

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Utilização de extrato hidroalcoólico e óleo essencial de *Origanum vulgare* com associações no tratamento da esporotricose experimental por *Sporothrix brasiliensis***

**Caroline Bohnen de Matos**

Pelotas, 2018

**Caroline Bohnen de Matos**

**Utilização de extrato hidroalcólico e óleo essencial de *Origanum vulgare* com associações no tratamento da esporotricose experimental por *Sporothrix brasiliensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Marlete Brum Cleff

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

M425u Matos, Caroline Bohnen de

Utilização de extrato hidroalcoólico e óleo essencial de *Origanum vulgare* com associações no tratamento da esporotricose experimental por *Sporothrix brasiliensis* / Caroline Bohnen de Matos ; Marlete Brum Cleff, orientadora. — Pelotas, 2018.

64 f.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Esporotricose. 2. Extratos vegetais. 3. *Origanum vulgare*. 4. Ação antifúngica. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Título.

CDD : 636.80896969

Caroline Bohnen de Matos

Utilização de extrato hidroalcoólico e óleo essencial de *Origanum vulgare* com associações no tratamento da esporotricose experimental por *Sporothrix brasiliensis*

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 23/07/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr.<sup>a</sup> Marlete Brum Cleff  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cláudia Giordani  
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas - UFPel

Prof. Dr. Rogério Antônio Freitag  
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

Prof. Dr. Eliza Simone Viégas Sallis  
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria - UFSM

**Aos meus pais, meu marido e minha filha.**

## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais Odilon e Vera, por estarem presentes não só neste momento, mas em toda a minha vida. Não tenho palavras que expressem meu amor e agradecimento por vocês.

Ao meu companheiro, Emanuel, agradeço por se mostrar um grande amigo, companheiro, pelo amor, carinho, paciência, compreensão e incentivo em todos os momentos.

Aos amigos, colegas e professores do Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária UFPel (MicVet-UFPel), em especial ao professor Mário Carlos Araújo Meireles e a professora Renata Osório de Faria, pelos ensinamentos e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho, bolsistas, estagiárias e funcionários.

Ao Fitopeet (Grupo de pesquisa, ensino e extensão em produtos naturais na clínica médica veterinária) pela amizade, apoio, ensinamentos e boas risadas.

À minha orientadora e amiga, Marlete Brum Cleff (Eme), meu muito obrigada pela confiança, incentivo, compreensão e ensinamentos em todos os momentos.

Às minhas amigas, Karinitcha, Cris e Claudinha pelo companheirismo, amizade, ajuda nos momentos difíceis, conversas, trabalhos e principalmente pelos momentos de diversão e risadas que passamos juntas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos, e aos demais órgãos financiadores CNPq e FAPERGS. Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, a todos professores, alunos e servidores da Faculdade de Veterinária.

Agradeço por último, mas não menos importante, aos animais, que são a razão pela qual escolhi esta profissão.

*“Há poucos homens capazes de prestar homenagem ao sucesso de um amigo,  
sem qualquer inveja.”  
Ésquilo*

## Resumo

MATOS, Caroline Bohnen de. **Utilização de extrato hidroalcoólico e óleo essencial de *Origanum vulgare* com associações no tratamento da esporotricose experimental por *Sporothrix brasiliensis*.** 2018. 62f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A busca por novos fármacos com ação antimicrobiana tem sido extensivamente estudada em especial com extratos vegetais, entretanto, a pesquisa da ação destas frente a fungos ainda é escassa. Dentre as micoses de importância em saúde pública, a esporotricose tem emergido nos últimos anos como uma importante doença zoonótica em grandes centros urbanos, acometendo gatos, cães e humanos. O tratamento desta micose é realizado com a administração diária de antifúngicos, em especial o itraconazol, que é considerado o fármaco de eleição tanto para animais como para humanos. Entretanto, os princípios ativos com ação nos fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, disponíveis comercialmente, são restritos. Neste sentido, verifica-se a necessidade de outras opções terapêuticas para o tratamento da esporotricose. Dessa forma, a atividade *in vitro* de plantas demonstrada por estudos preliminares com isolados do complexo *Sporothrix schenckii* impulsionaram a realização do presente estudo visando determinar a atividade *in vivo* dos extratos vegetais de *Origanum vulgare* para o tratamento da esporotricose cutânea experimental. Para isso, foram utilizados 60 ratos machos da linhagem Wistar que foram divididos em 6 grupos experimentais, inoculados com *S. brasiliensis* para o desenvolvimento da esporotricose cutânea e submetidos a 30 dias de tratamento com itraconazol, óleo essencial de *O. vulgare*, extrato hidroalcoólico de *O. vulgare*, associação do óleo com itraconazol, associação do extrato com o itraconazol e um grupo controle tratado somente com o veículo. Durante os 30 dias, os animais eram avaliados semanalmente e 2 animais por grupo eram eutanasiados para a coleta de material para analisar o desenvolvimento da doença e a evolução dos diferentes tratamentos. Ao final dos 30 dias, os animais remanescentes de cada grupo foram eutanasiados e, também, tiveram materiais biológicos coletados para as análises. Em todas as necropsias, foram coletadas amostras de fígado, rim, baço, testículo, ponto de inoculação e linfonodo regional, além de amostras de sangue. Como resultados obtidos, somente os animais pertencentes aos grupos ITRA e CONT não apresentaram desaparecimento total dos sinais clínicos observados ao final dos 30 dias de tratamento, também foi possível observar que os animais pertencentes aos grupos tratados com o extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* e com o óleo essencial de *O. vulgare* não apresentaram nenhuma alteração microscópica em rins, fígado e baço durante todo o experimento, indicando assim um possível efeito dessa planta na disseminação da doença. O *Sporothrix brasiliensis* foi reisolado do linfonodo regional de todos os animais de todos os grupos nas quatro necropsias realizadas. As análises de estresse oxidativo revelaram não existir diferença em seus níveis em

nenhum dos grupos avaliados. O estudo avaliando a ação do óleo e do extrato pode determinar que ambos atuam a nível de ergosterol da membrana do fungo.

**Palavras-chave:** esporotricose; extratos vegetais; *Origanum vulgare*; ação antifúngica.

## Abstract

MATOS, Caroline Bohnen de. **Use of hydroalcoholic extract and essential oil of *Origanum vulgare* with associations in the treatment of experimental sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis***. 2018. 62f. Thesis (Doctor in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

The search for new drugs with antimicrobial action has been extensively studied especially with vegetal extracts, however, the research of their action against fungi is still scarce. Among the mycoses of public health importance, sporotrichosis has emerged in recent years as an important zoonotic disease in large urban centers, affecting cats, dogs and humans. The treatment of this mycosis is carried out with daily administration of antifungals, especially itraconazole, which is considered the drug of choice for both animals and humans. However, the commercially available active principles with action in the fungi of the *Sporothrix schenckii* complex are restricted. In this sense, there is a need for other therapeutic options for the treatment of sporotrichosis. Thus, the in vitro activity of plants demonstrated by preliminary studies with isolates of the *Sporothrix schenckii* complex stimulated the realization of the present study in order to determine the in vivo activity of the vegetal extracts of *Origanum vulgare* for the treatment of experimental cutaneous sporotrichosis. For this, 60 male Wistar rats were divided into 6 experimental groups inoculated with *S. brasiliensis* for the development of cutaneous sporotrichosis and submitted to 30 days of treatment with itraconazole, *O. vulgare* essential oil, hydroalcoholic extract of *O. vulgare*, association of the oil with itraconazole, association of the extract with itraconazole and a control group treated only with the vehicle. During the 30 days, the animals were evaluated weekly and 2 animals per group were euthanized for the collection of material to analyze the development of the disease and the evolution of the different treatments. At the end of the 30 days, the remaining animals from each group were euthanized and also had biological materials collected for the analyzes. At all necropsies, samples of liver, kidney, spleen, testis, inoculation point and regional lymph node were collected, as well as blood samples. As results obtained, only the animals belonging to the ITRA and CONT groups did not show complete disappearance of the clinical signs observed at the end of the 30 days of treatment, it was also possible to observe that the animals belonging to the groups treated with the hydroalcoholic extract of *O. vulgare* and with the essential oil of *O. vulgare* did not present any microscopic changes in the kidneys, liver and spleen throughout the experiment, thus indicating a possible effect of this plant on the spread of the disease. *Sporothrix brasiliensis* was retroisolated from the regional lymph node of all animals of all groups at the four necropsies performed. Analyzes of oxidative stress revealed no difference in their levels in any of the groups evaluated. The study evaluating the action of oil and extract may determine that both act at the ergosterol level of the fungus membrane.

**Keywords:** sporotrichosis; plant extracts; *Origanum vulgare*; antifungal action.

## Lista de Figuras

Figura 1	Evolução da avaliação clínica ao longo das 4 semanas de tratamento dos animais nos diferentes grupos. A:CONT; B:ITRA; C: OEO; D: OEOI.....	36
Figura 2	Média dos pesos no início e no fim do tratamento.....	38
Figura 3	Valores médios de leucócitos totais para os diferentes tratamentos durante as quatro semanas de acompanhamento.....	40
Figura 4	Lesões observadas no fígado dos animais do grupo controle. A: Macroscopicamente; B: microscopicamente; C: retroisolamento.....	41
Figura 5	Média de unidades formadoras de colônias nos diferentes órgãos coletados durante as 4 semanas de tratamento.....	42
Figura 6	Cromatograma do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> .....	44
Figura 7	Níveis de ROS, Nitrito, TBARS, SH, SOD e CAT após 30 dias de tratamento em ratos inoculados com <i>S. brasiliensis</i> .....	47

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Média e desvio padrão dos parâmetros de ureia e creatinina durante os 30 dias de tratamento nos diferentes grupos.....	39
Tabela 2	Leitura das CIM referentes a análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno.....	46

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CEEA	Comitê de ética e experimentação animal
CIM	Concentração inibitória mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
CONT	Grupo tratado com propilenoglicol
CCQFA	Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EHA	Grupo tratado com extrato hidroalcoólico de <i>Origanum vulgare</i>
EHA1	Grupo tratado com extrato hidroalcoólico de <i>Origanum vulgare</i> associado ao itraconazol
GSht	Glutationa total
H&E	Hematoxilina-Eosina
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	Interferon gama
ITRA	Grupo tratado com itraconazol
MDA	Malondialdeído

MicVet	Laboratório de Micologia Veterinária
OEO	Grupo tratado com óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>
OEOI	Grupo tratado com óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> associado ao itraconazol
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PDA	Ágar batata dextrose
qPCR	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UFPel	Universidade Federal de Pelotas

## Lista de Símbolos

>	Maior
°C	Grau Celsius

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>2 Revisão da Literatura.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Sporothrix sp. e a esporotricose.....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Resposta imune e estresse oxidativo na esporotricose.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Terapêutica da esporotricose.....</b>	<b>25</b>
<b>2.4 Medidas de controle e profilaxia.....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Extratos vegetais de Origanum vulgare na esporotricose.....</b>	<b>29</b>
<b>3 Materiais e métodos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Obtenção dos extratos.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Preparação do inóculo.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3 Desenvolvimento da esporotricose cutânea experimental.....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Avaliação hematológica.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Avaliação histopatológica.....</b>	<b>31</b>
<b>3.6 Avaliação microbiológica.....</b>	<b>31</b>
<b>3.7 Avaliação das citocinas.....</b>	<b>32</b>
<b>3.8 Avaliação do estresse oxidativo.....</b>	<b>32</b>
<b>3.8.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS).....</b>	<b>32</b>
<b>3.8.2 Nitrito.....</b>	<b>33</b>
<b>3.8.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</b>	<b>33</b>
<b>3.8.4 Sulfidrilas (SH).....</b>	<b>33</b>
<b>3.8.5 Atividade de superóxido dismutase (SOD).....</b>	<b>33</b>
<b>3.8.6 Atividade de Catalase (CAT).....</b>	<b>33</b>
<b>3.9 Análise do efeito sobre a parede celular fúngica (ensaio do sorbitol)..</b>	<b>33</b>
<b>3.10 Análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno (ensaio do ergosterol qualitativo).....</b>	<b>34</b>
<b>3. 11 Análise estatística.....</b>	<b>35</b>
<b>4 Resultados e discussão.....</b>	<b>36</b>

<b>5 Considerações Finais.....</b>	<b>48</b>
<b>6 Referências.....</b>	<b>49</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>58</b>

## 1 Introdução

As micoses manifestam-se como infecções superficiais envolvendo a camada mais externa do extrato córneo do tegumento, ou ainda como infecções cutâneas disseminadas, subcutâneas, sistêmicas ou profundas envolvendo o cérebro, coração, pulmões, fígado, baço e rins. Normalmente as infecções são classificadas de acordo com o local da infecção, via de aquisição e tipo de virulência. Quando classificadas de acordo com o sítio da infecção, são denominadas superficiais, cutâneas, subcutâneas e sistêmicas (DIXON et al., 1996; FONTES et al., 2016).

