

APOPTOSE E MORFOMETRIA DAS LESÕES GRANULOMATOSAS INDUZIDAS PELO *Angiostrongylus vasorum* EM CÃES

APOPTOSIS AND MORPHOMETRY OF THE GRANULOMATOUS LESIONS INDUCED BY THE *Angiostrongylus vasorum* IN DOGS

Reane Fonseca MARTINS¹; Anilton César VASCONCELOS²; Luciana MORO³;
José Osvaldo COSTA⁴

1. Mestre em Patologia Geral, Laboratório de Apoptose, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Caixa Postal 248631270-010 – Belo Horizonte, MG, Brasil. ; 2. Professor, PHD em Patologia Comparada, Laboratório de Apoptose, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Caixa Postal 2486,31270-010 – Belo Horizonte, MG, Brasil; 3. Doutora em Patologia Geral, Laboratório de Apoptose, Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Caixa Postal 2486,31270-010 – Belo Horizonte, MG, Brasil, , 4. Doutor em Ciência Animal, Departamento de Medicina Preventiva- Escola de Veterinária da UFMG.

RESUMO: *O Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) é um nematódeo da família Protostrongylidae que habita o átrio e o ventrículo direitos, e artéria pulmonar de cães domésticos e de outras espécies de Canídeos em diversos continentes. A angiostrongilose induz a formação de granulomas de composição e volume variáveis nas diferentes fases do processo nos pulmões e em vários órgãos nos animais acometidos. Fragmentos de pulmão embebidos em parafina e obtidos de 12 animais sem raça definida, infectados experimentalmente com larvas de *A. vasorum*, foram seccionados a 5 µm. Os cortes foram corados em hematoxilina e eosina e analisados ao microscópio óptico. As lesões foram classificadas em leves, moderadas e intensas de acordo com a história clínica e o aspecto morfológico dos tecidos. Foram analisados os seguintes parâmetros morfológicos: área dos granulomas, número de larvas/ovos por área e ocorrência de apoptose nos granulomas e em células gigantes. Os resultados obtidos revelaram que o aumento do número de larvas/ovos é diretamente proporcional ao aumento da área e ao agravamento da lesão – e inversamente proporcional ao índice apoptótico; as células gigantes eram em maior número em lesões moderadas e, quando presentes, grande parte delas apresentavam núcleos com morfologia de apoptose, sugerindo que estas possam ter um tempo de vida curto.

PALAVRAS-CHAVES: Apoptose. *Angiostrongylus vasorum*. Granuloma. Inflamação.

INTRODUÇÃO

O *Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866) Kamensky, 1905 é um nematelminto que pode ser encontrado nas artérias pulmonares e átrio e aurícula direitos de cães.

As lesões nos órgãos parasitados são determinadas por fatores mecânicos e imunológicos. A obstrução e a irritação dos ramos arteriais de menor calibre causadas por larvas e ovos, induzem à inflamação focal, inicialmente, a inflamação, exsudativa, evoluindo para a forma granulomatosa com alta reatividade celular (COSTA, 1992). Os granulomas freqüentemente apresentam células gigantes multinucleadas (CGM) (COSTA; TAFURI, 1997).

A apoptose participa na modulação da resposta inflamatória, sendo importante na resolução do processo (LILES, 1997; SAVILL, 1997). Nos granulomas esquistosomóticos de fígado de camundongo a apoptose diminui a celularidade da reação inflamatória granulomatosa e conseqüentemente reduz a área do granuloma,

participando na aquisição de tolerância imunológica (TRISTÃO et al., 2000).

