

Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos

[Chronic myocarditis in a dog naturally infected by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: clinical and pathological aspects]

R.S. Mendes¹, T.A. Gurjão², L.M. Oliveira¹, V.L. Santana¹, W.L. Tafuri⁴,
J.R.S. Santos¹, A.F.M. Dantas³, A.P. Souza³

¹Aluno de pós-graduação – Universidade Federal de Campina Grande – UFCG – Patos, PB

²Aluno de graduação – CSTR-UFCG – Patos, PB

³Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária – CSTR-UFCG – Patos, PB

⁴Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais – ICB-UFMG – Belo Horizonte, MG

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa crônica frequentemente fatal causada pela *Leishmania infantum chagasi* nas Américas. A enfermidade pode acometer vários órgãos, determinando diferentes manifestações clínicas. Contudo o envolvimento do coração raramente tem sido reportado em cães infectados por *Leishmania* sp. Dessa forma, descreve-se um caso de miocardite crônica com repercussões clínicas e patológicas em um cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi*. A positividade para Leishmaniose Visceral foi determinada pela presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. nos testes sorológicos (RIFI, ELISA e DPP) e confirmada por visualização de formas amastigotas de *Leishmania* sp. em punção aspirativa do linfonodo poplíteo. O exame cardiovascular revelou alterações radiográficas, eletrocardiográficas, na pressão arterial e nos biomarcadores cardíacos. Após eutanásia, amostras de tecido cardíaco foram avaliadas histologicamente e submetidas à imunomarcagem, onde foi observado infiltrado mononuclear (plasma-histiolinfocitário), com presença de estruturas arredondadas de coloração marrom-amareladas (imunomarcadas), indicando formas amastigotas de *Leishmania infantum chagasi* no miocárdio. Os aspectos etiopatogênicos da leishmaniose visceral sobre o miocárdio neste caso podem estar relacionados tanto à presença do parasita quanto à resposta “reacional inespecífica” do tecido à agressão do parasita no organismo. Todavia ainda não se sabem se as cepas de *Leishmania infantum chagasi* da região semiárida paraibana apresentam algum tropismo por tecido cardíaco ou se induzem a reação imunológica cruzada, com implicações clínicas.

Palavras-chave: cão, miocardite, *Leishmania infantum chagasi*, imuno-histoquímica, troponina I

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic, often fatal infectious disease caused by *Leishmania infantum chagasi* in the Americas. The disease can affect many organs and may express different clinical forms. However, the involvement of the heart has rarely been reported in dogs infected by *Leishmania* sp. Thus, we describe a case of chronic myocarditis with clinical and pathological effects in a dog naturally infected by *Leishmania infantum chagasi*. Positivity for Visceral Leishmaniasis was determined by the presence of anti-*Leishmania* sp. in serological tests (IFAT, ELISA and DPP) and confirmed by visualization of amastigote forms of the parasite in the popliteal lymph node aspiration samples. The cardiovascular clinical examination showed changes in the radiographic, ECG, blood pressure and heart biomarkers. After euthanasia, heart tissue samples were histologically examined and underwent our immunohistochemistry assessment, where mononuclear infiltrate was observed (plasma cells, lymphocytes and macrophages) with the presence of rounded brownish-yellow (immunomarked) cells, indicating amastigotes of *Leishmania infantum chagasi* within the myocardium. The etiopathogenic aspects of visceral leishmaniasis in the myocardium in this case may be related either to the presence of

Recebido em 5 de fevereiro de 2013

Aceito em 20 de agosto de 2013

E-mail: rodrigo.souza.mendes@gmail.com

the parasite or the "nonspecific reactive" response of the tissue attributable to the aggression of the parasite in the body. However, it is not known if the strains of Leishmania infantum chagasi found in the semi-arid of Paraíba have some tropism for cardiac tissue or if they induce immunological cross-reaction with clinical implications.