A esporotricose é considerada a micose subcutânea cosmopolita, mais comumente observada nas regiões tropicais e subtropicais (CHAKRABARTI et al., 2015), acometendo principalmente indivíduos que vivem em baixa situação socioeconômica, assim como moradores de áreas rurais (COLOMBO et al., 2011).

Nos últimos anos, o crescente aumento da esporotricose, revelou o quadro endêmico atual da micose, sendo que as principais regiões acometidas por essa enfermidade micótica no Brasil, são a região metropolitana e adjacências do Rio de Janeiro e sul do Rio Grande do Sul (ABREU, 2017; BARROS et al., 2010; MADRID et al., 2017).

O município de Pelotas, no estado do Rio Grande do Sul, tem constatado que desde o ano 2000, houve um aumento nos casos de esporotricose, principalmente felina, levando o município a criar um programa de vigilância e controle desta enfermidade, principalmente em razão do potencial zoonótico (MADRID et al., 2017).

A manutenção e disseminação da enfermidade, muitas vezes é favorecida pelo abandono dos felinos, principal animal envolvido como disseminador do fungo em áreas urbanas, bem como o descarte inadequado dos cadáveres dos animais que vieram a óbito, dificultando ainda mais o controle da esporotricose, visto que o fungo se mantém viável no ambiente por período prolongado (ABREU, 2017; MADRID et al., 2017; MADRID; MATTEI; SANTIN; et al., 2012; MATOS et al., 2016).

O tratamento frente a esporotricose é baseado na utilização de antifúngicos, principalmente iodetos e antifúngicos do grupo dos azóis (BODEY, 1992; FONTES et al., 2016; JOHNSON; WARNOCK, 1995; LYMAN; WALSH, 1992; MEINERZ et al., 2007; NOBRE et al., 2002; ODDS, 1993). O itraconazol é considerado o fármaco de eleição para o tratamento da esporotricose (ANTUNES et al., 2009), com efeitos colaterais reduzidos (GRAM, 2003). Porém, estudos recentes vem demonstrando a existência de isolados resistentes a esse antifúngico (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004; COSTA et al., 2009; ODDS, 1993; SILVA et al., 2018; XAVIER et al., 2004), o que faz com que se busque por novas alternativas de tratamento para essa micose, como os realizados utilizando a terbinafina de forma sistêmica (MEINERZ et al., 2007), (1-3)  $\beta$ -glucana (GUTERRES et al., 2014; MARTINS, 2012) e o uso de Anfotericina intralesional, associadas ou não ao itraconazol (GREMIÃO et al., 2011).

Neste sentido, os extratos de *Origanum vulgare* tem sido avaliados, demonstrando atividade bactericida, fungicida e fungistática em isolados fúngicos de animais e padrões como de *Candida* spp., *Malassezia pachydermatis*, *Aspergillus* spp., etc (CASTRO et al., 2013; CLEFF et al., 2008, 2013; FREITAS et al., 2013; SANTIN et al., 2014) em isolados de *Sporothrix schencki* e *Sporothrix brasiliensis* (WALLER et al., 2016). Diante da comprovação da atividade *in vitro* do óleo essencial e extrato hidroalcoólico desta planta frente ao *Sporothrix* sp., observou-se a necessidade de avaliar a efetividade dos extratos no tratamento da esporotricose experimental cutânea causada pelo *Sporothrix brasiliensis*.

## 2 Revisão da Literatura

### 2.1 *Sporothrix* sp. e a esporotricose

A esporotricose trata-se de uma enfermidade decorrente da infecção por fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, sendo a principal causa de micoses cutâneas e linfocutâneas que acomete o homem e os animais (OLIVEIRA et al., 2015; SANCHOTENE et al., 2015). Foi descrita pela primeira vez por Schenck, em 1898, nos Estados Unidos da América, em um paciente de 36 anos com abscesso no dedo indicador e linfangite nodular no antebraço (SCHENCK, 1898), sendo que no Brasil somente foi reportada pela primeira vez em 1907 (LUTZ; SPLENDORE, 1907).

No Brasil, os estados do Rio de Janeiro e do Rio Grande do Sul são conhecidos por serem regiões endêmicas de esporotricose, com diversos estudos relatando a transmissão animal-animal e animal-homem (BARROS et al., 2011; LOPES et al., 1999; MADRID et al., 2012; XAVIER et al., 2013).

Até o ano de 2007 a enfermidade era associada a presença de uma única espécie dentro do gênero, o *Sporothrix schenckii*. Entretanto, a partir da análise fenotípica, através da caracterização macroscópica da colônia, microscopia dos conídios, assimilação de sacarose e rafinose, capacidade de crescer a 37°C, e avaliação genotípica foi proposto a classificação em novas espécies. A proposta de divisão do agente *S. schenckii* em um complexo foi definida através do sequenciamento parcial do gene da calmodulina, avaliando-se diversos isolados obtidos em diferentes países, sendo então o complexo *S. schenckii* atualmente composto por seis espécies patogênicas (MARIMON et al., 2007).

Entre as espécies existentes, estudos realizados por Marimon et al. (2007) e Oliveira et al. (2011), relacionaram o *S. brasiliensis* como sendo a principal espécie responsável pela epidemia do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rodrigues et al. (2013), em outro estudo, comprovou que a espécie *S. brasiliensis* está associada a 96% dos casos de esporotricose em felinos no Brasil e, conseqüentemente nos humanos que contraíram a enfermidade a partir de felinos infectados. Recentemente, estudos moleculares tem demonstrado que os isolados de *S. brasiliensis* do estado do Rio Grande do Sul diferem daqueles isolados no Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (RODRIGUES et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2014).

A espécie *S. brasiliensis* é resultante de um desdobramento clonal da espécie *S. schenckii sensu stricto* e tem sido considerada a mais patogênica dentro do complexo, caracterizando-se por apresentar conídios sésseis pigmentados, não ter a capacidade de assimilar rafinose e ser a única espécie que não assimila sacarose. Apresenta menor crescimento em ágar batata, a 20°C e 30°C, porém a 37° é a espécie com maior crescimento, quando comparada as outras espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (FERNANDES et al., 2013; MARIMON et al., 2007, 2008).

Os mecanismos de virulência do fungo são pouco conhecidos, mas sugere-se que a termo tolerância, secreção de enzimas extracelulares e polissacarídeos estejam envolvidos. As enzimas extracelulares como as fosfatases ácidas, produzidas pelo fungo, parecem desempenhar papel importante na interação das células leveduriformes de *Sporothrix* sp. com os macrófagos (HOGAN et al., 1996; NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005).

A produção de melanina ou de produtos relacionados à melanina pelo fungo parece também estar relacionada à infectividade do agente. As cepas produtoras de melanina mostraram-se menos suscetíveis à ação de intermediários de nitrogênio e oxigênio do que as cepas não produtoras de melanina (MORRIS-JONES et al., 2003; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000).

A distribuição da enfermidade é cosmopolita, porém, é descrita principalmente em países de clima tropical e subtropical, sendo o Brasil considerado uma zona endêmica da doença, principalmente nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (BARROS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015). O Instituto de Pesquisa e Clínica Evandro Chagas (IPEC)/ Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), diagnosticou a esporotricose em mais de 4000 humanos e 3804 gatos, somente no Rio de Janeiro, Brasil, entre os anos de 1998 e 2011, o que faz com que seja classifica como a

principal micose de importância para a saúde pública (BARROS et al., 2010; PEREIRA et al., 2014).

Os felinos apresentam grande importância com relação a esta enfermidade, principalmente machos não castrados e de livre acesso à rua, pelo fato das suas lesões conterem um grande número de organismos fúngicos e também pelo fato do fungo estar presente em unhas e cavidade bucal, tanto de felinos acometidos pela micose, como de felinos sadios (BARROS et al., 2010; XAVIER et al., 2004).

Normalmente, a infecção ocorre através da implantação do agente na derme do hospedeiro suscetível (BRAUNWALD et al., 2013; SCHUBACH et al., 2005). Além dos animais, o ser humano, independentemente de fatores individuais predisponentes, é susceptível a contaminação (LOPES et al., 1999), sendo que a literatura cita a ocorrência da doença associada à ocupação profissional, afetando pessoas que lidam com a terra, particularmente em áreas rurais (DONADEL et al., 1993; SCHUBACH et al., 2005). Desde o início deste século, a ocorrência da esporotricose, também tem sido relacionada à arranhadura e/ou mordedura de gatos, levando a surtos familiares, além da ocorrência em profissionais que lidam com animais, como veterinários e auxiliares (SCHUBACH et al., 2001, 2004).

A enfermidade pode ser classificada clinicamente como cutâneo-linfática, cutâneo-localizada ou cutânea fixa, cutâneo disseminada e extra cutânea (FONTES et al., 2016; LACAZ, 1959). Os felinos apresentam, normalmente, lesões localizadas na região da cabeça e/ou membros, locais mais expostos aos traumas, caracterizando a forma cutânea fixa e cutânea disseminada da doença (SCHUBACH et al., 2001; XAVIER et al., 2004). As lesões iniciais cursam com um quadro eritematopapuloso ou pustuloso, que, na maioria das vezes, evolui com formação de nódulos ou placas ulceradas (ALMEIDA; ALMEIDA, 2015; BARROS et al., 2011). Essas lesões podem progredir e ocasionar o surgimento de uma linfangite e de lesões secundárias (BARROS et al., 2011).

Assim como nos animais, a forma cutânea localizada também pode ser identificada nos humanos, estando presente mais frequentemente a forma linfocutânea (DONADEL et al., 1993; SCHUBACH et al., 2001; XAVIER et al., 2004).

O diagnóstico definitivo da enfermidade é realizado através do isolamento e identificação do agente etiológico, através da semeadura do material clínico (biópsia ou secreção) em ágar Sabouraud com cloranfenicol, acrescido ou não de cicloheximida (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2015; DIXON et al., 1991). Mesmo

sendo um teste simples e não muito caro, o isolamento do fungo é dificultado em alguns casos, principalmente devido à localização e quantidade de material nas lesões apresentadas pelo paciente. Apesar da necessidade do desenvolvimento de testes moleculares mais específicos para o diagnóstico, esse tipo de teste tem sido usado somente em pesquisas clínicas e ainda não tem validação para o uso como método diagnóstico de rotina (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2015).

