

Aspergilose pulmonar associado a infarto agudo do miocárdio em cão

Bronchopulmonary Aspergillosis Associated with Acute Myocardial Infarction in Dog

Erick Platiní Ferreira de Souto¹, Gabrielle Sousa Carvalho², Maria Talita Soares Frade¹, Roberio Gomes Olinda¹, Clarice Ricardo de Macêdo Pessoa³, Glaucia Denise Kommers⁴, Almir Pereira Souza¹ & Antônio Flávio Medeiros Dantas¹

ABSTRACT

Background: Fungi of the genus *Aspergillus* are ubiquitous microorganisms of opportunistic character, of which animals and humans are continually exposed. Are described three main forms of aspergillosis in dogs: nasal, disseminated and bronchopulmonary. This form which is restricted to the lung parenchyma is considered rare in dogs. The aim of this paper is to report a case of pulmonary aspergillosis associated to acute myocardial infarction in a dog, focusing on epidemiological, clinical, pathological and immunohistochemical characteristics.

Case: A male dog, 4-year-old, Pinscher, clinically presented dyspnea, anorexia, vomiting, concentrated urine and dark and mollified faeces. On physical examination, there were congested oral and conjunctival mucosas, dehydration and petechiae in the outer ear. The animal died five days after the clinical attendance and was sent for necropsy. The macroscopic lesions were restricted to the lung, heart and liver. There were multifocal areas of consolidation in the lung parenchyma and yellowish content in the trachea and bronchi lumen. The heart was rounded and with pale areas in the myocardium. Liver was discreet accentuation of the lobular pattern. Histologically the lesion was characterized by pyogranulomatous and necrotizing bronchopneumonia, multifocal to coalescing, moderate, associated with myriads of intralesional hyphae consistent with *Aspergillus* spp., associated with acute myocardial infarction. The hyphae weakly stained basophilic by hematoxylin and eosin were strongly impregnated by Grocott's methenamine silver nitrate and showed strong immunolabelling of the cytoplasm, which were evidenced in brown. There were areas of acute myocardial infarction and hepatocellular degeneration and congestion in the liver, although fungal hyphae were not observed in these tissues.

Discussion: The diagnosis of pulmonary aspergillosis was established based on the morphological and tinctorial characteristics of the agent and confirmed by immunohistochemistry. In this case, is not included in the clinical history any conditions that could promote immunosuppression, neither were observed morphological changes in the pathological examination which suggested other intercurrent diseases. It is likely that the dog has been exposed to the inhalation of large amounts of conidia for a long period of time, condition that favors the occurrence of the disease, even in immunocompetent animals. Probably were not evidenced severe respiratory clinical signs, that characterize the pulmonary impairment, due to the short course of the disease. The pyogranulomatous and necrotizing inflammatory reaction is typical of fungal infection and was restricted to the lung parenchyma. The areas of coagulation necrosis observed in the myocardium are probably secondary to vascular injury caused by the fungi, with subsequent thromboembolism, ischemia and infarction. In Brazil, there are few reports of aspergillosis in dogs, have been reported the nasal and systemic forms. In the world literature, there are few reports about this bronchopulmonary form of the disease. Although uncommon, pulmonary aspergillosis should be considered in the differential diagnosis of diseases that affect the lower respiratory tract of dogs, as well as its systemic complications resulting from angioinvasive characteristic of the fungus, which in this case was determinant to the death of the animal.

Keywords: *Aspergillus*, fungal disease, respiratory tract.

Descritores: *Aspergillus*, doença fúngica, trato respiratório.

INTRODUÇÃO

Fungos do gênero *Aspergillus* são microrganismos ubíquos, de caráter oportunista, aos quais animais e seres humanos estão continuamente expostos [3]. O sistema respiratório é a habitual porta de entrada desses agentes [14].