O interesse pelo gênero *Angiostrongylus* vem aumentando nos últimos anos, devido à contaminação de hospedeiros acidentais, como o Homem. O exemplo mais recente inclui, o atleta brasileiro de corrida de aventura, Alexandre Freitas, que se contaminou com *A. cantonensis* durante uma competição em outubro de 2002 nas Ilhas Fiji, resultando em meningoencefalite eosinofílica (NORTH ECO-ADVENTURES, 2003). Já existem referências sobre o envolvimento da apoptose na modulação da resposta inflamatória na meningoencefalite eosinofílica causada pelo *A. cantonensis* (CHUANG; CHEN, 2007; SUGAIA et al., 2001). Entretanto ainda não se estudou o papel da apoptose nos granulomas induzidos pela angiostrongilose nos cães. Por esta razão pretende-se, neste estudo, avaliar a ocorrência de apoptose em diferentes graus de lesões granulomatosas induzidas pela angiostrongilose canina e correlacionar estes dados com a área dos granulomas, o número de

larvas/ovos por área e o grau de lesão do órgão (leve, moderada e intensa).

MATERIAL E MÉTODOS

Doze cães recém desmamados, sem raça definida, foram infectados experimentalmente com 50 larvas/kgpv. A necropsia foi realizada num intervalo de tempo de 30 dias a dois anos de inoculação, quando foram colhidos fragmentos de pulmão, fixados em formol tamponado a 10% e processados segundo técnica para inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados a 4µm e os cortes corados em hematoxilina-eosina verde de metila - pironina - MGP, Giemsa, Tricrômico de Masson e Tricrômico de Gomori. O material foi analisado ao microscópio óptico e as lesões foram classificadas segundo o padrão morfológico em: [a] leves (poucos granulomas, distribuição focal, comprometendo pequena área do parênquima) – 3 animais; [b] moderadas (número maior de granulomas bem delimitados, distribuição multifocal, comprometendo área maior do parênquima) – 5 animais e [c] intensas (coalescência dos granulomas, distribuição mais difusa, comprometendo amplas áreas do parênquima) – 4 animais.

De cada grupo, foi contado o número médio de larvas e ovos/campo/lâmina, mensurada a área dos granulomas, verificada a presença de CGM e a existência de núcleos em apoptose em cortes corados em HE.

As imagens foram geradas por um microscópio conectado a uma câmera e transferidas para uma placa digitalizadora no computador onde se fazia a morfometria utilizando um programa específico de análise de imagens.

Utilizou-se a técnica de TUNEL (GAVRIELI et al., 1992) para identificação *in situ* da fragmentação do DNA segundo como um método qualitativo para a confirmação da apoptose.

O índice apoptótico foi determinado pelo somatório do número de células apoptóticas vezes 100, dividido pelo número total de células no campo.

Os dados obtidos foram analisados pelos programas GraphPad Prism versão 3.0 e Microsoft® Excel 97 Para a análise da morfometria (área média dos granulomas/campo/lâmina; do número médio de larvas e ovos/campo/lâmina), os dados foram inicialmente testados quanto à normalidade e posteriormente submetidos ao teste *t de Student*. Quando não houve pareamento e a distribuição não

foi normal, utilizou-se os teste não paramétricos de Tukey e o de comparação múltipla de Dunn (índice apoptótico).

RESULTADOS

À microscopia óptica pôde-se constatar a presença de ovos e larvas do parasito distribuídos no parênquima pulmonar, suscitando resposta inflamatória crônica granulomatosa. A intensidade da lesão foi classificada como: [a] leve – 3 cães, [b] moderada – 5 cães e [c] intensa – 4 cães (Figura 1a, 1b, e 1c respectivamente).

Nas lesões leves havia discreta pneumonia granulomatosa sendo que extensas áreas de parênquima pulmonar estavam preservadas. Observavam-se poucos granulomas ainda em fase inicial de formação, bem delimitados, em cuja porção central estavam presentes ovos ou larvas. Havia hiperemia, extensas áreas de hemorragia, hemossiderófagos em grande quantidade e endarterite obliterante. Na luz dos bronquíolos, observava-se a presença de exsudato contendo células descamadas, hemácias, neutrófilos, macrófagos e larvas do parasito. A pleura também continha larvas e, em alguns casos, apresentava-se com espessura aumentada.