## **2.2 Resposta imune e estresse oxidativo na esporotricose**

Quando os fungos, ou os seus componentes, são introduzidos num hospedeiro, são capazes de induzir uma resposta antígeno-específica, que pode ser expressa tanto como uma resposta positiva, que vai levar à eliminação do patógeno, como uma resposta supressora (DOMER et al., 1992). O sistema imune inato, desempenha papel importante nas defesas naturais do hospedeiro contra os microrganismos. O reconhecimento de microrganismos patogênicos, seja nos tecidos em contato com o ambiente ou na circulação sistêmica após invasão da circulação sanguínea, é feito pelos macrófagos, células dendríticas, células “natural killer” (NK), granulócitos e monócitos, que atuam como sentinelas do sistema imune inato (BOCHUD et al., 2007).

Para que o organismo consiga desenvolver uma resposta efetiva contra o agente, é necessária a contribuição de forma coordenada da imunidade inata e adaptativa, principalmente por meio da apresentação de antígenos e através da produção de mediadores da resposta imune, como as citocinas (ANTACHOPOULOS; ROILIDES, 2005). A imunidade inata atua fornecendo sinais para a ativação da imunidade adaptativa, que por sua vez induz a diferenciação dos linfócitos (NOBENTRAUTH et al., 2000). As citocinas são mediadores solúveis, essenciais na comunicação intracelular, secretadas pelos linfócitos e células do sistema fagocitário, sendo consideradas parte importante na resposta imune contra diversos organismos. Possuem um papel importante também como moduladoras da inflamação e da imunidade, regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e, também de células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994). Sua produção normalmente é transitória, podendo ter seus efeitos estimulados ou inibidos por outras citocinas (KUSHNER, 1998). Estas contribuem para a proliferação e diferenciação de linfócitos T virgens no seu tipo efetor e, também, coordenam o mecanismo inflamatório. Contra

patógenos fúngicos, podemos citar principalmente o envolvimento das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (CARVALHO et al., 1998; MAIA et al., 2015). A IL-10 e a IL-4 convertem as células T na subpopulação Th2 (SWAIN et al., 1990; FIORENTINO et al., 1991), enquanto que a IL-12 direciona as células T para o subgrupo Th1 (MANETTI et al., 1993).

Sabe-se que a IL-4 e IL-10 são potentes ativadoras dos linfócitos B e agentes anti-inflamatórios, sendo conhecidas como citocinas anti-inflamatórias. Sendo assim denominadas, devido a sua capacidade de suprimir os genes para as citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e TNF- $\alpha$  (DINARELLO, 2000).

A IL-1 é considerada um importante mediador das respostas de fase aguda no organismo contra a invasão microbiana, reações imunológicas e lesão tecidual, sendo considerada uma das primeiras e mais significativas moléculas sintetizadas durante a resposta de fase aguda. Seus efeitos biológicos manifestam-se de forma local ou sistêmica. Foi originalmente descrita como um pirogênio endógeno, devido a ampliar as respostas mediadas pelas células T aos mitógenos e antígenos (GERY e WAKSMAN, 1972) devido à sua propriedade de atuar como um fator ativador de linfócitos (MURPHY et al., 1980; ROSENWASSER et al., 1979) (DINARELLO, 2018).

Apesar dos mecanismos imunológicos envolvidos na prevenção e controle da esporotricose não estarem bem elucidados, acredita-se que a resposta imune humoral, desencadeada por proteínas secretadas pelo fungo, e a celular, desencadeada contra os antígenos da parede celular, são as respostas desencadeadas contra os antígenos fúngicos (CARLOS et al., 1992; CARLOS et al., 2003; MAIA et al., 2006).

A ocorrência de uma resposta inflamatória eficiente, a eliminação do fungo e a sobrevivência do hospedeiro dependem de múltiplos fatores (ROMANI, 2004; LEVITZ, 2004; BROWN, 2006). Entretanto, a variedade da resposta clínica do hospedeiro sugere a participação da imunidade celular nos mecanismos fungicidas e na eliminação do fungo (HACHISUKA e SASAI, 1981)(ROSSATO, 2017).

Embora os conídios dos fungos do complexo *S. schenckii* sejam reconhecidos pelos receptores de manose, a resposta inflamatória induzida por é considerada fraca, podendo favorecer a transição dos conídios para leveduras. Após a ativação dos macrófagos, os mesmos fagocitam o patógeno invasor e promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias. Tal processo estimula a resposta fagocítica e promove a liberação de agentes tóxicos, como o óxido nítrico (NO) (ROSSATO, 2017),

interferindo em vários processos dentro do sistema imune (MARSHALL & STAMLER, 2000; BOGDAN et al., 2001). Seus efeitos citotóxicos são importantes para a defesa inata do hospedeiro em relação a inúmeros patógenos, dentre eles fungos, bactérias, parasitas e protozoários (GREEN et al., 2000).

De acordo com alguns autores, as células leveduriformes dos fungos dimórficos sobrevivem a fagocitose in vitro por neutrófilos, sendo menos suscetíveis ao peróxido de hidrogênio e outros produtos microbicidas produzidos pelos leucócitos (MARIO, 2015). Estudo conduzido Sgarbi e colaboradores (1997), identificou o peróxido de ergosterol como produto da oxidação enzimática do ergosterol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependente, a partir de formas leveduriformes de *Sporothrix schenckii*, sendo revertido a ergosterol quando em contato com enzimas deste fungo. Sendo assim, acredita-se que o peróxido de ergosterol é formado pelo *S. schenckii* como mecanismo de defesa durante a fagocitose (SGARBI et al., 1997). O ergosterol isolado da membrana de formas leveduriformes do *S. schenckii* também pode estar relacionado à virulência deste fungo, como um mecanismo de evasão das espécies reativas do oxigênio durante a fagocitose através da formação ergosterol peróxido (SGARBI et al., 1997).

O componente lipídico da parede celular de *S. schenckii* desempenha um papel importante na patogênese da esporotricose, sendo capaz de inibir o processo fagocítico do fungo e induzir elevada liberação de óxido nítrico (NO) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-) em culturas de macrófagos (CARLOS et al., 2003).

Estudos demonstraram que o NO, juntamente com as espécies reativas do oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), pode contribuir com a atividade citotóxica dos macrófagos durante a infecção pelo fungo *S. schenckii* (CARLOS et al., 2003). Esta sensibilidade ao NO é inversamente proporcional à virulência do fungo, onde cepas mais virulentas são menos suscetíveis ao NO que as menos virulentas (FERNANDES et al., 2000).

Um estudo sugeriu que a forma de apresentação da micose influencia no perfil de anticorpos formados, uma vez que foi observado de 15 a 20 antígenos na faixa de 22 a 70kDa presentes em uma solução solúvel de extrato peptídico do fungo no soro de pacientes com a forma extra cutânea da esporotricose e nos pacientes que apresentavam a forma cutânea da doença foi observado somente 8-10 antígenos (SCOTT & MUCHMORE, 1989)

Na atualidade, o interesse pelo estudo dos antioxidantes se deve principalmente às descobertas sobre os efeitos dos radicais livres no organismo. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios

de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos, dentre outros (BARREIROS et al., 2006), contribuindo ou induzindo o dano nas patologias dermatológicas, como no caso da esporotricose.

Segundo Beigh et al. (2013), o estresse oxidativo aparece como uma consequência da doença fúngica. No entanto, é importante destacar que o estresse oxidativo ocorre em consequência ao desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e o desempenho dos sistemas de defesa antioxidante (CASTRO et al., 2017).

### **2.3 Terapêutica da esporotricose**

Com relação ao tratamento empregado frente a esporotricose, os iodetos inorgânicos eram a única terapia sistêmica disponível até 1940 (HILL et al., 1995; POLAK, 1999). Atualmente, o uso dos iodetos é considerado uma alternativa de baixo custo terapêutico para cães e até mesmo para o homem, porém seu uso é restrito quando se fala da espécie felina, principalmente devido a sensibilidade da espécie frente a drogas deste grupo, podendo ocorrer toxicidade importante (MEINERZ et al., 2007; NOBRE et al., 2002).

Os fármacos pertencentes ao grupo dos azóis são estruturalmente relacionados, compondo antifúngicos de amplo espectro com similar mecanismo de ação, variando a farmacocinética, a toxicidade e o uso clínico (BODEY, 1992; JOHNSON; WARNOCK, 1995; LYMAN; WALSH, 1992; ODDS, 1993). O itraconazol é considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esporotricose em animais (ANTUNES et al., 2009), com efeitos colaterais reduzidos (GRAM, 2003). Porém, estudos recentes vem demonstrando a existência de isolados resistentes a esse antifúngico (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004; XAVIER et al., 2004), o que faz com que se busque por novas alternativas de tratamento para essa micose, como os realizados utilizando a terbinafina de forma sistêmica (MEINERZ et al., 2007), ou a (1-3)  $\beta$  – glucana (GUTERRES et al., 2014; MARTINS, 2012). O uso da anfotericina B intralesional em associação com a administração de itraconazol oral, também vem sendo descrito para o tratamento de felinos com esporotricose ou refratários ao tratamento convencional (GREMIÃO et al., 2011).

Novos fármacos triazólicos têm sido estudados na esporotricose com resultados promissores *in vitro*, especialmente posaconazol, que obteve melhor

atividade quando comparado a outros fármacos, como anfotericina B e itraconazol, frente ao *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. albicans* (MARIMON et al., 2008; PEREIRA SILVEIRA et al., 2009). Ainda, o posaconazol tem sido eficaz em infecção experimental por *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, inclusive quando associado à anfotericina B (MARIO et al., 2015). Pesquisas atuais, tem observado que voriconazol em ratos com esporotricose disseminada, apresentaram melhor resposta terapêutica quando infectados por *S. schenckii* em comparação àqueles infectados por *S. brasiliensis*, cujo fármaco apresentou-se com pouca atividade.

Em estudos com os fármacos da classe das equinocandinas, os quais inibem a enzima glucano-sintetase envolvida na síntese de  $\beta$ -glucana (SARAVOLATZ et al., 2003), os resultados frente ao complexo *Sporothrix schenckii* não tem sido satisfatórios.

O abandono e a solicitação de eutanásia do paciente por parte dos tutores, são fatores que também são comumente observados, principalmente pelo fato de que existe um longo período de tratamento, além da possibilidade de aquisição da doença por um membro da família (PEREIRA et al., 2009; SCHUBACH et al., 2004).

## **2.4 Medidas de controle e profilaxia**

Dentre as inúmeras zoonoses, a esporotricose destaca-se por ser uma enfermidade que exige diversos cuidados no que diz respeito ao seu controle e profilaxia, sendo que a prevenção é considerada difícil de ser realizada, devido a dificuldade da eliminação do fungo do ambiente (SOUZA, 2003; MARTINS, 2012). O simples fato de tratar-se de um fungo geofílico, sendo encontrado amplamente distribuído na natureza é determinante para o seu controle (KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992; CRUZ, 2013).