Infecções por estes fungos geralmente não promovem doença nos cães, sendo necessárias condições de imunossupressão associadas a outros fatores de risco para que ocorra a doença [3]. No entanto, a doença pode ocorrer ocasionalmente em animais imunocompetentes, estando a patogenicidade relacionada à virulência da espécie infectante e à quantidade de propágulos fúngicos inalados [1].

São descritas três principais formas de aspergilose em cães: nasal, disseminada e broncopulmonar [17]. A forma nasal é mais frequente e geralmente está associada à sinusite, acometendo particularmente raças dolicocefálicas [12]; a forma disseminada é infrequente, mas potencialmente fatal, ocorrendo disseminação por via hematogena para diferentes órgãos [17]; e a forma que se restringe ao parênquima pulmonar é considerada rara em cães [1]. O objetivo desse trabalho é relatar um caso de aspergilose pulmonar em cão, com enfoque nos achados epidemiológicos, clínico-patológicos e imuno-histoquímicos.

CASO

Um canino macho, quatro anos de idade, da raça Pinscher, foi atendido no Hospital Veterinário com histórico de dificuldade respiratória, anorexia, vômito e fezes diarreicas e enegrecidas há aproximadamente dois dias. Ao exame físico, observaram-se mucosas conjuntival e oral congestas, desidratação e presença de petéquias no pavilhão auricular. No hemograma observou-se leucocitose com neutrofilia e desvio à esquerda e na bioquímica sérica discreto aumento dos níveis de ureia e creatinina. O animal morreu cinco dias após o atendimento clínico e foi encaminhado para o exame necropsia no Laboratório de Patologia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, Paraíba.

Fragmentos de tecidos foram coletados, fixados em formol tamponado a 10%, processados rotineiramente e corados com hematoxilina e eosina (HE). Secções histológicas foram também coradas pela metenamina nitrato de prata de Grocott (GMS).

Macroscopicamente observaram-se lesões nos pulmões, coração e fígado. Nos pulmões havia áreas

multifocais de consolidação do parênquima e com conteúdo amarelado na traqueia e no lúmen de brônquios. O coração apresentava-se globoso e com áreas pálidas multifocais no miocárdio, além de coágulos mistos em ambos os ventrículos. No fígado observou-se discreta evidenciação do padrão lobular.

Histologicamente a lesão caracterizava-se por broncopneumonia piogranulomatosa e necrosante, multifocal a coalescente, moderada, associada a miríades de hifas intralésionais compatíveis com *Aspergillus* spp., associada a infarto agudo do miocárdio.

Havia nos pulmões áreas multifocais a coalescentes, por vezes focalmente extensas, de necrose, com infiltrado inflamatório constituído predominantemente por neutrófilos e macrófagos (Figura 1A). Observou-se ainda infiltrado inflamatório semelhante no lúmen de brônquios, bronquíolos e alvéolos, além de necrose do epitélio que reveste essas estruturas. Associado a essas áreas foram observadas miríades de hifas de paredes paralelas, septadas, por vezes com ramificações dicotômicas, que mediam aproximadamente 8 µm; verificadas em maior quantidade no lúmen de brônquios (Figura 1B), e em menor número no lúmen de bronquíolos e alvéolos. No lúmen dos brônquios foram observadas estruturas características do gênero *Aspergillus* que, neste caso, consistiam de uma vesícula aspergilar recoberta por uma camada biseriada composta por metulas e fiáides hialinas de paredes lisas que formavam fialoconídios globosos dispostos radiadamente (Figura 1B, inset).

No coração havia áreas focalmente extensas de necrose de coagulação de cardiomiócitos associado a discreto infiltrado inflamatório de macrófagos e raros neutrófilos. No fígado observou-se difusa degeneração hepatocelular, mais pronunciada na região centrolobular, e congestão difusa e acentuada dos capilares sinusoidais.

A imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada utilizando-se o anticorpo primário monoclonal produzido em camundongo anti-*Aspergillus* spp. (Clone WF-AF-1, AbD) (Serotec®)¹. As secções de tecidos foram submetidas à desparafinização e hidratação. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3% (Água oxigenada Farmax®)² por 10 min. As reações inespecíficas foram bloqueadas com a incubação dos cortes em leite em pó desnatado (Molico®)³ a 5% por 30 min em temperatura ambiente. Como sistema de detecção, utilizou-se o polímero EasyLink One (Amplificador+Polímero HRP) (EasyPath®)⁴ e a

revelação foi com o substrato-cromógeno DAB (Liquid DAB [3,3'diaminobenzidine]) (Dako®)⁵. Como controle negativo utilizou-se uma secção do tecido analisado incubado apenas com o diluente do anticorpo (PBST) e como controle positivo utilizou-se um caso previamente diagnosticado como aspergilose.

As hifas observadas fracamente basofílicas em HE foram fortemente impregnadas pela reação de GMS (Figura 1C) e na IHQ demonstraram intensa imunomarcagem do citoplasma das hifas, sendo evidenciadas em marrom (Figura 1D).

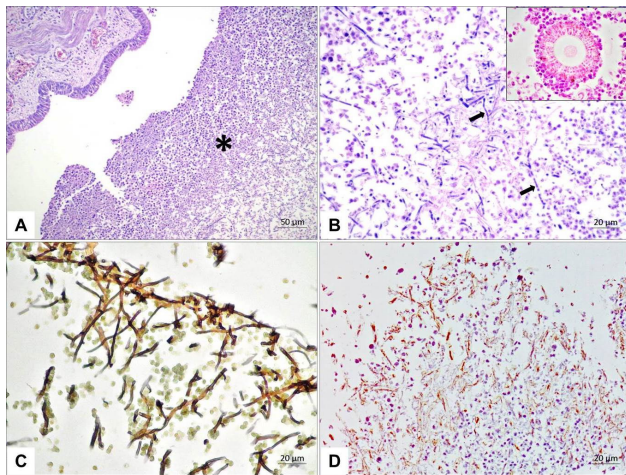


Figura 1. Aspergilose pulmonar em cão. A- Observa-se infiltrado inflamatório piogranulomatoso associado à debris celulares (asterisco) no lúmen de brônquio (HE. Obj. 20x). B- Observa-se grande quantidade de hifas intralésionais fracamente basofílicas em secções transversais e longitudinais (setas). Inset: vesícula de *Aspergillus* sp. recoberta por uma camada bisseriada composta por metulas e fiáides hialinas de paredes lisas que formavam fialoconídios globosos dispostos radiadamente (HE. Obj. 40x). C- Observam-se hifas impregnadas (GMS. Obj. 40x). D- Observam-se hifas com imunomarcagem do citoplasma em marrom (IHQ. Obj. 40x).

DISCUSSÃO

O diagnóstico de aspergilose pulmonar foi estabelecido com base nas características morfotintoriais do agente e confirmado por imuno-histoquímica. Fungos do gênero *Aspergillus*, possuem caráter oportunista, mas usualmente não são associados a infecções que ocasionem doenças em cães [3]. A imunossupressão desempenha, assim, importante papel na patogênese dessas infecções [1,3]. Nos cães, as principais causas de imunossupressão estão relacionadas ao uso prolongado de corticosteroides, antibioticoterapia prolongada, tratamentos quimioterápicos, neoplasias malignas, desnutrição, diabetes mellitus e infecções intercorrentes, particularmente pelo vírus da cinomose canina

[3]. No entanto, não constam no histórico clínico desse animal quaisquer condições que pudessem promover imunossupressão, tampouco foram observadas alterações morfológicas no exame patológico que sugerissem outras doenças intercorrentes.

É provável que o cão tenha sido exposto a inalação de grande quantidade de conídios por longo período de tempo, condição que favorece a ocorrência da doença, mesmo em animais imunocompetentes [3]. A inalação desses propágulos é a principal via de infecção por fungos do gênero *Aspergillus* [14].

