4 Avaliação de ferro corável

A medula óssea é um local importante para a reserva de ferro logo a quantidade de ferro corável é um indicador sensível de estoque de ferro; este exame se torna importante naqueles casos de avaliação de anemia em que a mensuração de ferro sérico não elucida um diagnóstico definitivo. O exame é feito analisando o esfregaço corado por azul da Prússia, que precipita o ferro dentro dos macrófagos e dos eritroblastos que contém ferro (sideroblastos), corando estes precipitados com cor azulada escura. O esfregaço é avaliado de acordo com uma escala que classifica a presença destes precipitados, de 0 a 6+ (escala de Bain).

O ferro na medula óssea está ausente ou diminuído nos pacientes anêmicos por deficiência de ferro, incluindo cães com policitemia e aumentado nos pacientes com qualquer tipo de anemia, exceto naquelas deficientes de ferro. O ferro corável aumenta na medula óssea com o envelhecimento, logo é normal uma precipitação maior nestes casos. Medula óssea de gatos normais não exhibe ferro corável, logo sua ausência não pode ser usada para confirmar deficiência de ferro, pelo contrário, a presença de ferro corável é patológica e é suspeitada em animais com desordens mieloproliferativas, pós transfusão e anemias hemolíticas. Estoques podem estar ausentes em animais jovens sadios de qualquer espécie (1,2,5)

4.5 Avaliação das linhagens celulares.

A análise morfológica das linhagens presentes na medula óssea deve ser feita sistematicamente, com conhecimento prévio das alterações de hemograma e histórico clínico do paciente. Deve-se identificar alterações celulares como alterações megaloblásticas, cariólise, picnose das células imaturas, assincronia de maturação e presença de eritrofagocitose. A experiência do observador é imperativa

nesta parte do exame. A proporção de células blásticas deve ser mensurada, pois processos leucêmicos podem ser identificados.

5. OUTROS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

5.1 -Citometria de fluxo.

A citometria de fluxo é indicada nos casos em que se deseja uma caracterização de antígenos de membrana celulares, os quais permitem identificar com acurácia o tipo celular presente na amostra, logo, é muito útil nos casos de neoplasias, em que um antígeno específico da membrana da célula tumoral é marcado e posteriormente identificado no citômetro. Em estudos clínicos não tóxicos, a medula óssea de ratos e cães geralmente é coletada e avaliada por citometria utilizando anticorpos monoclonais para marcar os epítomos CD71 para marcar as linhagens eritróides e CD45 para marcar as linhagens granulocíticas/linfóides. (4)

5.2 Corantes citoquímicos:

Os corantes citoquímicos evidenciam enzimas ou outras substâncias intracelulares. Com estas colorações as linhagens celulares coram-se heterogeneamente, possibilitando sua diferenciação com maior precisão. Por exemplo, neutrófilos e monócitos contêm peroxidase, enquanto linfócitos, precursores eritróides e megacariócitos não. No entanto, precursores mielóides pouco diferenciados podem não conter quantidade suficiente do analito para uma reação positiva, ou a coloração pode ser equivocada. Além, alguns protocolos citoquímicos adaptados para cães têm demonstrado reações cruzadas ou reações negativas.

Era utilizada como rotina para classificar as leucemias em humanos, porém está sendo substituída pela citometria de fluxo. Como corantes citoquímicos pode-se citar o Sudan Black B, Cloroacetato esterase, Alfa nafitil butirato esterase, o

periódico ácido de Schiff a fosfatase ácida, a mieloperoxidase e a fosfatase alcalina leucocitária, sendo que essa última cora os grânulos dos granulócitos no estágio inicial de mielócito, porém, reações positivas já foram descritas em leucemia monocíticas e leucemias linfoides. (3,5,6,17,22)