Contudo, no sentido de tentar minimizar a disseminação da doença ou a reinfecção dos animais doentes, medidas rígidas de proteção, tanto para as pessoas como para animais suspeitos ou doentes, devem ser adotadas (TABOADA, 2004; SILVA et al., 2012b). Desta forma, tem sido orientada a diminuição do contato com o exsudato das lesões, através da utilização de luvas de procedimento, e após manipulação do animal, lavagem de punhos, mãos e braços com iodo-povidina ou clorexidina (TABOADA, 2004; SILVA et al., 2012; MARTINS, 2012). Um procedimento importante a ser adotado, principalmente pelos profissionais da saúde em contato com

o paciente, é a utilização de equipamentos de proteção individual, tais como aventais descartáveis de manga longa com elástico no punho, luvas descartáveis, máscara, óculos de proteção e touca descartável (SILVA et al., 2012a).

Com relação aos cuidados que devem ser adotados nos ambientes veterinários, estão incluídos a higienização da mesa de atendimento e instrumental, após cada exame clínico, uma vez que o isolamento fúngico de ambientes veterinários e domiciliares já foi comprovado (MATTEI et al., 2011).

Já as medidas adotadas com os animais doentes envolvem a separação de gatos doentes de outros animais, a castração e a manutenção dos felinos de forma domiciliada (SCHUBACH et al., 2001). Além disso, o tutor deve ser orientado para a correta higienização da caixa de transporte, eliminação dos resíduos gerados pelos animais doentes e a limpeza e desinfecção do ambiente onde o doente está sendo mantido (SILVA et al., 2012a). Entretanto, é importante destacar que deve-se evitar a disseminação da doença por meio do tratamento dos casos clínicos associado a medidas de desinfecção (MATOS et al., 2016).

Segundo Ettinger & Feldman (2000), o animal é meramente um vetor mecânico, portanto devem ser tomadas precauções durante a manipulação de materiais contaminados, animais ou exsudatos infectados. Ronald & Welsh (2001), afirmam que os proprietários de gatos com a enfermidade, devem ser advertidos sobre o potencial zoonótico da esporotricose cutânea, e a necessidade de realizar medidas de prevenção quanto ao manejo dos animais, sabendo que as lesões contêm um alto número de formas infecciosas de *Sporothrix* spp.

O cuidado especial que deve ser adotado com a espécie felina ocorre devido ao seu alto potencial disseminador, principalmente pelo fato dessa espécie possuir grande quantidade de organismos fúngicos presentes nas lesões, diferentemente das outras espécies, e pelo fato dos felinos carregarem o agente nas unhas e cavidade oral, tornando mais provável a transmissão a partir desta espécie do que de outros animais (TABOADA, 2004; ANTUNES et al., 2009; PEREIRA et al., 2011, MADRID et al., 2012).

O esclarecimento do proprietário é parte fundamental e deve ser levado em consideração, por tratar-se de uma doença zoonótica que apresenta alto risco de contaminação, é imprescindível a correta orientação sobre o manuseio do animal doente (SILVA et al., 2012a; MARTINS, 2012). A eliminação de animais doentes não parece ser a maneira mais adequada de controle da enfermidade. Segundo Barros et

al. (2010), o aumento de unidades de controle de zoonoses, com finalidades de tratamento e castração de felinos, eutanásia dos animais em caso de impossibilidade terapêutica, cremação dos corpos que evoluíram para o óbito, incluindo a educação para posse responsável, são medidas que se adotadas em conjunto podem minimizar a disseminação da micose.

A prevenção das infecções cruzadas tem enfrentado algumas dificuldades, principalmente pelo fato de que na maioria das vezes, os microrganismos têm conseguido vencer as medidas de segurança adotadas, colocando em risco profissionais e pacientes (MACHADO et al., 2008). Entretanto, para a prevenção da contaminação cruzada de indivíduos que entrem em contato com superfícies, equipamentos e outros fômites contaminados, tem sido preconizado a realização de procedimentos de limpeza, desinfecção e/ou esterilização utilizando substâncias a base de hipoclorito de sódio (BRASIL, 2006; PENNA, 2006; SILVA et al., 2012a; MADRID et al., 2013). Porém, através de testes realizados por pesquisadores ao longo dos anos, pode-se notar que a ação desses produtos é contraditória (FRAISE et al., 2004; MADRID et al., 2013).

Segundo a literatura, a adequada desinfecção pode ocasionar a eliminação de todos os microrganismos patológicos, com exceção dos endosporos bacterianos (KALIL & COSTA, 1994). Existem inúmeros princípios ativos disponíveis para a limpeza e desinfecção de ambientes, sendo necessário o conhecimento do espectro de atividade, toxicidade, poder residual, custo e natureza do material a ser tratado. Ainda não existe um produto que apresente todas essas características, possuindo vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas no momento da seleção para o uso (MCDONNELL & RUSSELL, 1999). Além disso, deve-se considerar que os fungos são microrganismos considerados de resistência intermediária aos desinfetantes (BRASIL, 1999).

Dentre os desinfetantes mais comumente utilizados em ambientes veterinários podemos citar o hipoclorito de sódio, o digluconato de clorexidina e o álcool 70°, dentre outros (SANTOS, et al., 2007). Porém, estudos a respeito de sua atividade tem demonstrado um certo grau de resistência dos microrganismos, principalmente pelo fato das concentrações utilizadas não serem as necessárias para a eliminação por completo dos agentes (WALTIMO et al., 1999; ESTRELA et al., 2003; FRAISE et al., 2004; MENEZES et al., 2008; CHANDRA et al., 2010; MADRID et al., 2013). Neste sentido, estudos prévios realizados demonstraram a sensibilidade de *Sporotrix* sp. a

extratos vegetais utilizados em superfícies contaminadas com o fungo (MATOS et al., 2016)

## 2.5 Extratos vegetais de *Origanum vulgare* na esporotricose

Nas últimas décadas, houve um ressurgimento do interesse nas plantas como fontes de novos agentes terapêuticos. Muitas empresas farmacêuticas investiram na pesquisa com extratos vegetais, a fim de descobrir novas substâncias ativas, tanto que grande parte dos medicamentos lançados nos últimos anos tiveram origem à partir de estudos com plantas (ALMEIDA; SCHEFFER, 2012; DUARTE, 2006).

Em junho de 2006, com base no aumento das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social, o Brasil lançou um Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos por meio do Decreto Presidencial Nº. 5.813, buscando promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira e incentivar a utilização de produtos naturais no tratamento de doenças (BRASIL, 2006).

Com relação aos antifúngicos, tem havido uma busca crescente por produtos com ação comprovada e baixa toxicidade. Com isso, a pesquisa com extratos vegetais, tem obtido destaque, principalmente pelos resultados demonstrarem ação de diversas plantas em fungos de importância veterinária (CLEFF et al., 2008).

Nos últimos anos, diferentes investigações tem demonstrado a atividade antimicrobiana de inúmeros óleos essenciais, principalmente em relação a plantas pertencentes a família Lamiaceae, que compreende a hortelã, o tomilho, o alecrim, a manjerona, o manjeriço e o orégano (CASTRO et al., 2013; COUTO et al., 2015; MATOS et al., 2016; SANTIN et al., 2014; WALLER, S. B. et al., 2016). Em sua maioria, as pesquisas tem sido realizadas através da utilização de técnicas *in vitro*, como difusão, diluição ou bioautografia (HENRIQUES et al., 2009).

Neste sentido, os extratos de *Origanum vulgare* tem sido avaliado, demonstrando atividade bactericida, fungicida e ovicida (CASTRO et al., 2013; CLEFF et al., 2008, 2013; FREITAS et al., 2013; SANTIN et al., 2014), inclusive em isolados de *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis* (WALLER, STEFANIE BRESSAN et al., 2016).

O gênero *Origanum* é originário da Ásia e da Europa mediterrânea, pertence a família Lamiaceae e apresenta-se como uma planta herbácea com raízes em forma

de caules subterrâneos, perene, de hastes algumas vezes roxeadas, variando de 30 a 50 cm, com flores esbranquiçadas, róseas ou violetas (LORENZI; MATOS, 2008).

A planta inteira já vem sendo utilizada na medicina caseira, inclusive seu óleo é bastante utilizado na composição de aromatizantes de alimentos, além do uso na fabricação de perfumes. É atribuída a esta planta ação analgésica, espasmolítica, sudorífica, estimulante da digestão, da atividade uterina e em cólicas, bem como expectorante (CORRÊA et al., 2003).

A literatura cita a presença de 4-terpinol,  $\alpha$ -terpineno, timol e carvacrol, como os compostos majoritários presentes no óleo essencial de *O. vulgare*, sendo estes relacionados com a sua atividade antimicrobiana (CLEFF et al., 2008; ROMERO et al., 2015; SANTIN et al., 2014). Já em estudos realizados com extratos aquosos, observou-se a presença de flavanóides, que tem sido identificados como apigenina e luteolina, agliconas, álcoois alifáticos e compostos terpênicos derivados de fenilpropano (BLANK et al., 2016; JUSTESEN; KNUTHSEN, 2001). Entretanto, sabe-se que as plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas a partir dos nutrientes, água e luz que recebem, e o fazem em diferentes concentrações dependendo de inúmeros fatores relacionados ao ambiente de produção e da própria planta (GOBBO-NETO e LOPES, 2006).

Uma vez já comprovada a atividade *in vitro* do óleo essencial e extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* frente ao *Sporothrix* sp., observou-se a necessidade em avaliar a capacidade desses extratos no tratamento da esporotricose experimental cutânea causada pelo *Sporothrix brasiliensis*.

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Obtenção dos extratos**

As folhas secas de *Origanum vulgare* foram adquiridas de distribuidor comercial com certificação botânica, e para obtenção do óleo essencial as folhas foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger durante 4 horas, segundo a Farmacopeia Brasileira IV. A secagem foi realizada através da utilização do sulfato de sódio anidro p.a, sendo, por fim, o óleo essencial foi estocado em frasco âmbar e sob refrigeração.

Para a obtenção do extrato hidroalcoólico, foi realizada a destilação fracionada e levado ao rota-evaporador à pressão reduzida para extração do álcool (solvente) da tintura de *O. vulgare*, sendo preparada na concentração de 10% em álcool 70°GL de cereais. A mistura foi colocada em um frasco erlenmeyer revestido com papel alumínio para evitar o contato com a luz, e deixado durante sete dias a temperatura ambiente, sendo homogeneizado uma vez ao dia. Depois de uma semana, foi realizada a filtragem da solução e o armazenamento em frasco âmbar estéril, segundo protocolo estabelecido por Schiedeck et al. (2008). Após a extração do solvente, procedeu-se à reidratação com água destilada estéril, reconstituindo a concentração original do extrato.

A análise dos compostos químicos do óleo essencial de *O. vulgare* foi realizada por cromatografia gasosa, no Laboratório de Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da Universidade Federal de Pelotas. Sendo a amostra comparada com padrões cromatográficos adquiridos comercialmente.

#### **3.2 Preparação do inóculo**

Para a realização do teste in vivo foi utilizado um isolado de *Sporothrix brasiliensis* proveniente de um caso clínico em felino, que estava armazenado na micoteca do Laboratório de Micologia Veterinária (MicVet) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Inicialmente, o isolado fúngico foi cultivado em ágar batata dextrose (PDA) a 28°C, durante 7 dias, para a obtenção da fase filamentosa do fungo.

Posteriormente, foi retirada uma alíquota da cultura e colocada em tubo de ensaio contendo água destilada estéril, tendo sua turbidez ajustada através do espectrofotômetro em 70% de transmitância, alcançando densidade final de  $2 \times 10^3$  células/mL.

### **3.3 Desenvolvimento da esporotricose cutânea experimental**

Para a realização do teste in vivo foram utilizados 60 ratos machos, adultos e albinos da linhagem Wistar. Os animais foram acomodados em caixas no Biotério Central da UFPel e mantidos em condições controladas de umidade, temperatura e ciclo de claro e escuro recebendo, dieta de acordo com peso corporal e água ad libitum durante todo o experimento.