Essa forma broncopulmonar da doença é considerada uma apresentação incomum [17]. Os sinais clínicos são inespecíficos e incluem febre, tosse, hemoptise, dispneia, descarga nasal mucopurulenta, inapetência e emagrecimento [1,9,10,16]. Nesse caso, provavelmente não foram evidenciados sinais clínicos respiratórios graves, que caracterizassem o comprometimento pulmonar, devido a curta evolução da doença. Foram observados sinais clínicos inespecíficos, leucograma condizente com resposta imunológica frente a processos infecciosos, e bioquímica sérica apresentando discreta azotemia que pode ser atribuída à desidratação, vista no exame clínico.

A reação inflamatória observada é considerada como típica de infecções fúngicas e, as características histomorfológicas e tintoriais do agente, foram determinantes para o diagnóstico. Hifas intralésionais septadas, com paredes paralelas, formando ângulos agudos, e medindo de 5-8 μm , às vezes apresentando conidióforos com vesícula (cabeça) aspergililar uni ou bisseriada com abundante formação de fialoconídios medindo 1.5-2 μm , são características de *Aspergillus* spp. [2,13]. Considera-se que os conidióforos e as vesículas aspergililares são formadas unicamente quando as hifas estão expostas a grande quantidade de oxigênio. Diante disso, o diagnóstico pode ser estabelecido com base na visualização dessas estruturas na histopatologia [13].

As áreas de necrose de coagulação observadas no miocárdio provavelmente são resultado de infartos agudos. O caráter angioinvasivo dos fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* promove lesão vascular e formação de trombos, que desprendem êmbolos, e cursam com isquemia e infarto em diferentes órgãos [13], com consequentes áreas de necrose de coagulação. Hipotetizamos que esses eventos no tecido miocárdico foram determinantes para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca aguda e morte do animal.

Broncopneumonias micóticas em cães são mais frequentemente causadas por fungos patogênicos primários, que podem ser diferenciados dos fungos oportunistas do gênero *Aspergillus*, por suas características histomorfológicas particulares. Desta forma, importantes diagnósticos diferenciais incluem: *Blastomyces dermatitidis*, cujas células da fase leveduriforme são esféricas e possuem contorno celular com dupla parede, brotamento em base larga e dimensões variando entre 8-30 µm [2, 11]; *Cryptococcus neoformans*, leveduras esféricas, com brotamento em base estreita de forma usualmente única, e dimensões variando entre 2-10 µm, além da espessura da capsula que pode ser de até 34,16 µm [11]; e os blastoconídios da fase leveduriforme do *Histoplasma capsulatum*, observados no interior de células do sistema monocítico fagocitário, possuem forma ovalada, com centro basofílico circundado por halo claro, e dimensões muito menores, de 2-4 µm [8]. Também devem ser incluídos nos diagnósticos diferenciais outros agentes que causam broncopneumonia piogranulomatosa em cães, como *Nocardia* spp. [15], *Acanthamoeba* sp. [5] e *Toxoplasma gondii* [4].

No Brasil, são raros os relatos de aspergilose em cães, tendo sido relatada a forma nasal [6] e a sistêmica [7]. Existindo poucos relatos na literatura científica mundial sobre essa forma broncopulmonar da doença [1,9,10,16].

Apesar de incomum, a aspergilose pulmonar deve ser considerada no diagnóstico diferencial de doenças que acometem o trato respiratório inferior de cães e as complicações sistêmicas resultantes das características angioinvasivas do fungo devem ser investigadas, pois neste caso foram determinantes para a morte do animal.

MANUFACTURERS

¹Bio-Rad Laboratories. Raleigh, NC, USA.

²Farmax. Divinópolis, MG, Brazil.

³Nestlé Brasil. São Paulo, SP, Brazil.

⁴EasyPath. São Paulo, SP, Brazil.