5.3 Imunofenotipagem:

Esta técnica utiliza anticorpos monoclonais para a detecção de CDs (*clusters designations*), por meio de citometria de fluxo ou corantes imunoistoquímicos. Esta técnica é a ferramenta diagnóstica mais sensível e permite caracterizar com precisão as neoplasias hematológicas; especialmente as neoplasias agudas pobremente diferenciadas. Alguns laboratórios especializados montam um painel de anticorpos para cada doença, por exemplo, a procura de linfócitos B inclui o uso de anticorpos que irão evidenciar os CD19, CD20 e CD22, enquanto que o painel para linfócito T inclui CD2, CD3, CD4 e CD7, MPO para células mielóides, CD41 para megacarioblastos, CD34 para leucemias agudas (blastos hematopoiéticos).(2,5, 12,21, 22, 23)

5.4 Análise citogenética:

A análise citogenética necessita células em estágio de metáfase. Para o diagnóstico em amostras de medula óssea, é preciso cultivar as células por um curto período de tempo para que as células atinjam o estágio de metáfase. Após três dias em meio de cultura as células são colhidas, fixadas em ácido acético e metanol e então, fixadas em lâmina. Este método permite inferir informações sobre diagnóstico, tratamento e prognósticos. As translocações cromossômicas não aleatórias vistas nas malignidades hematológicas parecem envolver genes que regulam a proliferação, diferenciação e apoptose celular. Atualmente, a técnica genética mais utilizada é a reação em cadeia da polimerase (PCR) para avaliação de clonabilidade, porém, a técnica de FISH (fluorescent in situ hybridization) para a procura de translocação BCR-ABL já foi descrita com sucesso em um cão com leucemia monocítica crônica (17, 16)

6. CASO CLÍNICO

Cão, fêmea, raça Labrador, pesando 30 kg, não castrada, nascida no mês 07 de 2001 deu entrada no Hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná (UFPR), no dia 03/05/2011 com queixa principal de tumores em mamas.

No exame físico apresentava-se com bom score corporal, seborreia seca, prurido, auscultação cardiopulmonar normal, doença periodontal grau II e otite externa. O animal foi encaminhado para exames de estadiamento tumoral no dia 11/05/2011, que incluíam RX, ultrassom abdominal, hemograma e dosagem de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), uréia, creatinina e glicose.

O ultrassom abdominal revelou baço com tamanho aumentado, porém com contornos preservados, parênquima heterogêneo, apresentando entremeado nodular hipocogênico (maior medindo cerca de 0,8 X 0,7 cm) e áreas hiperecogênicas difusas; os ovários não foram visualizados porém o corno uterino esquerdo apresentava parede espessada e cistos parietais, medindo 0,6 cm de diâmetro. O corno direito uterino não foi visualizado. O corpo uterino era evidente, com parede espessada e múltiplos cistos parietais, medindo aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. Fígado, rins, bexiga, estômago e alças intestinais não apresentavam anormalidades. As adrenais não foram visualizadas e não havia alteração ultrassonográfica em região pancreática e de linfonodos intra-abdominais. Estes achados sugerem hiperplasia nodular linfóide ou processo neoplásico infiltrativo. As imagens uterinas têm como principal diferencial a hiperplasia endometrial cística. O exame radiológico não evidenciou metástases.

O hemograma foi realizado em contador automático de células (BC 2800vet, mindray) com revisão microscópica da lâmina corada por corante do tipo Diff quick.mA proteína plasmática foi obtida por refratometria. Os parâmetros bioquímicos foram obtidos em analisador automático (BS 200 chemistry analyser, Mindray). Os resultados de eritograma, plaquetograma, leucograma e parâmetros bioquímicos encontram-se nas tabelas 1,2,3 e 4 respectivamente.

Analisando os resultados, os diagnósticos diferenciais incluíam reação leucemóide, neutrofilia paraneoplásica e leucemia mielóide crônica. O animal foi liberado para tratamento com antibióticos e antiinflamatórios (ceftriaxona 750 mg BID por 15 dias, prednisolona 30mg SID por 7 dias, após 20 mg por 7 dias e 10 mg por mais 7 dias e ranitidina 60 mg BID por 7 dias) para tratar uma possível reação leucemóide inflamatória.