Os animais foram divididos em seis grupos, conforme o tratamento recebido: ITRA (Itraconazol 10mg/kg), OEO (óleo essencial de *Origanum vulgare* 3%); EHA (extrato hidroalcoólico de *Origanum vulgare* 25%); EHA1 (Associação de extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* 25% + itraconazol 10mg/kg); OEOI (Associação de óleo essencial de *O. vulgare* 3% + itraconazol 10mg/kg); CONT (Tratados com o veículo - propilenoglicol), sendo que cada grupo foi composto por 10 animais.

O itraconazol foi adquirido de distribuidor comercial, tendo o nome comercial preservado por questões éticas, e, juntamente com o óleo essencial e o extrato hidroalcoólico, foi encaminhado a uma farmácia de manipulação para a realização das soluções que seriam administradas nos animais, sendo o propilenoglicol o veículo utilizado para todas as soluções.

Todos os animais foram sedados e inoculados pela via subcutânea no coxim plantar esquerdo com 0,2 mL de suspensão do inóculo fúngico de *S. brasiliensis*.

O tratamento dos animais experimentais foi iniciado dez dias após a inoculação fúngica, sendo realizado todos os dias, em todos os animais, através da administração de 1mL da solução de cada tratamento por via oral com auxílio de sonda orogástrica, durante 30 dias. Os animais pertencentes ao grupo não tratado receberam 1mL do veículo (propilenoglicol). Durante o período experimental, foi observado a mortalidade, a sobrevivência e a evolução da enfermidade em todos os animais.

A cada sete dias era realizada a necropsia de dois animais de cada grupo, para o acompanhamento do tratamento, sendo coletados fígado, rim, baço, testículo e linfonodo regional para análise microbiológica e histopatológica, sangue, através de

punção cardíaca, e baço para a análise de citocinas e cérebro para a análise do estresse oxidativo gerado. Ao final dos 30 dias de tratamento, os sobreviventes de cada grupo foram necropsiados e também tiveram suas amostras coletadas e encaminhadas para as respectivas análises. Todas eutanásias foram realizadas através do uso dos fármacos xilazina e quetamina, para anestesia prévia, seguidos de uma dose elevada de tiopental intravenoso, conforme a resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do CFMV.

Todo o experimento teve aprovação do CEEA da Universidade Federal de Pelotas, sob o número de processo 23110.001622/2012-55.

### **3.4 Avaliação hematológica**

Amostras de sangue dos animais eutanasiados a cada semana, foram coletadas através de punção cardíaca e encaminhadas ao laboratório de análises clínicas da Faculdade de Veterinária da UFPel, para a realização do hemograma completo e análise da função hepática e renal.

### **3.5 Avaliação histopatológica**

Um fragmento de cada órgão (fígado, rim, baço, testículo e linfonodo) foi conservado em formol a 10% e posteriormente incluído em parafina, cortada em finas camadas e corada com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e coloração de Hematoxilina-Eosina (H&E), para a observação tanto das estruturas fúngicas como da reação inflamatória desencadeada pelo fungo nos animais inoculados.

### **3.6 Avaliação microbiológica**

Uma parte de cada órgão coletado (fígado, rim, baço, testículo e linfonodo) durante a necropsia foi macerada, sofreu uma lavagem com água destilada estéril e posterior filtração em camada de gaze. O sobrenadante retirado, sofreu três diluições seriadas e as diluições foram cultivadas por espalhamento em placas de Petri contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida e mantidos a 25°C durante 10 dias. Posteriormente foi realizada a caracterização morfológica

macroscópica e microscópica do fungo e a contagem das unidades formadoras de colônias.

### **3.7 Avaliação das citocinas**

Para a realização da avaliação de produção de citocinas, após a eutanásia, uma parte do baço e sangue foram retirados assepticamente e colocados em frasco estéril com 5 ml de solução de HANK'S para ser encaminhados para análise laboratorial. Em seguida foi realizada a maceração dos fragmentos de baços em placa de Petri estéril. As células suspensas foram coletadas em Falcon estéril e centrifugadas por 10 min a 2000g. Em seguida, foi descartado o sobrenadante e adicionado a solução de lise deixado em repouso por 2 min e centrifugado novamente por 10 min a 2000g. Após a lise do material, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas novamente em solução de HANK'S e centrifugadas por 10 min a 2000g. Após o sobrenadante foi descartado, as células foram acondicionadas em eppendorfs juntamente com a solução de TRIzol reagente e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para o posterior processamento. O mesmo procedimento foi adotado com a amostra de sangue a partir da etapa onde foi feita a adição da solução de lise.

As amostras armazenadas em TRIzol foram submetidas ao protocolo para extração de RNA e posteriormente ao protocolo de transformação do RNA em cDNA. As citocinas avaliadas, tanto no baço como no sangue, serão IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  através da utilização da técnica de qPCR.

### **3.8 Avaliação do estresse oxidativo**

Para a avaliação do estresse oxidativo, os cérebros dos animais foram coletados assepticamente e acondicionados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o dia do processamento.

No momento do processamento das amostras, o córtex cerebral e o hipocampo foram homogeneizados em um buffer de fosfato de sódio com pH 7.4 contendo KCL (1:10, w/v). A homogeneização foi centrifugada a 3500 rpm durante 10 minutos na temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi imediatamente retirado e utilizado para as determinações bioquímicas.

### **3.8.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS)**

A formação de ROS foi determinada de acordo com o método empregado por Ali et al. (1992), com algumas modificações. Neste ensaio, a oxidação do diacetato de diclorodi-hidrofluoresceína (DCFH-DA) em diclorofluoresceína fluorescente (DCF) foi medida para a detecção de ROS intracelulares. Os níveis de EROs foram expressos como  $\mu\text{mol DCF} / \text{mg de proteína}$ .

### **3.8.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Para a determinação da peroxidação lipídica, os níveis de TBARS foram medidos de acordo com o método descrito por Ohkawa et al. (1979) e relatados como  $\text{nmol TBARS} / \text{mg de proteína}$ .

### **3.8.4 Sulfidrilas (SH)**

As sulfidrilas foram medidas de acordo com Aksenov and Markesbery (2001) cuja técnica é baseada na redução de DTNB pelos tióis que por sua vez, se tornam oxidados (dissulfeto) gerando um derivado amarelo (TNB) cuja absorção é medida espectrofotometricamente a 412 nm. Resumidamente, os homogenatos foram adicionados a tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA. A reação foi iniciada pela adição de ácido 5,5-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). Os resultados foram relatados como  $\text{nmol TNB por mg de proteína}$ .

### **3.8.5 Atividade de superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi medida pelo método descrito por Misra & Fridovich (1972) e a atividade específica é relatada como  $\text{unidades} / \text{mg de proteína}$ .

### **3.8.6 Atividade de Catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi avaliada de acordo com o método descrito por Aebi (1984) baseado na decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  monitorada a 240 nm à temperatura ambiente. A atividade específica é relatada como  $\text{unidades} / \text{mg de proteína}$ .

## **3.9 Análise do efeito dos extratos sobre as estruturas do fungo *S. brasiliensis***

Com o intuito de avaliar a interação dos extratos de *O. vulgare* sobre a parede celular de *S. brasiliensis* desenvolveu-se o ensaio de sorbitol com o auxílio do Laboratório de

Micologia Aplicada da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Para tal, seguiu-se a metodologia empregada por MOREIRA et al. (2010) e CARRASCO et al. (2012). As determinações das CIMs dos extratos e antifúngico selecionado (Anidulafungina) foram conduzidas sem e com adição de sorbitol (Sigma-Aldrich) na concentração de 0.8 M. O sorbitol comercial foi dissolvido no próprio meio de cultura (meio RPMI 1640, contendo *L*-glutamina, sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich). Incubou-se as microplacas até 168 h a 30 °C (estufa DE LEO). A CIM foi determinada visivelmente pela ausência ou presença de crescimento fúngico, comparado com o controle sem tratamento.

Realizou-se uma leitura das placas com 3 dias e outra com 7 dias. Para a determinação do efeito antifúngico, conforme a CLSI (M38-A2; 2008; p. 26 – Appendix A, MECs of Caspofungin and Anidulafungin), determinou-se a concentração efetiva mínima (CEM), que é a menor concentração do agente antifúngico que leva ao crescimento de hifais pequenas, arredondadas e compactas, comparadas com o controle sem tratamento. Essa terminologia é usada para as equinocandinas. O ensaio foi realizado em duplicata.

### **3.10 Análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno (ensaio do ergosterol qualitativo)**

A metodologia empregada foi realizada segundo MOREIRA et al. (2010) e CARRASCO et al. (2012). Nesse ensaio as determinações das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos extratos e antifúngico (Anfotericina B) selecionado foram conduzidas sem e com adição de ergosterol (Sigma-Aldrich), nas concentrações de 50.0 a 200.0 µg.mL<sup>-1</sup>. O ergosterol comercial foi dissolvido em dimetilformamida (Sigma-Aldrich) e diluído no meio de cultura (meio RPMI 1640, contendo *L*-glutamina, sem bicarbonato de sódio, com 2 % de glicose, tamponado a pH 7.0 com MOPS 0.165 mol.L<sup>-1</sup>; Sigma-Aldrich), de forma que a concentração final do solvente orgânico fosse de 0.1%. Incubaram-se as microplacas até 168 h (7 dias) a 30 °C (estufa DE LEO). A CIM foi determinada visivelmente pela ausência ou presença de crescimento fúngico, comparado com o controle sem tratamento. Realizou-se uma leitura das placas em 3 dias e outra em 7 dias. O ensaio foi realizado em duplicata.

### **3.11 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, E.U.A.). As variáveis paramétricas foram testadas pelo one-way ANOVA, pelo teste de Tukey e pelo teste post hoc de Bonferroni, com  $P < 0,05$  considerado representar uma diferença significativa na análise.

## 4 Resultados e Discussão

Dez dias após a inoculação, deu-se início a administração dos diferentes tratamentos nos animais experimentais. Nesse momento (dia zero), realizou-se uma avaliação clínica de todos animais, sendo possível observar que todos os animais apresentavam edema no membro posterior esquerdo, aumento no linfonodo poplíteo, presença de secreção purulenta no ponto de inoculação e dificuldade de locomoção. Segundo a literatura, a presença de secreção purulenta e lesões nodulares indicam o desenvolvimento da esporotricose experimental (ANTUNES et al., 2009). As avaliações clínicas foram mantidas durante todo o período experimental, semanalmente os animais eram avaliados quanto a formação de edema e a dificuldade de locomoção e classificados em graus, sendo o mais grave considerado três cruzes (+++) e o mais leve uma cruz (+). Os resultados da avaliação no decorrer das semanas de tratamento são apresentados nas figuras de 1.