Nas lesões moderadas era evidente a extensão da pneumonia intersticial granulomatosa com destruição do parênquima e diminuição da área funcional. Havia espessamento de septos alveolares e pleura e intensa hiperemia. Os granulomas eram volumosos, bem delimitados, a maioria apresentava-se circundada por tecido conjuntivo e alguns continham necrose central. Alguns granulomas se encontravam coalescidos. Havia trombos recentes em algumas arteríolas e observava-se presença de endarterite obliterante. Eram evidentes extensas áreas de hemorragia e observou-se exsudato contendo células descamadas, hemácias, neutrófilos, macrófagos e larvas do parasito no interior de brônquios e bronquíolos.

Nas lesões intensas a fibrose e a pneumonia granulomatosa eram tão extensas que havia perda da arquitetura do órgão. Os granulomas encontravam-se totalmente coalescidos. Observou-se a presença de trombos canalizados contendo parasito adulto e ovos, no interior de artérias.

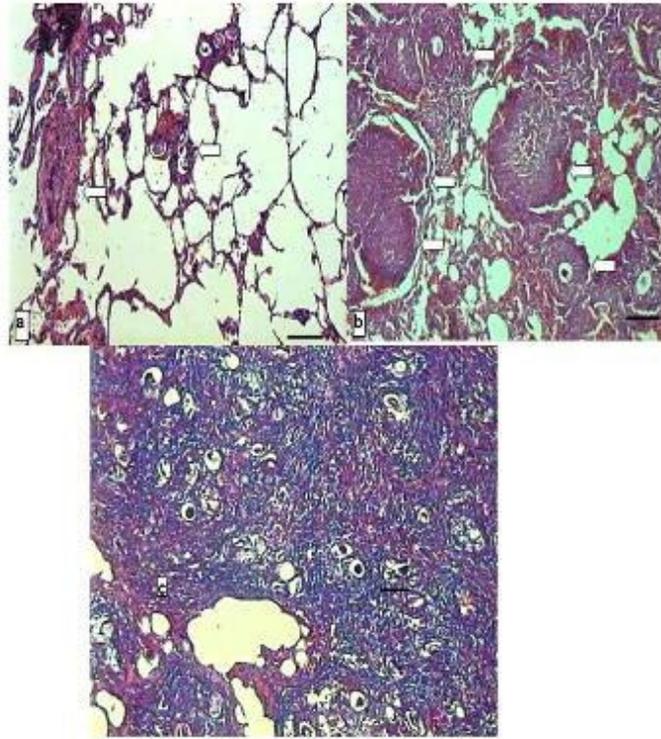


Figura 1. Micrografia de pulmão: **a)** Lesão leve - observa-se processo inflamatório multifocal constituído de poucos granulomas (setas) comprometendo pequena área do parênquima. **b)** Lesão do tipo moderada - observa-se processo inflamatório multifocal constituído de vários granulomas bem delimitados (setas), comprometendo maior extensão de parênquima. **c)** Lesão do tipo intensa - observa-se processo inflamatório difuso constituído de vários granulomas coalescidos, comprometendo grande extensão de parênquima. (132X, HE, Barra=100 μ m).

Para análise do número médio de larvas e ovos/campo/lâmina a coloração que melhor evidenciou os parasitos no tecido pulmonar foi a HE. Observou-se que há diferença estatística significativa entre o número de larvas/ovos e a área

do granuloma entre os diferentes tipos de lesão (Tabela 1). Assim, o número médio de larvas/ovos e a área média dos granulomas foram maiores nas lesões do tipo intenso e moderado.

Tabela 1. Sumário numérico das análises morfométricas (Número médio de larvas e ovos, Área total média dos granulomas e Índice Apoptótico) por grau de lesão

Grau de lesão	Número médio de larvas e ovos	Área media dos granulomas (μm^2)	Índice Apoptótico (Medianas)
Leve	1,646 ^c	93810 ^b	11,07 ^a
Moderado	8,460 ^b	2132000 ^a	12,11 ^a
Intenso	10,78 ^a	2169000 ^a	12,51 ^a

Médias ou medianas para o mesmo parâmetro com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas. (Probabilidade de erro < 0,05). Contingência obtida através de teste t de Student (Número médio de larvas e ovos; Área media dos granulomas) e o teste de Tukey e comparação múltipla de Dunn (Índice Apoptótico).