No dia 16/06/2011 o animal retornou ao hospital veterinário. O proprietário relatara que o prurido e os meneios de cabeça tinham diminuído bastante. O animal apresentava-se em ótimo estado de alerta e condição corporal. Foi realizada nova coleta de sangue para hemograma (tabelas 1,2 e 3). Na piora dos resultados laboratoriais, decidiu-se no dia 20/06/2011 realizar uma coleta de medula óssea com coleta simultânea de sangue periférico para hemograma e exames bioquímicos. O animal recebeu um protocolo de indução anestésica com propofol 4mg/kg + cetamina 1 mg/kg, sendo que a manutenção anestésica foi feita com propofol. Tramadol foi usado na dose de 1,5mg/kg no pós anestésico imediato. O local de punção da medula óssea escolhido foi a crista ilíaca. A medula óssea foi coletada sem anticoagulante na seringa e várias lâminas foram feitas, coradas com Wright e secas naturalmente. Os resultados do mielograma encontram-se na tabela 5. Em lâminas confeccionadas com sangue periférico das coletas dos dias 16 e 20 foram realizadas colorações citoquímicas para CAE (cloroacetato esterase) e MPO (mieloperoxidase). A análise destas lâminas revelou positividade para CAE em mais de 95% das células analisadas, e reação negativa para MPO, evidenciando o comprometimento neutrofílico das células. Após o resultado do mielograma o proprietário foi chamado para discussão de protocolo antineoplásico, porém, não foi encontrado. Por telefone relata apenas que paciente está em condições ótimas de saúde.

TABELA 1: VALORES DE ERITROGAMA DE LABRADOR FÊMEA DE 11 ANOS DE IDADE

	12/05/2011	16/06/2011	20/06/2011	Valores normais
Hemácia (X10 ⁶)	6,21	4,26	4,15	5,5 a 8,5
Hematócrito (%)	43	27	28	37 a 55
Hemoglobina (g/dL)	15,7	10,9	9,9	12 a 18
VGM (fL)	70,2	68,2	67,9	60 a 77
CHGM (g/dL)	36	37,5	35,2	32 a 36
RDW (%)	14,9	14,6	15,3	11,0 a 15,5
Observações		anisocitose discreta	anisocitose discreta, 1 metarrubrócito em 100 leucócitos	

Fonte: Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – UFPR

TABELA 2: VALORES DE PLAQUETOGRAMA E PROTEÍNA PLASMÁTICA TOTAL DE LABRADOR FÊMEA DE 11 ANOS DE IDADE

	23/06/2011	16/06/2011	20/06/2011	Valores normais
Plaquetas (/μL)	164.000	560.000	679.000	200.000 a 500.000
MPV (fL)	8,8	10,7	10,3	
PDW	15,6	15,8	15	
PPT*	8,8	7,8	8	6 a 8

* proteína plasmática total

Fonte: Laboratório de Patologia Clínica Veterinária – UFPR

6.1 Discussão

O presente caso tem como principal diagnóstico a leucemia mielóide crônica, uma doença incomum nos cães, que provoca leucocitoses extremas (>50.000/μL) e intenso desvio a esquerda de neutrófilos (9), o que foi notoriamente observado neste caso. A elevada proporção mielóide:eritróide verificada na medula óssea também é um achado da LMC, porém, não é específico. A Reação leucemóide, que pode provocar quadros leucocitários semelhantes foi excluída devido a não resolução do quadro hematológico frente um tratamento com antibióticos e antiinflamatórios, protocolo padrão para excluir a reação leucemóide como diagnóstico. A Leucemia mielóide crônica deve ser confirmada citogeneticamente, pela evidencia da translocação BCR-ABL no cromossomo 22, porém, outros testes auxiliam na

confiabilidade do diagnóstico, como imunohistoquímica, evidenciando CAE, CD11b e CD11c.