Keywords: dog, myocarditis, *Leishmania infantum chagasi*, immunohistochemical, troponin I

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma doença infecciosa crônica frequentemente letal, causada nas Américas pela *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* (*L. (L.) i. chagasi*) e transmitida pelo díptero *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi* (Missawa e Lima, 2006). O cão é o principal reservatório doméstico de *L. (L.) i. chagasi*, sendo o responsável pela manutenção desse agente em áreas endêmicas (Ashford, 1996). A leishmaniose canina pode acometer vários órgãos e, dessa forma, poderá apresentar características clínicas diferentes. Estas podem variar desde um aparente estado sadio até um estado grave, podendo evoluir para a morte (Moura et al., 2002). Durante a infecção, as formas promastigotas infectam células do sistema mononuclear fagocitário em vários órgãos, tais como fígado, rins, linfonodos, baço e pele (Ikeda et al., 2005). Contudo, a disseminação do parasita para órgãos não pertencentes a esse sistema, a exemplo do coração, tem sido reportada (Silva et al., 2009), em que um caso de cardiomegalia e lesões degenerativas e necróticas em átrio direito de cão foram atribuídas à *Leishmania* sp. pela presença de DNA no tecido analisado (Torrent et al., 2005). *L. (L.) i. chagasi* foi detectada também no coração dos filhotes de uma cadela gestante infectada (Rosypal et al., 2005). A presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. foi relatada em pericárdio de cão naturalmente infectado (Silva et al., 2009). No entanto, o envolvimento cardiovascular de cães portadores de leishmaniose visceral levantam vários questionamentos quanto ao seu mecanismo etiopatogênico e aos seus agravos com repercussões clínicas e patológicas, sendo legado ao estudo de tais evidências elevar questões que permitam elucidar a evolução patogênica da *Leishmania* sp. sobre tecidos cardíacos.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho descrever os aspectos clínicos e patológicos de miocardite crônica em um cão naturalmente infectado por *Leishmania infantum chagasi*.

CASUÍSTICA

Um canino, macho, sem raça definida, com quatro anos de idade, pesando 25kg, oriundo da zona rural do município de Patos, PB, positivo para Leishmaniose Visceral (LV), evidenciado em pesquisa epidemiológica na região pelos testes de imunofluorescência indireta (*Kit IFI – Calazar Canino Biomanguinhos*), ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay – Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina Biomanguinhos*) e Teste rápido – DPP (*Dual Path Platform – DPP/Leishmaniose Visceral canina – Biomanguinhos*), confirmada em análise citológica do aspirado do linfonodo poplíteo, foi submetido à avaliação clínica geral e patológica do sistema cardiovascular. Os exames complementares realizados incluíram: eletrocardiografia (ECG) (TEB – mod. ECGPC veterinário software versão 2.27), radiografia nas projeções laterolateral e ventrodorsal, aferição da pressão arterial sistólica/média/diastólica (PA – PAS/PAM/PAD) pelo método oscilométrico (DeltaMap®) e laboratoriais: hemograma, urinálise, dosagens séricas de ureia, creatinina, creatina-quinase (CK), ALT, AST, FA, Na⁺, K⁺ e dos biomarcadores cardíacos CK-MB e cTnI.

Em anamnese, realizada no ato do recolhimento do animal, não foram relatados sinais associados à insuficiência cardíaca congestiva (ICC), como tosse, cansaço e intolerância a exercício, mas apenas um episódio de desmaio, ocorrido aproximadamente dois dias antes do recolhimento do animal. O exame clínico revelou um animal ativo, bom estado geral, escore corporal normal, lesão ulcerada circunscrita (Ø ≈ 0,5cm) na ponte nasal, um discreto aumento dos linfonodos poplíteos, ausência de alterações na auscultação cardiopulmonar.