Para a quantificação de células em apoptose nos granulomas, foi utilizada a coloração de HE. Foram consideradas como apoptóticas aquelas células que se encontravam retraídas, apresentando halo claro ao redor, com núcleos retraídos e/ou fragmentados, com cromatina condensada, às vezes disposta na periferia formando crescentes. Visualizou-se também a presença de corpos apoptóticos (Figura 2). Através da coloração de TUNEL foi confirmada a presença de apoptose nos cortes das diferentes lesões.

Células gigantes multinucleadas (CGM) foram encontradas nos granulomas: iniciais (lesões leves); nos maduros e bem delimitados (lesões moderadas) e nos volumosos e coalescidos (lesões intensas). Nas lesões discretas (granulomas iniciais), as CGM estavam presentes em apenas uma amostra. Já nas lesões moderadas e intensas, as CGM estavam sempre presentes sendo que grande parte delas continham núcleos com morfologia sugestiva de apoptose (Figura 2).

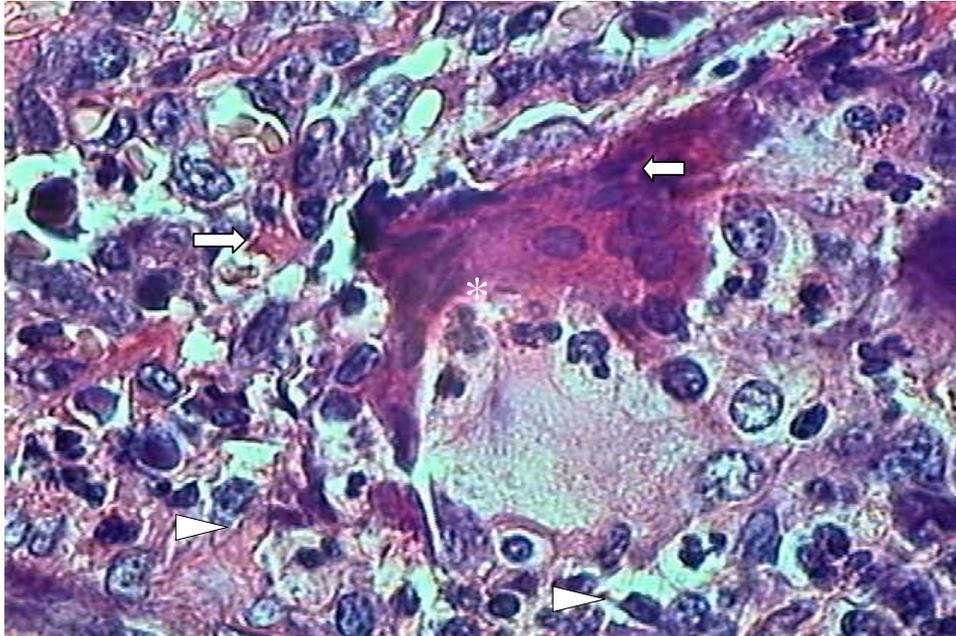


Figura 2. Micrografia de pulmão corado por HE - observar a presença de célula gigante multinucleada (asterisco branco) com núcleos apoptóticos (setas vermelhas) e no granuloma (setas amarelas) (330X, Barra = 10 μ m).

O teste não paramétrico de Tukey e a comparação múltipla de Dunn para os índices apoptóticos mostrou não haver diferença significativa entre os diferentes graus de lesão (Tabela 1).

DISCUSSÃO

A abordagem morfométrica empregada no trabalho para a avaliação das lesões da angiostrongilose canina é inédita. A literatura normalmente traz descrições de casos clínicos após infecção natural. Conseqüentemente, a descrição de lesão do tipo leve ou discreta (inicial) não é normalmente documentada. É mais freqüente o relato de processos mais crônicos como aqueles descritos por Dungworth (1993) que coadunam com

padrões de lesão do tipo moderado e intenso, descritos no presente trabalho.