As colorações citoquímicas podem ser utilizadas, como a fosfatase alcalina leucocitária, que está ausente ou em quantidade muito pequena nos neutrófilos neoplásicos em LMC; ou CAE (cloroacetato esterase), uma enzima neutrofílica. Este caso apresentou reação positiva para CAE em sangue periférico em mais de 95% das células nucleadas presentes e ausência de reação para MPO. Este achado está em conformidade com relatos prévios (23). Apesar de não ser decisiva, a combinação de achados morfológicos em sangue periférico e medula óssea com a ausência de coloração citoquímica para fosfatase alcalina leucocitária e MPO e coloração positiva para CAE suporta o diagnóstico de LMC. (10, 19).

Um diagnóstico menos provável, porém, ainda a ser excluído neste caso é a neutrofilia paraneoplásica, uma vez que esta causa grandes leucocitoses com desvio a esquerda notável e foi associada com uma variedade de neoplasias nos animais.(20). Com a ausência de testes mais específicos para o diagnóstico de LMC como a análise citogenética ou a imunofenotipagem, a neutrofilia paraneoplásica torna-se, ainda, um diferencial. Sem estes testes, a exclusão desta causa daria-se com a retirada do foco tumoral nas mamas da paciente. A esplenomegalia constatada neste caso pode ser explicada pelo seqüestro celular, em que células granulocíticas se infiltram no órgão, ou por hematopoiese extramedular.(7,8, 17). Os achados hematológicos de anemia estão em conformidade com a maioria dos relatos (1,2,3,11,15,14,18), em que uma anemia leve a moderada, não regenerativa é notada. Acredita-se que esta anemia seja causada por doença crônica ou mielofitose, ou seja, a substituição das linhagens medulares por uma linhagem predominante, neste caso, a linhagem granulocítica (3,4). As plaquetas estavam dentro dos limites de referência, como relatado anteriormente (3,13). Os leucócitos apresentam todos os achados clássicos da LMC. Intensa leucocitose com desvio a esquerda de neutrófilos marcante sem resolução com tratamento antibiótico/antiinflamatório. A medula óssea apresenta um típico aumento na relação mielóide:eritróide, já esperado para este caso, e possui menos de 30% de blastos,

caracterizando a leucemia como crônica. O proprietário está sendo contatado para o retorno do animal ao hospital, pois foi conseguido uma análise citogenética para verificação da translocação BCR-ABL.

TABELA 3: LEUCOGRAMAS DE LABRADORA FÊMEA DE 11 ANOS DE IDADE

	12/05/2011	16/06/2011	20/06/2011	Valores normais
Leucócitos totais (/μL)	81.000	191.200	135.100	6.000 a 17.000
Neutrófilos segmentados (%)	70	46	59	60 a 77
Neutrófilos segmentados (/μl)	56.700	87.952	79.709	3.000 a 11.500
Neutrófilos bastonetes (%)	14	22	20	0 a 3
Neutrófilos bastonetes (/μl)	11.340	42.064	27.000	0 a 300
Metamielócito (%)	2	6	5	0
Metamielócito (/μl)	1.620	11.472	6.755	0
Mielócito (%)	0	3	1	0
Mielócito (/μl)	0	5.736	1.351	0
Promielócito (%)	0	1	1	0
Promielócito (/μl)	0	1.912	1.351	0
Linfócito (%)	8	8	5	12 a 30
Linfócito (/μl)	6.480	15.296	6.755	1.000 a 4.800
Eosinófilos (%)	4	8	1	2 a 10
Eosinófilos (/μl)	3.240	15.296	1.351	100 a 1.250
Monócitos (%)	2	14	9	3 a 10
Monócitos (/μl)	1.620	26.768	8.106	150 a 1.350
Basófilos (%)	0	0	0	raros
Basófilos (/μl)	0	0	0	raros

Fonte: Laboratório de patologia clínica veterinária – UFPR

TABELA 4: MIELOGRAMA DE CADELA LABRADORA FÊMEA DE 11 ANOS DE IDADE.