O exame radiográfico evidenciou cardiomegalia moderada, mais pronunciada do lado esquerdo (*Vertebral Heart Size – VHS: 12 vértebras*). Na eletrocardiografia, observaram-se ritmo sinusal, frequência cardíaca de 153bpm, presença de complexos ventriculares prematuros unifocais (5

CVP's/3min) e sobrecarga atrial e ventricular esquerda (P: 0,052 s; R: 2,62 mV; QRS: 0,062 s). Na aferição das pressões arteriais sistólica, média e diastólica (PAS/PAM/PAD), obteve-se 170/130/110mmHg, respectivamente, obtidas em sete aferições, descartando-se dos valores discrepantes e computando a média das demais. Laboratorialmente, observou-se anormalidade nos biomarcadores cardíacos cTnI: 0,22 ng/mL (0 - 0,07ng/mL) e CK-MB - 120,2 U/L (11 e 38,8 U/L) e CK: 553 U/L (20,0 - 220,0 U/L). Os demais exames realizados apresentaram-se dentro da normalidade.

Na sequência, o animal foi eutanasiado seguindo os preceitos bioéticos e de bem-estar animal preconizados pela resolução nº 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária. A necropsia foi realizada imediatamente após a eutanásia, sendo observada hipertrofia concêntrica moderada do ventrículo esquerdo (Fig. 1). Logo, fragmentos miocárdicos foram sistematicamente colhidos, abrangendo todas as câmaras e septos cardíacos. Em relação aos demais órgãos, observou-se macroscopicamente que apenas os linfonodos poplíteos estavam hipertrofiados.

As amostras do músculo cardíaco obtidas foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10% por 24 horas e depois desidratadas, clareadas, incluídas em parafina, clivadas (4-5µm de espessura) e coradas com hematoxilina e eosina (HE) ou tratadas para imunodeteção (IHQ) de *L. i. chagasi*. No processamento da IHQ, as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas com peróxido de hidrogênio a 4% (30v/v) em 0,01 M PBS, pH 7,2, seguindo-se incubação com soro de cabra saudável (diluição 1:100). Soro hiperimune de cães naturalmente infectados por *L. (L.) (i) chagasi* (diluição 1:100 em 0,01 M PBS) foi usado como anticorpos primários. As lâminas foram incubadas por 18-22 horas a 4°C em câmara úmida e depois lavadas em PBS. Logo, as lâminas foram incubadas com anticorpo biotilado de cabra anticoelho e anticamundongo (Link - DAKO, LSAB2, kit, California, EUA), lavadas novamente em PBS e incubadas com o complexo Estreptavidina-

Peroxidase (Link - DAKO, LSAB2, kit, California, EUA) por 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi revelada pela diaminobezidina a 0,024% e peróxido de hidrogênio a 0,16% (40 v/v). Finalmente as lâminas foram desidratadas, clareadas e contracoradas com Hematoxilina de Harris' (Tafari *et al.*, 2004). No exame destas, observou-se infiltrado inflamatório focal do miocárdio da parede livre do ventrículo esquerdo em nível de M. papilar, com discreta extensão do epicárdio ao endocárdio, constituído por plasmócitos, macrófagos e linfócitos (plasmohistiocitário), com presença de estruturas arredondadas de coloração marrom-amarelada (imunomarcadas), indicando formas amastigotas de *Leishmania infantum chagasi* (Fig. 2). Tais achados revelaram um quadro de miocardite crônica em cão portador de Leishmaniose visceral.

DISCUSSÃO

O envolvimento cardíaco em casos de leishmaniose visceral em cães é muito controverso quanto ao mecanismo patológico envolvido. Autores relatam várias possíveis evidências clínicas e patológicas de miocardite, embora alguns apontem ausência de comprometimento cardíaco (Shimabukuro e Silva, 2009). Outros fazem referência à "reatividade inespecífica do miocárdio" frente ao quadro infeccioso determinado pela *Leishmania* (Morais *et al.*, 1988), o que não fundamenta uma patogênese inerente.