⁵Dako Brasil. São Paulo, SP, Brazil.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 Adamama-Moraitou K.K., Pardali D., Day M.J., Denning D.W., Papazoglou L., Papastefanou A. & Rallis T.S. 2011.** *Aspergillus fumigatus* bronchopneumonia in a Hellenic Shepherd dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 47(2): 13-18
- 2 Caswell J.L. & Williams K.J. 2016.** The Respiratory System. In: Maxie M.G. (Ed). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*. 5th edn. v.1. Philadelphia: Elsevier, pp.465-592.
- 3 Day M.J., Peeters D. & Clercx C. 2012.** Aspergillosis and Penicilliosis. In: Greene C.E. (Ed). *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th edn. St. Louis: Elsevier, pp.1354-1370.
- 4 Frade M.T.S., Maia L.A., Andrade R.L.F.S., Alves R.C., Yamasaki E.M., Mota R.A. & Dantas A.F.M. 2015.** Clinical, pathological, and immunohistochemistry characterization of toxoplasmosis in dogs with distemper in the semiarid region of Paraíba, Brazil. *Semina*. 36(6): 4251-4256.
- 5 Frade M.T.S., Melo L.F., Pessoa C.R.M., Araújo J.L., Figuera R.A., Souza A.P., Uzal F. & Dantas A.F.M. 2015.** Systemic acanthamoebiasis associated with canine distemper in dogs in the semiarid region of Paraíba, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 35(2): 160-164.
- 6 Ferreira R.R., Ferreira L., Spanemberg A., Driemeier D., Machado M.L.S., Bianchi S.P., Schmidt D. & Guillot J. 2011.** Canine Sinonasal Aspergillosis. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39(4): 1-6.
- 7 Figuera R.A., Souza T.M., Silva M.C., Brum J.S., Graça D.L., Kommers G.D., Irigoyen L.F. & Barros C.S.L. 2008.** Causas de morte e razões para eutanásia de cães da mesorregião do centro ocidental rio-grandense (1965-2004). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(4): 223-230.
- 8 Figuera R.A. & Graça D.L. 2014.** Sistema hematopoiético. In: Santos R.L. & Alessi A.C. (Eds). *Patologia Veterinária*. São Paulo: Roca, pp.337-422.
- 9 García M.E., Caro A., Fragió C., Blanco I. & Blanco J.L. 2001.** Clinical case of canine mycotic pneumonia. *Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*. 48(8): 501-506.
- 10 Kim S.H., Yong H.C., Yoon J.H., Youn H.Y., Yoshioka N., Kano R. & Hasegawa A. 2003.** *Aspergillus niger* pulmonar infection in a dog. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 65(10): 1139-1140.

- 11 **Lopez A. 2013.** Sistema respiratório, mediastino e pleuras. In: McGavin M.D. & Zachary J.F. (Eds). *Bases da Patologia Veterinária*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, pp.542-591.
- 12 **Peeters D. & Clercx C. 2007.** Update on canine sinonasal aspergillosis. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 37(5): 901-916.
- 13 **Perry J.J., Rech R.R., Camus M.S. & Howerth E.W. 2010.** Pathology in practice. Disseminated aspergillosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 236(2): 173-175.
- 14 **Quinn P.J., Markey B.K. & Carter M.E. 2005.** Gênero *Aspergillus*. In: Quinn P.J., Markey B.K, Carter M.E., Donnelly W.J. & Leonard F.C. (Eds). *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, pp.229-232.
- 15 **Ribeiro M.G. & Condas L.A. 2016.** Enfermidades pelo gênero *Nocardia*. In: Megid J., Ribeiro M.G. & Paes A.C. (Eds). *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia*. Rio de Janeiro: Roca, pp.199-211.
- 16 **Whitley N.T., Cauvin A., Burton C., Bray J., Van Dongen P. & Littlewood J. 2010.** Long term survival in two German shepherd dogs with *Aspergillus*-associated cavitary pulmonary lesions. *Journal of Small Animal Practice*. 51(10): 561-563.
- 17 **Zhang S., Corapi W., Quist E., Griffin S. & Zhang M. 2012.** *Aspergillus versicolor*, a new causative agent of canine disseminated aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 50(1): 187-191.