	CONTAGEM DIFERENCIAL		Valores de referência (%)
	500 Células	%	
SÉRIE ERITROCÍTICA			
Rubroblasto			0,2 - 1,1
Pró-rubrócito	4	0,8	0,9 - 3,9
Rubrócito	27	5,4	19,2 - 35,1
Metarrubrócito	11	2,2	9,2 - 16,4
TOTAL	42	8,4	46,4
SÉRIE GRANULOCÍTICA			
Mieloblastos			0,4 - 1,1
pró-mielócitos	5	1,0	1,1 - 2,3
Mielócitos			
neutrófilos	15	3,0	3,1 - 9,0
eosinófilos	0	0,0	0
basófilos	0	0,0	0
Metamielócitos			
neutrófilos	40	8,0	5,3 - 8,8
eosinófilos	0	0,0	2,4
basófilos	0	0,0	0
Bastonetes			
neutrófilos	199	39,8	12,7 - 17,2
eosinófilos	0	0,0	0,9
basófilos	0	0,0	0
Segmetados			
neutrófilos	199	39,8	13,8 - 24,2
eosinófilos	0	0,0	0,3
basófilos	0	0,0	0
TOTAL	458	91,6	53,4
RELAÇÃO M:E	10,9 : 1		0,75 - 2,53: 1,0
Outras células			
Pró-linfócitos	0	0,0	0
Linfócitos	2	0,4	0,2 - 4,9
Monócitos	1	0,2	0 - 2
Plasmócitos	20	0,4	0 - 0,2
Macrófagos	0	0,0	0 - 4,0
megacariócitos/campo	1/ partícula		2 -7/ partícula
Observações	1 figura de mitose		

Fonte: Laboratório de Patologia Clínica Veterinária - UFPR

7. CONCLUSÃO.

A realização do mielograma foi essencial na conduta clínica e diagnóstica no caso apresentado, revelando o possível diagnóstico. Ressalta-se a importância da experiência do patologista na análise citológica da medula óssea. Espero que, em breve, a medicina veterinária no Brasil tenha ferramentas diagnósticas mais avançadas, como análise citogenética e citometria de fluxo para que casos como este tenham uma melhor caracterização.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 STEVEN L. STOCKHAM & MICHAEL A. SCOTT **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária** 2ª Ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2011
- 2 HARVEY, JOHN W. **Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals**, Philadelphia, USA: Saunders, 2001.
- 3 THRALL. M, A, **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária** Ed. Saunders, 2007
- 4 REAGAN. J, W,; IRIZARRY-ROVIRA, A.; POITOUT-BELISSENT. F. BOLLIGER, A, P,; RAMAIAH, S, K,; TRAVLOS G.; WALKER, D.; BOUNOUS, D.; WALTER G. **Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies**, Vet. Clinical Pathology 40/2 119:135. 2011
- 5 RILEY RS, WILLIAMS D, ROSS M, ZHAO S, CHESNEY A, CLARK BD, BEN-EZRA JM. **Bone Marrow Aspirate and Biopsy: A Pathologist's Perspective. II. Interpretation of the Bone Marrow Aspirate and Biopsy**. JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSES.;23(5):259-307. 2009
- 6 KANEGAE, M. P.P., XIMENES, V. F.; FALCÃO, R. P.; COLTURATO, V. A. R.; MATTOS, E. R.; BRUNETTI, I, L.; FONSECA, L. M.; **Chemiluminescent Determination of Leukocyte Alkaline Phosphatase: An Advantageous Alternative to the Cytochemical Assay**. Journal of Clinical Laboratory Analysis 21: 91–96 (2007)
- 7 JACQUELINE M.TARRANT; TRACY STOKOL; JULIA T.BLUE; SEAN P.MCDONOUGH; PETER FARRELL, **Diagnosis of Chronic Myelogenous Leukemia in a Dog Using Morphologic, Cytochemical, and Flow Cytometric Techniques**. Veterinary Clinical Pathology, 30: 19–24, March, 2001.
- 8 AMÂNCIO, J.; SCURO, G.; GAZONI, F. M.; GUIMARÃES, H. P.; VENDRAME L. S.; LOPES, R. D.; LOPES A. C.; **Leucemia Mielóide Crônica e Síndrome de Hiper-Viscosidade. Relato de Caso**, Revista Brasileira de Terapia Intensiva Vol. 20 Nº 1, Janeiro/Março, 2008
- 9 COUTO, C.G. Leucemias. In: NELSON & COUTO, **Medicina Interna de Pequenos Animais**, 3 ed, Mosby Elsevier, p. 1097-1104, 2006.
- 10 DOBSON, J. VILLIERS, E. MORRIS, J. **Diagnosis and management of leukaemia in dogs and cats**. In Practice, v.28, p. 22-31, 2006.