Neste caso, o quadro patológico miocárdico evidenciado, além de estar de acordo com as evidências histopatológicas de comprometimento cardíaco em cães com LV descritas por outros autores (Torrent *et al.*, 2005; Ferrari *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009), apresenta estreita correlação com as alterações clínicas cardíacas observadas. No entanto, não é possível inferir categoricamente o mecanismo envolvido no comprometimento cardíaco em questão, diante da condição vigente.

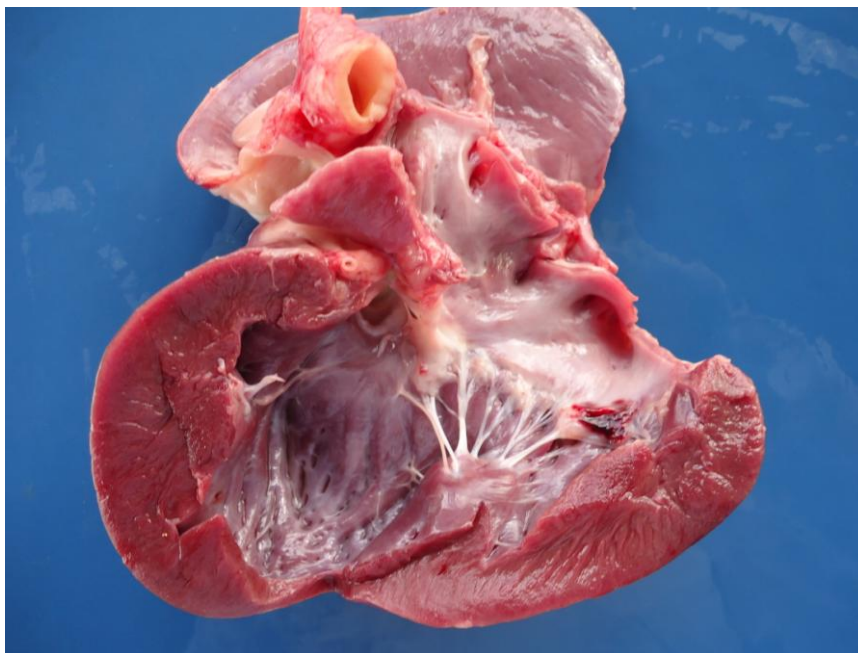


Figura 1. Secção longitudinal do ventrículo esquerdo do coração de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum chagasi*, revelando hipertrofia concêntrica.