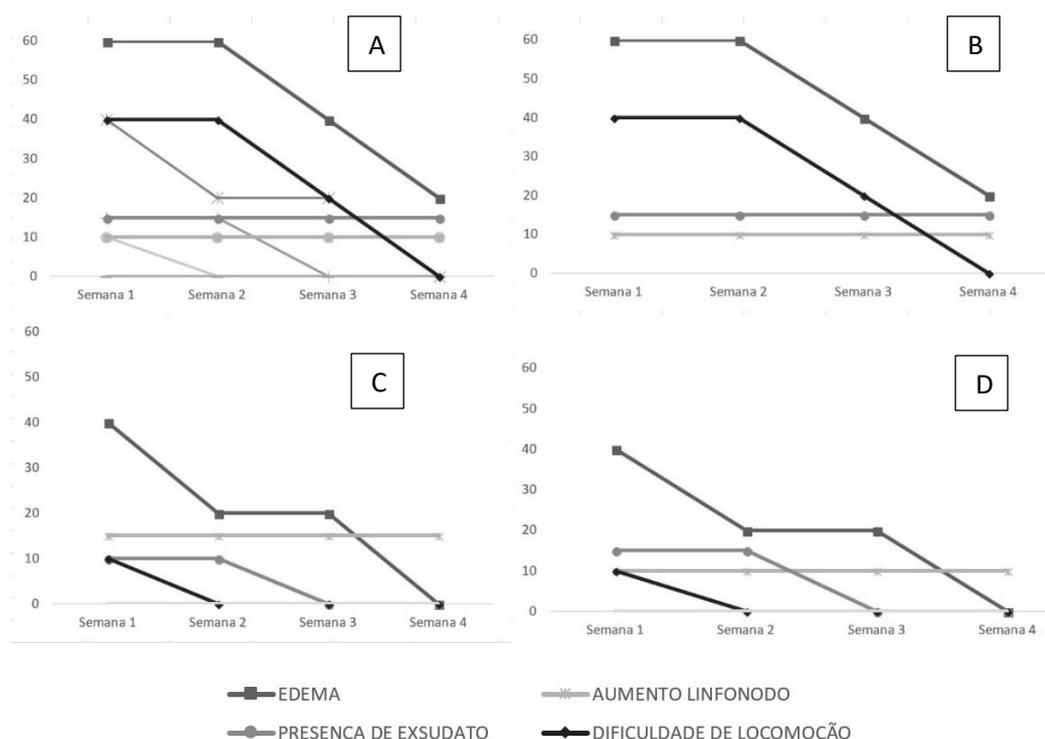


Figura 1. Evolução da avaliação clínica ao longo das 4 semanas de tratamento dos animais nos diferentes grupos. A:CONT; B:ITRA; C: OEO; D: OEOI

De acordo com a avaliação clínica (Figuras 1) podemos observar que os animais pertencentes aos grupos OEO e OEOI ao final do tratamento, apresentaram remissão do edema, assim como ocorrência de cicatrização no local de inoculação. Entretanto, os grupos ITRA e CONT não apresentaram desaparecimento total dos sinais observados inicialmente, havendo melhora na dificuldade de locomoção. Segundo a literatura, animais com esporotricose cutânea experimental, tratados com itraconazol, tendem a ter a lesão cicatrizada ao final de 30 dias (ANTUNES et al., 2009), fato não observado durante o estudo, uma vez que mesmo depois de 30 dias de tratamento, os animais tratados com itraconazol ainda apresentavam lesões no ponto de inoculação, edema no membro e aumento do linfonodo poplíteo.

O isolado utilizado para o estudo tratou-se de um isolado felino armazenado na micoteca (MicVet – UFPel), tendo como característica ser resistente ao itraconazol in vitro e produtor de melanina. A capacidade de produzir melanina por parte dos isolados de *Sporothrix* tem sido descrita como um importante fator de virulência (MARIO et al., 2016; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000) Estudos in vitro, avaliando a sensibilidade de isolados humanos e animais, vem descrevendo a existência de uma resistência maior por parte dos isolados de animais, especialmente de isolados de felinos em relação aos de humanos (MARIMON et al., 2007; MEINERZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Outro fator importante que determina o surgimento de resistência é o uso indiscriminado de antifúngico (SCHUBACH et al., 2004). Ao avaliar a suscetibilidade in vitro de isolados de fungos do complexo *Sporothrix schenckii* pertencentes aos estados do RS, RJ, MG e SP frente ao itraconazol, Stopiglia e colaboradores (2014) confirmaram a existência de isolados resistentes no estado do Rio Grande do Sul (STOPIGLIA et al., 2014).

Em decorrência da escassez de estudos, ainda se sabe pouco a respeito dos fatores de virulência do *Sporothrix* spp., parte por não ser possível realizar estudos genéticos clássicos em *Sporothrix* spp. uma vez que a fase teleomórfica ainda é desconhecida. No entanto, alguns prováveis fatores de virulência têm sido propostos, como a termotolerância, a atividade proteolítica, a produção de urease, produção de adesinas, existência do peróxido de ergosterol e a presença de melanina (FREITAS, 2014).

Durante as quatro semanas de tratamento os grupos OEO, OEOI, EHA1 e o CONT apresentaram um ganho de peso crescente a cada semana. Entretanto, o que chamou a atenção é o fato de que o grupo EHA, que era o grupo com menor média

de peso no início do experimento, com o decorrer das semanas foi o grupo que apresentou a maior média de ganho de peso no final do estudo (Figura 2). Em contrapartida, o grupo tratado com o antifúngico comercial itraconazol mostrou um comportamento discrepante uma vez que, na última semana de tratamento, os animais apresentaram uma queda no ganho de peso. Segundo a literatura, um dos efeitos adversos observados com o uso do itraconazol em gatos, é a perda de peso e apatia (PEREIRA et al., 2009). Este efeito pode ter sido contornado nos animais tratados com a associação de extratos e itraconazol, pois a perda de peso não foi observada nestes grupos, nem nos grupos onde o extrato foi administrado sozinho pode-se observar a sua presença.

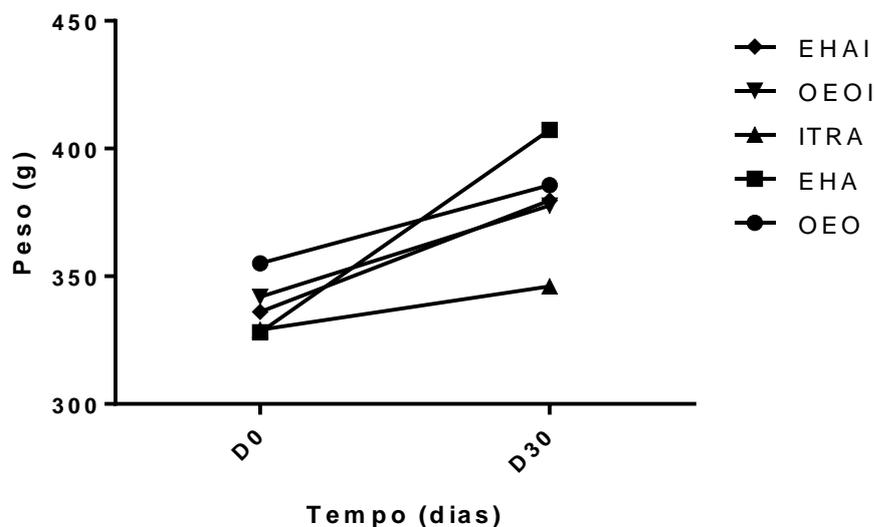


Figura 2. Média dos pesos no início e no fim do tratamento.

Com relação a avaliação hematológica, durante todo o período de tratamento, nenhum animal apresentou alterações na série vermelha, tendo valores dentro da normalidade. Alterações como anemia, elevação dos níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT), redução do hematócrito, da hemoglobina e da contagem de hemácias, foram descritas em ratos com esporotricose experimental sistêmica (MEINERZ et al., 2008). O fato de nosso estudo não ter apresentado valores alterados na série vermelha, pode ser atribuído ao fato de que a esporotricose foi induzida para se manifestar de forma cutânea e não sistêmica, forma menos invasiva e que pode não causar alterações a nível de série vermelha.

Como valores de referência de ureia e creatinina foram utilizados 31-48mg/dL e 0,2-0,3mg/dL, respectivamente. Todos os grupos mantiveram os níveis de ureia e

creatinina dentro dos valores fisiológicos durante todo o período de tratamento, não divergindo estatisticamente entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos parâmetros de ureia e creatinina durante os 30 dias de tratamento nos diferentes grupos.

	<b>UREIA</b> <b>(Média±desvio</b> <b>padrão)</b>	<b>CREATININA</b> <b>(Média±desvio</b> <b>padrão)</b>
<b>CONT</b>	41,12 ± 2,29	0,25 ± 0,05
<b>OEO</b>	42,25 ± 4,57	0,25 ± 0,05
<b>OEOI</b>	43,62 ± 6,90	0,27 ± 0,05
<b>EHA</b>	43,67 ± 6,88	0,23 ± 0,05
<b>EHA1</b>	39,67 ± 6,10	0,2
<b>ITRA</b>	42,50 ± 5,98	0,24 ± 0,05

Para avaliar a função hepática dos animais, foram analisadas as enzimas AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina aminotransferase). Os valores de referência, segundo o *Canadian Council on Animal Care* – CCAC (2011), utilizados foram para AST: 39 a 92 U/L e para ALT: 17-50 U/L. Todos os animais mantiveram valores da enzima ALT dentro do padrão esperado para a espécie, porém, a enzima AST teve seu valor aumentado em todos os grupos, durante as quatro semanas de tratamento.

Um estudo avaliando o perfil hematológico e bioquímico de animais com esporotricose experimental sistêmica também documentou a alteração de ALT, sendo sua causa atribuída também a disseminação do agente através do parênquima hepático (MEINERZ et al., 2008). A literatura ressalta que a ALT é um indicador mais sensível de hepatotoxicidade do que a AST, uma vez que a presença da última pode ser detectada em todos os tecidos corporais, tais como fígado, coração, músculo esquelético, rins, dentre outros (REIS et al., 2011). Entretanto, os resultados diferem de Coqueiro e colaboradores (2012) que ao avaliar o efeito da infusão de *O. vulgare* no perfil bioquímico de ratos Wistar, não observou nenhuma alteração significativa nos níveis de AST e ALT no grupo tratado durante 30 dias com o produto.

Com relação a série branca, os valores de referência adotados foram, para leucócitos totais, de 4-12x10<sup>3</sup>/μL (PAIVA et al., 2005). A tabela 7 mostra os valores de

leucócitos totais obtidos durante as quatro semanas de tratamento nos diferentes grupos experimentais.

Conforme podemos observar com os resultados apresentados na figura 3, os animais do grupo controle apresentavam leucocitose durante as quatro semanas de tratamento. Já os grupos tratados com óleo essencial de *O. vulgare* associado com itraconazol e extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* apresentaram leucocitose nas duas primeiras semanas de tratamento, voltando aos níveis fisiológicos a partir da terceira semana de tratamento e mantendo-se assim até o final do experimento. O grupo tratado com itraconazol apresentou leucocitose na primeira e na quarta semana de tratamento, enquanto o grupo tratado com a associação de itraconazol com extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* apresentou leucocitose somente na primeira semana de tratamento. O grupo tratado com o óleo essencial de *O. vulgare* foi o único a não apresentar nenhuma alteração na série branca durante todo o período de tratamento. Em um estudo conduzido onde foram avaliados 15 felinos com esporotricose, pode-se observar que 73,3% dos animais apresentaram alterações na série branca e/ou vermelha, sendo estas, principalmente, leucocitose por neutrofilia e anemia (MADRID; MATTEI; TELES; et al., 2012).