Para duas das variáveis estudadas (o número médio de larvas/ovos e a área média dos granulomas), os resultados do teste *t de Student* mostraram diferenças significativas tanto para o número de larvas/ovos quanto para a área dos granulomas entre os três graus de lesões avaliados. Observou-se que quanto maior era o número de larvas/ovos, mais intensa era a lesão.

Assim, as lesões de grau leve apresentam granulomas com área menor. A formação de granulomas requer a migração de células inflamatórias mononucleares para o tecido e subseqüentemente a organização dessas células a fim de circunscrever o agente agressor. A função do granuloma é isolar o agente agressor impedindo sua

disseminação, podendo inclusive eliminar o patógeno.

Prestwood et al (1981) relacionou o período pós-infecção com dados histopatológicos e observou que com o avançar do tempo, os granulomas coalesciam e se transformavam em grandes massas resultando no aumento da área do granuloma. No presente trabalho, as lesões intensas apresentam essas características, com maiores áreas de necrose e fibrose mais pronunciada, sugerindo que a infecção, nesses casos, fosse mais antiga. Quando a resposta celular é exacerbada em consequência de mais necrose, pode ocorrer ampla fibrose - o que diminui a área de parênquima funcional. A ampla fibrose acompanhada de redução da área funcional foi observada principalmente nas lesões do tipo intensa e foi citada por outros autores em casos de infecção natural pelo *A. vasorum* (GIOVANNONI et al., 1985; POLI et al., 1991; DUNGWORTH, 1993). Fatores que poderiam interferir na evolução e modulação da resposta inflamatória nestas circunstâncias e que não puderam ser avaliados no presente estudo incluem a ocorrência ou não de re-infecção, o tempo decorrido após a infecção experimental, o efeito de diferentes cargas infectantes na evolução das lesões e diferentes subpopulações de linfócitos (T_{H1} e/ou T_{H2}).

As áreas de necrose observadas no centro de alguns granulomas nas lesões intensas pareciam resultar da perda de homeostase da resposta inflamatória, na tentativa de se combater o parasito. É interessante salientar, entretanto, que estas lesões do tipo intensas apresentaram índices apoptóticos similares aos das lesões moderadas e leves,

sugerindo que a apoptose parece não ser importante na modulação da resposta inflamatória nesta parasitose. O menor controle homeostático da resposta inflamatória pelo hospedeiro a despeito de índices apoptóticos similares gera reações menos reguladas e mais heterogêneas no grupo das lesões do tipo intensas, o que contribui para o infiltrado inflamatório mais disperso no tecido.

Com o aumento do número de ovos/larvas no tecido estimulando mais reação inflamatória observa-se o agravamento da lesão, ainda que nas lesões mais intensas a dificuldade de se distinguir as larvas e os ovos em meio à intensa resposta inflamatória foi patente (Tabela 1). Conseqüentemente, o processo se autopropetua e os granulomas aumentam de volume.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a apoptose ocorre na angiostrongilose pulmonar canina e não se associa à intensidade das lesões causadas por este parasito; quanto maior o número de larvas /ovos, maior a área do granuloma e maior a gravidade das lesões na angiostrongilose canina; nas lesões intensas, a coalescência dos granulomas, a necrose no centro dos mesmos e o acometimento de extensas áreas do parênquima sugerem menor modulação da resposta inflamatória, apesar de não significarem menor ocorrência de apoptose; a presença de núcleos em apoptose nas células gigantes multinucleadas, mais evidentes nas lesões moderadas, podem indicar que estas possam ter um tempo de vida menor.