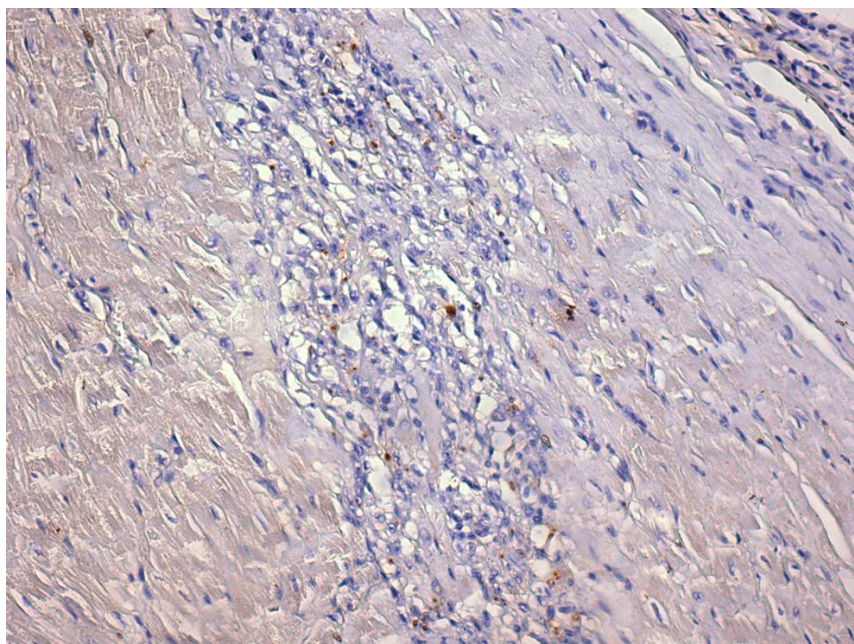


Figura 2. Fragmento de miocárdio de cão naturalmente infectado com *Leishmania infantum chagasi*. No centro da figura, observar foco inflamatório crônico de células mononucleares substituindo as fibras miocárdicas (miocardiócitos), com presença de estruturas arredondadas de coloração marrom-amarelada (imunomarcadas), indicando formas amastigotas de *Leishmania infantum chagasi*. Coloração Imuno-histoquímica pelo Método da Estreptoavidina-Peroxidase. Contracoloração pela Hematoxilina de Harris. 220x. (Objetiva de 20x = o aumento final seria ocular x objetiva = 220x).

Os focos ectópicos ventriculares registrados no ECG, bem como as demais alterações, podem estar relacionados à presença de formas amastigotas de *Leishmania infantum chagasi* no tecido miocárdico, seja por ação direta ou “reacional” (Morais *et al.*, 1988), determinando manifestações intermitentes de fenômenos de reentrada de origem ventricular esquerda ou formação anormal do impulso elétrico. Ainda no que se refere ao ECG, o desmaio citado na anamnese pode ter sido decorrente de episódios intermitentes de taquicardia ventricular; entretanto, tal condição só poderia ser relacionada a essa hipótese com a realização de monitoramento eletrocardiográfico contínuo. A condição hipertensiva e frequência cardíaca próxima do limite máximo referencial podem estar relacionadas à ativação de mecanismos compensatórios iniciais como a liberação de catecolaminas, decorrentes do possível comprometimento contrátil do miocárdio devido ao quadro inflamatório/infeccioso. Tais achados corroboram o episódio de síncope citado anteriormente.

Nesse contexto, a presença de elevada concentração de biomarcadores cardíacos na circulação, em destaque a troponina I cardíaca (cTnI), reforça a hipótese de comprometimento miocárdico, com consistente indício de injúria de cardiomiócito, neste caso, determinado pelo rompimento de proteínas contráteis intracelulares ou por aumento da permeabilidade do miócito com liberação da troponina livre presente no citosol (Collinson *et al.*, 2001). O aumento da atividade sérica do CK-MB é reportado em cães com comprometimento miocárdico, principalmente em condições de hipóxia instalada, em que ocasiona instabilidade e altera a permeabilidade da membrana dos miócitos, acarretando o aumento da enzima no soro (Pino *et al.*, 2008). A elevação do CK-MB, mesmo sendo inespecífica como marcador de injúria miocárdica, em decorrência da sua liberação em lesões musculares, quando associada a outros exames de caráter cardiovascular e a outros biomarcadores de processos patológicos, como o cTnI, como descrito neste relato, auxiliam com maior acurácia e em menor tempo o diagnóstico clínico de doença cardíaca, estabelecendo prognóstico e direcionamento terapêutico

(Yonezawa *et al.*, 2010). Portanto, alterações atribuídas ao coração lesado devem ser consideradas como possíveis complicações em cães com leishmaniose visceral, principalmente aqueles a serem submetidos a tratamento com fármacos antimoniais. Isso porque o uso de tais substâncias, aliado à existência de lesões cardíacas inerentes à patogênese da leishmaniose visceral, poderia exacerbar a cardiopatia prévia ou predispor a essa condição devido ao seu efeito cardiotoxico, apesar da sua excelente eficácia (Shimabukuro e Silva, 2009).