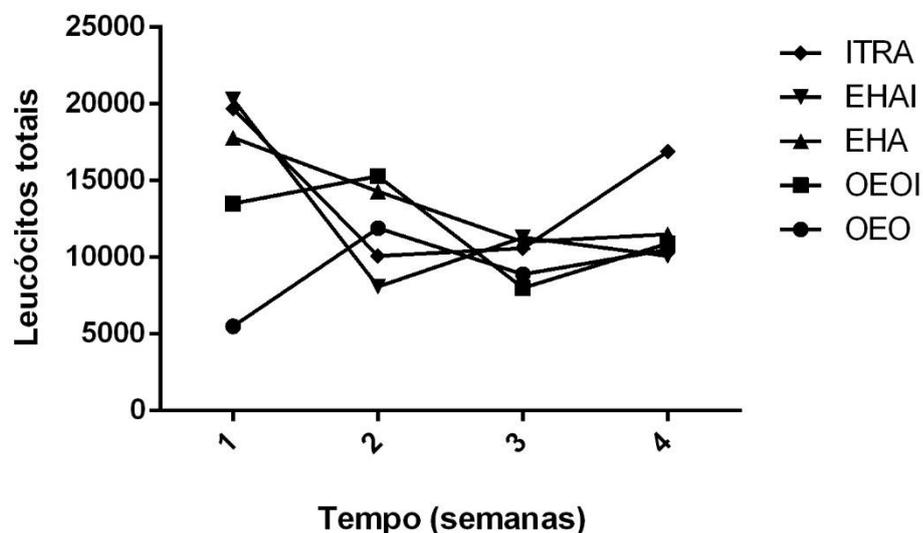


Figura 3. Valores médios de leucócitos totais para os diferentes tratamentos durante as quatro semanas de acompanhamento.

Durante as necropsias, observamos diversas alterações macroscópicas, como presença de pontos esbranquiçados, degeneração e aspecto friável nos rins, fígado (Figura 4A) e baço dos animais. A avaliação histopatológica dos órgãos nos mostrou que as alterações observadas macroscopicamente como pontos esbranquiçados e degeneração foram classificadas microscopicamente como sendo presença de granulomas multifocais, infiltrado mononuclear e presença de células fúngicas (Figura 4B). Os grupos de animais OEO e EHA não apresentaram nenhuma alteração microscópica em rins, fígado e baço durante todo o experimento. Lesões do tipo piogranulomatosas e granulomatosas são descritas como clássicas nos casos da esporotricose (ANTUNES et al., 2009; FONTES et al., 2016; MADRID et al., 2007).

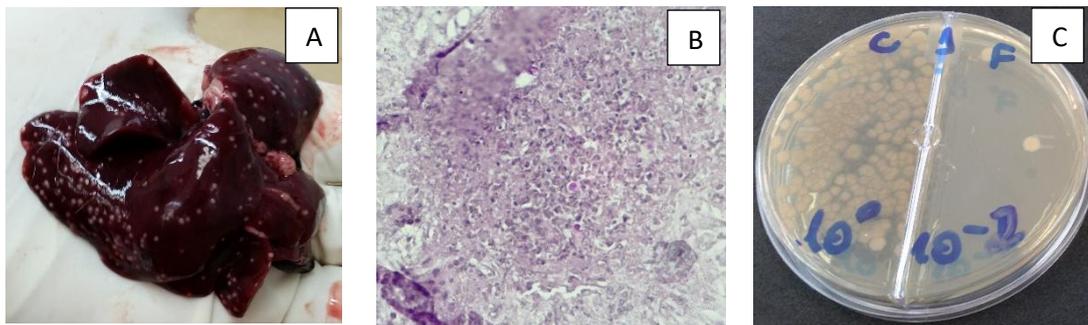


Figura 4. Lesões observadas no fígado dos animais do grupo controle. A: Macroscopicamente; B: microscopicamente; C: retroisolamento

Os achados histopatológicos dos coxins plantares dos grupos CONT, ITRA, OEO, OEOI, EHA e EHA nos revelaram que, mesmo depois de 4 semanas de tratamento, todos os grupos experimentais apresentavam células fúngicas no coxim plantar (ponto de inoculação), diferentemente do observado em um estudo realizado avaliando a ação do itraconazol e da terbinafina frente a esporotricose experimental cutânea, onde foi possível observar a remissão das lesões e o desaparecimento das estruturas fúngicas no grupo tratado com itraconazol (ANTUNES et al., 2009). Além disso, todos os grupos apresentaram área focal extensa de infiltrado piogranulomatoso e necrose.

É importante ressaltar que, apesar de existir a presença de infiltrado piogranulomatoso e estruturas fúngicas nos coxins dos animais pertencentes aos grupos tratados com o óleo essencial (EHA e OEO), o tratamento foi eficaz na

prevenção da disseminação do agente para órgãos como fígado, rins e baço, não ocorrendo o mesmo nos demais grupos estudados.

Mesmo sendo efetivo o tratamento com itraconazol, em muitos pacientes felinos, casos de falha terapêutica têm sido descritos (GREMIÃO et al., 2011; SCHUBACH et al., 2004). Crothers e colaboradores (2009) descreveram um caso de um felino com esporotricose, com lesões localizadas na região nasal, tratado com itraconazol, por via oral na dose de 10 mg/kg/dia, por um período de 4 anos. Segundo Malik et al. (2004), micoses localizadas na região nasal nos felinos são de difícil cura. A falha terapêutica também vem sendo associada ao uso indiscriminado do itraconazol nas clínicas médicas humanas e veterinárias (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004; MEINERZ et al., 2007).

O abandono e a solicitação de eutanásia do paciente por parte dos tutores, são fatores que também são comumente observados, principalmente pelo fato de que existe um longo período de tratamento, além da possibilidade de aquisição da doença por um membro da família (PEREIRA et al., 2009; SCHUBACH et al., 2004)

O retroisolamento do *Sporothrix brasiliensis* nos órgãos coletados ocorreu nos diferentes grupos no decorrer das semanas conforme ilustrado nos gráficos a seguir (Figura 5). Essa espécie é resultante de um desdobramento clonal da espécie *Sporothrix schenckii* sensu stricto e é considerada a mais patogênica dentro do complexo (FERNANDES et al., 2013). Borba-Santos et al. (2015) ao avaliarem a atividade *in vitro* de inúmeros isolados de *S. brasiliensis* frente ao itraconazol observaram que isolados recentes (2011-2012) apresentaram valores maiores de CIM e CFM que isolados obtidos antes de 2004, sugerindo a ocorrência de alterações que tornaram o microrganismo resistente aos antifúngicos utilizados para o tratamento da micose.

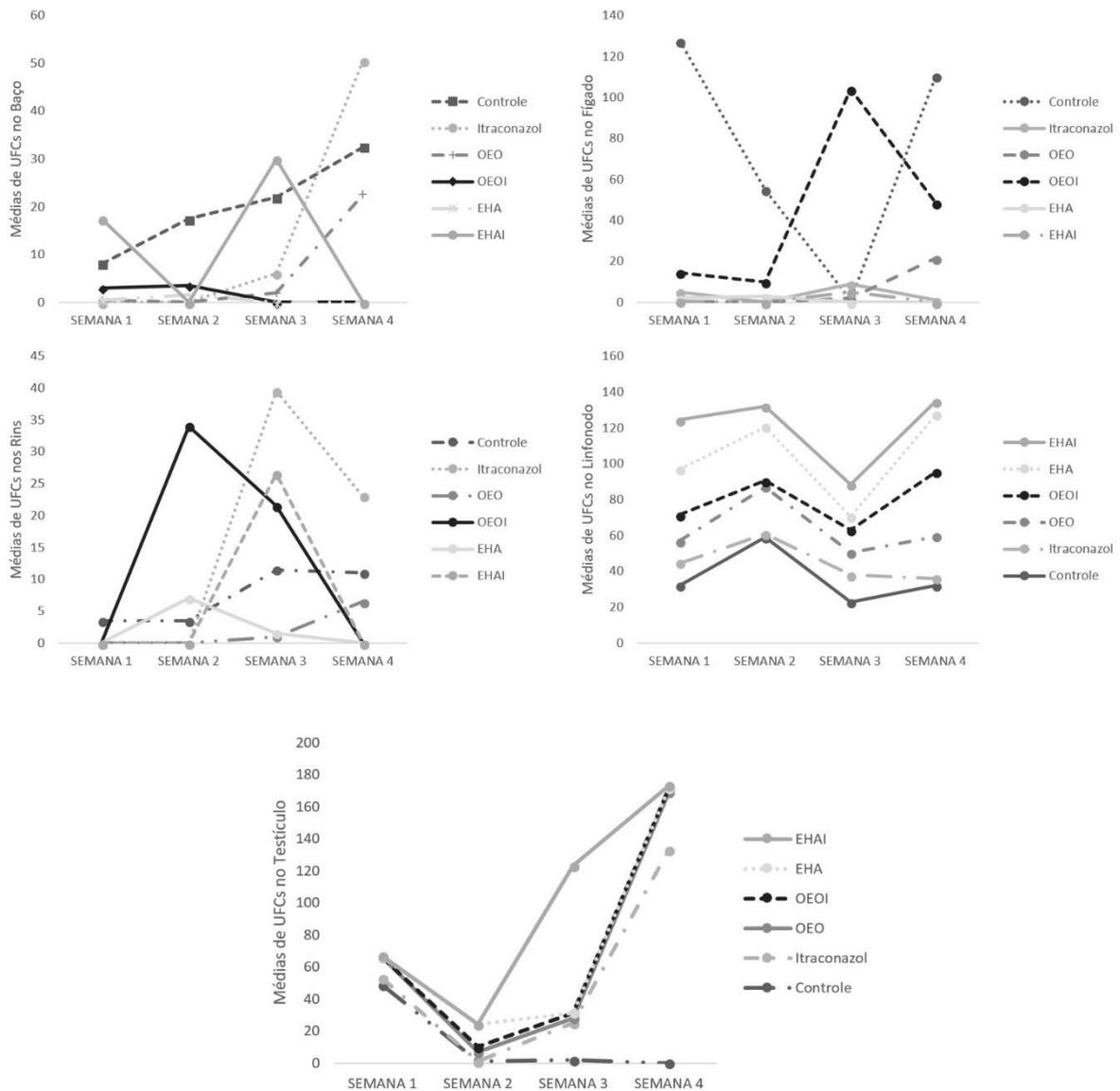


Figura 5. Média de unidades formadoras de colônias nos diferentes órgãos coletados durante as 4 semanas de tratamento

Não existe valores de CIM e CFM padronizados para o itraconazol frente ao *S. brasiliensis* porém diversos autores consideram o microrganismo sensível ao fármaco quando os valores de CIM são menores ou iguais a  $1\mu\text{g}/\text{mL}$  (MCGINNIS et al., 2001; MEINERZ et al., 2007; REX et al., 2001).

Nas últimas décadas, houve um ressurgimento do interesse nas plantas como fontes de novos agentes terapêuticos. Neste sentido a pesquisa com extratos vegetais, tem obtido destaque, uma vez que os resultados demonstram atividade de diversas plantas em fungos de importância veterinária (CLEFF et al., 2008).

A ação antifúngica de extratos de *Origanum vulgare*, principalmente na forma de óleo essencial, vem sendo avaliada e comprovada por diversos autores (CASTRO et al., 2013; CLEFF et al., 2008, 2013; SANTIN et al., 2014). Através de testes de toxicidade, foi possível observar que, quando administrado por via oral, o óleo essencial de *O. vulgare*, na concentração de 3%, não possui efeitos tóxicos e é considerado seguro para a administração, não sendo recomendado para machos e fêmeas em fase reprodutiva (HOLLENBACH, 2013).