ABSTRACT: *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) is a nematode of the Protostrongylidae family that inhabits the right side of the heart and the pulmonary artery of domestic dogs and other Canidea in different continents. Angiostrongylosis induces granuloma formation with variable volume and composition in different phases in lungs and in other organs. Lung fragments embedded in wax obtained from 12 mongrel dogs experimentally infected with larvae of *A. vasorum* were sectioned and stained with Hematoxyline Eosine and analyzed at light microscopy. Lesions were classified in mild, moderate and severe according to clinical history and morphological aspect. The following morphometric parameters were analyzed: granuloma area, number of larvae/eggs per area and apoptosis in granulomas and inside giant cells. Increase of number of larvae/eggs was proportional to increase in area and in intensity of the inflammatory reaction and to decrease in apoptosis. Giant cells were more frequent in moderated lesions and, when visible, most presented condensed or fragmented nuclei with evidence of apoptosis. Apoptosis were less frequent in severe lesions, when granulomas were the largest. It is possible that giant cells have a short life in angiostrongylosis.

KEYWORDS: Apoptosis. *Angiostrongylus vasorum*. Granuloma. Inflammation

REFERÊNCIAS

COSTA, J. O. *Angiostrongylus vasorum* (BAILLET, 1866) KAMENSKY, 1905: **Considerações taxonômicas e patológicas e de diagnóstico imunológico (ELISA) em cães experimentalmente infectados.** Belo Horizonte, 1992. Tese (Doutorado em Veterinária) Escola de Veterinária - UFMG. 136 p.

- COSTA, J. O.; TAFURI, W. L. Estudo anátomo-patológico de cães infectados experimentalmente pelo *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 49, n. 4, p. 389-407, 1997.
- CHUANG, C. C., CHEN C. W., et al. "Angiostrongylus cantonensis: apoptosis of inflammatory cells induced by treatment with mebendazole or/and interleukin 12 in mice." **Exp Parasitol.** v. 115 n. 3, p. 226-32. 2007
- DUNGWORTH, D. L. The respiratory system. In: JUBB, K. V. F., KENNEDY, P. C., PALMER, N. Pathology of domestic animals, 4. ed. San Diego: **Academic Press**, v. 2, p. 539-699, 1993.
- GAVRIELI, Y; SHERMAN, Y; BEN-SASSON, SA Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J. Cell Biol.**, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992
- GIOVANNONI, M.; FERNANDEZ, B. F.; KAVINSKI, L. C. Angiostrongilose do cão. **Arq. Biol. Tecnol.**, Paraná, v. 28, n. 4, p. 601-604, 1985.
- MURAL, NORTH ECO -ADVENTURES. Desenvolvido por Elias Luiz, 2003. Apresenta informações sobre corridas de aventura. Disponível em: <<http://www.northbrasil.com.br/script/mural/>>. Acesso em: 6/01/2004.
- LILES, W. C. Apoptosis – role in infection and inflammation. **Curr. Opin Infect. Dis.**, v. 10, p. 165-170, 1997.
- POLI, A., ARISPICI, M., MANCIANTI, F., ABRAMO, F. Pathology of naturally acquired *Angiostrongylus vasorum* infection in the red fox (*Vulpes vulpes*). **Angew Parasitol.** V. 32, p. 121-126, 1991.
- PRESTWOOD, A. K., GREENE, C. E., MAHAFFEEY, E. A.; BURGESS, D. E. Experimental Canine Angiostrongylosis: I. Pathologic Manifestations. **J. Am. An. Hosp. Assoc.** V. 17, p. 491-7, 1981.
- SAVILL, J. Apoptosis in resolution of inflammation. **J. Leukoc Biol.** v. 61, p. 375-80, 1997.
- SUGAYA, H., ABE T., et al. "Eosinophils in the cerebrospinal fluid of mice infected with *Angiostrongylus cantonensis* are resistant to apoptosis." **Int J Parasitol.** v. 31 n. 14 p. 1649-58. 2001
- TRISTÃO, A. R., MELO, A. L., VASCONCELOS, A. C., GROSSI, F. M. Apoptose na modulação resposta inflamatória aos ovos do *Schistosoma mansoni*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 52, n. 6, p. 586-591, 2000.