No que se refere aos aspectos etiopatogênicos da leishmaniose visceral sobre o miocárdio, neste relato assume um caráter inconclusivo, não sendo possível atribuir, de fato, o mecanismo patológico que determinou tais condições clínicas e patológicas. Entretanto, alterações imunológicas podem ser responsáveis pelo elevado número de parasitos encontrados em órgãos linfáticos, o que permite a multiplicação e disseminação para outros órgãos, inclusive o coração (Shimabukuro e Silva, 2009), haja vista a condição de envolvimento multissistêmico não ter sido observada clinicamente neste estudo. Verifica-se, assim, a necessidade de se estudar a possibilidade de as cepas de *Leishmania infantum chagasi* da região semiárida paraibana apresentarem algum tropismo por tecido cardíaco ou se induzem a reação imunológica cruzada, com implicações clínicas.

CONCLUSÕES

Conclui-se que cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum chagasi* podem desenvolver alterações cardíacas com repercussões clínicas e patológicas, sendo que tal envolvimento pode estar relacionado à ação direta ou “reacional” do tecido à agressão do parasita.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

REFERÊNCIAS

- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermat.*, v.14, p.523-532, 1996.
- COLLINSON, P.O.; BOA, F.G.; GAZE, D.C. Measurement of cardiac troponins. *Ann. Clin. Biochem.*, v.38, p.423-449, 2001.
- FERRARI, H.F.; RIBEIRO, D.; LUVIZOTTO, M.C.R. Miocardite Associada a *Leishmania* sp em cão – Relato de caso. In: 1º FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal: [s.n.] 2006. p.48. (Resumo).
- IKEDA, F.A.; FEITOSA, M.M.; CIARLINI, P.C. et al. Criptococose e toxoplasmose associadas à leishmaniose visceral canina – relato de casos. *Rev. Clin. Vet.*, v.3, p.28-32, 2005.
- MISSAWA, N.A.; LIMA, G.B.M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.39, p.337-340, 2006.
- MORAIS, C.F.; DUARTE, M.I.S.; CORBETT, A.E.P.; REIS, M.M. Alterações morfológicas cardíacas no curso da leishmaniose visceral humana. Estudo baseado em 16 casos de necropsia. *Arq. Bras. Card.*, v.51, p.441-445, 1988.
- MOURA, R.O.D.; PAULA, V.V.; SOARES, M.J.V.; SILVA, S.M.M.S. Alterações renais em cães (*canis familiaris*) soropositivos para leishmaniose: aspectos clínicos, laboratoriais e histopatológicos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.24, p.61-64, 2002.
- PINO, V.O.; LI, E.O.; ALVARADO, S.A. et al. Determinación de los niveles séricos de enzimas cardíacas em perros adultos com enfermedad cardiovascular. *Rev. Investig. Vet. del Per.*, v.19, p.144-147, 2008.
- ROSYPAL, A.C.; TROY, G.C.; ZAJAC, A.M. et al. Transplacental transmission of North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *Parasitol.* v.91, p.970-972, 2005.
- SHIMABUKURO, A.M.; SILVA, J.M. *Histopatología do coração de hamsters experimentalmente infectados com Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2009. 11f. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC 2008/2009), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Santa Maria.
- SILVA, B.C.; RACHID, M.A.; VIEIRA, F.G. et al. Chronic pericarditis in a naturally *Leishmania (Leishmania) chagasi* infected dog. *Bras. J. Vet. Pathol.*, v.2, p.107-109, 2009.
- TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E. et al. An alternative immunohistochemical method for detection *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immun. Meth.*, v.298, p.17-23, 2004.
- TORRENT, E.; LEIVA, M.; SEGALÉS, J. et al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *J. Small Anim Pract.*, v.46, p.549-52, 2005.
- YONEZAWA, L.A.; SILVEIRA, V.F.; MACHADO, L.P.; KOHAYAGAWA, A. Marcadores cardíacos na medicina veterinária. *Cienc. Rural (online)*, v.40, p.222-230, 2010.