12 FRANCO, D. G.; SEGUNDO, J. P.; NARDO, C. D.; SUEIRO F. A. R.; CASTRO, K. F. DAGNONE, A. S. **Leucemia canina: aspectos laboratoriais e clínicos – revisão de literatura.** Vet. e Zootec. supl. ao v.15, n.3, dez., p.15-18, 2008.

13 NORTH, S.; BANKS, T.; **Small animal clinical oncology**, Ed. Saunders, 2007.

14 COUTO, C. GUILHERMO, NELSON, RICHARD W– **Medicina interna de pequenos animais.** Ed. Elsevier, 2010.

15 MARCONATO L., BONFANTI U., FILECCI I. **dermatological toxicity of hydroxyurea in two dogs with spontaneously noccuring tumours.** Journal of Small Animal Practice, 48, 514–517, 2007.

16 CARDONA, C. J; MILNER, R; ALLEMAN, R, A; WILLIAMS, C; VERNAU, W; BREEN, M; TOMPKINS, M. **BCR-ABL translocation in a dog with chronic monocytic leukemia,** Veterinary Clinical Pathology Vol 40 No.1 2011

17 MACMANUS, P. M.; **Classification of myeloid neoplasms: a comparative review.** Veterinary Clinical Pathology Vol.34 No.3 2005

18 COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H.; DENICOLA D. B.; **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos.** Saunders 2009.

19 KANEGAE, M, P,P,; XIMENES, V. F.; FALCÃO, R, P,; COLTURATO V. R.; MATTOS E. R., BRUNETTI I, FONSECA L. M.**Chemiluminescent Determination of Leukocyte Alkaline Phosphatase: An Advantageous Alternative to the Cytochemical Assay.** Journal of Clinical Laboratory Analysis 21:91–96, 2007

20 KNOTTENBELT. C. M., SIMPSON J. W. CHANDLER M. L. **Neutrophilic leucocytosis in a dog with a rectal tumour** Journal of Small Animal practice 41,457-460, 2000.

21- SUTER, S. T.; VERNAU, W.; .FRY, M. M.; LONDON, C. A.; **CD34+, CD41+, Acute Megacarioblastic Leukemia in a Dog,** Veterinary Clinical Pathology, Vol.36 No.3 2007.

22- LEDIEU, D.; PALAZZI, X., MARCHAL, T., FOURNEL-FLEURY, C., **Acute megakaryoblastic leukemia with erythrophagocytosis and thrombosis in a dog.** Veterinary Clinical Pathology, Vol34. No1, 2005.

23- TARRANT, M. J.; STOKOL, T.; BLUE, T. J.; McDONOUGH, S. P.; FARREL, P.; **Diagnosis of Chronic Myelogenous Leukemia in a Dog Using Morphologic, Cytochemical, and Flow Cytometric Techniques.** Veterinary Clinical Pathology, Vol 30, No1, 2001.