Concomitantemente com os estudos acerca de sua ação e de seus efeitos no organismo, vem-se tentando elucidar quais seriam os principais componentes que estão envolvidos na sua ação, para tal, se faz necessário a análise dos constituintes através da cromatografia. A análise cromatográfica do óleo essencial de *O. vulgare* utilizado neste estudo demonstrou a presença de 15 compostos, destacando-se o  $\gamma$ -terpinene (pico 11), 4-terpineol (pico 17),  $\alpha$ -terpineol (pico 18) e Hidroxy-p-cymene (pico 24) (Fig. 6). Seus componentes bioativos tem atividade antimicrobiana bem documentada, com atividade inibitória contra bactérias e fungos, incluindo *Sporothrix* spp. (LIS-BALCHIN et al., 1998; DELAQUIS et al., 2002; SAGDIÇ & ÖZCAN, 2003; NAZER et al., 2005 ; SEYDIM & SARIKUS, 2006 ; CLEFF et al., 2010).

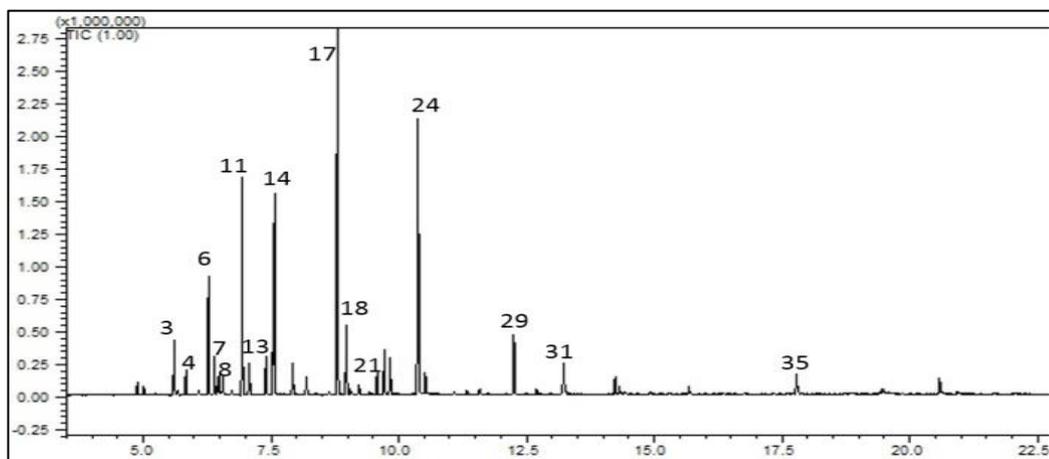


Figura 6. Cromatograma do óleo essencial de *O. vulgare*.

Sabe-se que os óleos essenciais são compostos por uma mistura variável de terpenoides e hidrocarbonetos de baixo peso molecular, como: álcoois, aldeídos, ácidos, cumarinas, entre outros (BLANK et al., 2016). Fenóis, como carvacrol, timol, gamaterpeno e p-cimeno, representam 70,2% a 98% dos compostos ativos do óleo

de *O. vulgare* (BAMPIDIS et al., 2005) porém, estudos demonstram que a atividade antimicrobiana não se deve somente à presença de carvacrol e timol, mas a presença de outros componentes que, em baixas concentrações, podem provocar interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas (CHORIANOPOULOS et al., 2004).

(BAYDAR et al., 2004) ao testarem dois óleos essenciais de *O. vulgare*, um com 53% de carvacrol e timol e outro com 87%, observaram que o com menor concentração destes constituintes apresentou uma ação antimicrobiana mais efetiva, sendo atribuída a presença de p-cimeno e  $\gamma$ -terpineno, quando comparado ao óleo que apresentava maior concentração de timol e carvacrol. (ULTEE et al., 2000) afirma que, quando utilizado isoladamente, o p-cimeno não tem efeito antibacteriano, porém, se combinado ao carvacrol, ocorre um sinergismo entre os dois, potencializando o efeito do carvacrol.

Os resultados da análise do efeito sobre a parede celular fúngica demonstrou que tanto o óleo quanto o extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* não possuem ação inibida pelo sorbitol, conseqüentemente podemos afirmar que estes produtos não agem a nível de parede celular, pelas condições avaliadas nesse experimento, uma vez que foi observada a mesma leitura de CIM tanto na presença como na ausência de sorbitol em todas as leituras. Para podermos afirmar que o produto age a nível de parede celular, a CIM de uma substância que age na parede aumente na presença de sorbitol, já que o mesmo realiza um processo de proteção osmótica da parede celular fúngica (FROST et al., 1995).

Já a partir dos resultados obtidos com o ensaio do ergosterol qualitativo, pudemos concluir que tanto o óleo essencial de *O. vulgare* quanto o extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* agiram a nível de complexação com o ergosterol, uma vez que os resultados das duas leituras apresentaram um aumento de 4 vezes da CIM, quando na presença de ergosterol na maior concentração (200  $\mu\text{g/mL}$ ), conforme mostra a tabela 2. O ergosterol é o principal esteroide das leveduras e muitos outros fungos, modulando a fluidez da membrana e evitando suas alterações, além de regular o crescimento e proliferação fúngica (GEORGOPAPADAKOU et al., 1987).

Tabela 2 - Leitura das CIM referentes a análise do efeito de complexação com ergosterol exógeno

	1ª LEITURA (3 dias)					2ª LEITURA (7 dias)				
	CIM1	CIM 2	CIM 3	CIM 4	CIM5	CIM1	CIM 2	CIM 3	CIM 4	CIM5
OEO	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28	0,07	0,07	0,07	0,07	0,28
EHA	5	5	10	20	> 20	5	5	10	20	> 20
ANFO	1	16	> 256	> 256	> 256	1	> 256	> 256	> 256	> 256

CIM1 corresponde a CIM sem adição de ergosterol comercial; CIM2, CIM3, CIM4 e CIM5, correspondem a CIM com adição de ergosterol na concentração de 50 µg/mL, 100 µg/mL, 150 µg/mL e 200 µg/mL, respectivamente. CIM dos produtos em mg/mL e CIM da anfotericina B em µg/mL.

Este teste consiste em detectar se um composto atua por ligação ao ergosterol da membrana dos fungos, para isso é fornecido ergosterol exógeno às substâncias-teste, que, uma vez possuindo afinidade por esteróis, formam rapidamente um complexo com o ergosterol comercial fornecido, evitando-se assim a complexação com o ergosterol próprio da membrana celular fúngica; como consequência, há um aumento da CIM para esses compostos, conforme observado nos nossos resultados (CARRASCO et al., 2012).

Couto et al. (2015) ao avaliarem a ação in vitro do óleo essencial de *O. vulgare* frente a isolados de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, através da utilização de técnicas de microscopia eletrônica, observaram que, o óleo essencial causa alterações morfológicas na estrutura fúngica similar ou até mesmo maiores que as observadas nas drogas como anfotericina B e cetoconazol.

Sabe-se que a anfotericina B é capaz de formar complexos com o ergosterol, causando a formação de poros na membrana que resultam em perda de sua integridade e rápido extravasamento de potássio e outros íons, ocasionando a morte celular (LEMKE et al., 2005). A partir dos resultados obtidos com este teste pode-se dizer que o óleo essencial de *O. vulgare* em questão foi capaz de atuar no ergosterol da membrana fúngica, levando a morte da célula fúngica em questão.

Os níveis de CAT, TBARS, SOD, ROS, SH e Nitrito se mantiveram sem diferirem estatisticamente entre si ( $p>0.05$ ) em todos os grupos experimentais (Figura 7).

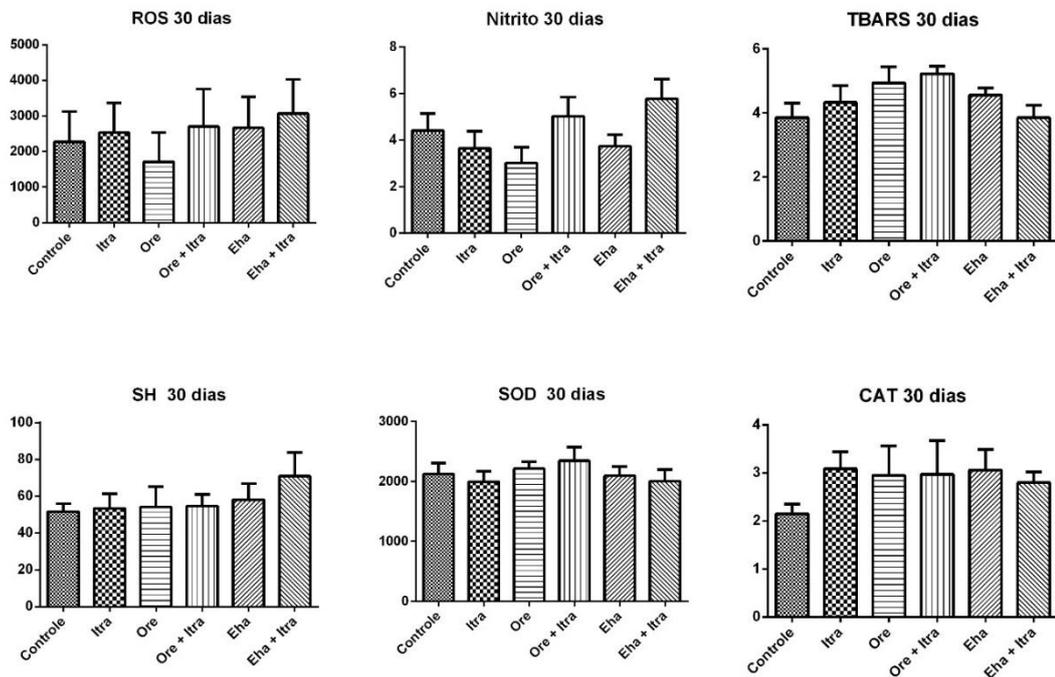


Figura 7. Níveis de ROS, Nitrito, TBARS, SH, SOD e CAT após 30 dias de tratamento em ratos inoculados com *S. brasiliensis*

O estresse oxidativo desempenha um papel importante dentro da patogenicidade de diversas doenças infecciosas (CASTRO et al., 2017). Um estudo avaliando a existência de estresse oxidativo em ratos inoculados com *Sporothrix schenckii* demonstrou que os níveis de TBARS, CAT e SOD tiveram aumento significativo apenas 40 dias pós infecção.

As análises das citocinas foram processadas até a etapa de transformação em cDNA, os primers para fazer o RT-PCR foram encomendados, porém até a data da entrega do material escrito ainda não haviam chegado impossibilitando sua conclusão, que será realizada assim que possível.

## 5 Considerações Finais

Ao acompanhar a evolução clínica dos animais com esporotricose experimental cutânea causada pelo *S. brasiliensis*, pudemos concluir que, os animais tratados com o óleo essencial de *O. vulgare*, óleo essencial de *O. vulgare* associado ao itraconazol, extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* e extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* associado ao itraconazol apresentaram remissão do edema, assim como ocorrência de cicatrização no local de inoculação. Entretanto, o grupo tratado com itraconazol e o grupo controle não apresentaram desaparecimento total dos sinais observados inicialmente, indicando a não remissão clínica da doença.

Ao final do experimento, com os dados obtidos observamos que, os animais pertencentes aos grupos tratados com o extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* e com o óleo essencial de *O. vulgare* não apresentaram nenhuma alteração microscópica em rins, fígado e baço durante todo o experimento, diferentemente dos animais dos demais grupos experimentais, indicando assim um possível efeito dessa planta impedindo a disseminação da doença.

Pudemos concluir também que, tanto o óleo essencial quanto o extrato hidroalcoólico utilizados no experimento agem a nível de complexação do ergosterol, mecanismo de ação similar com o observado na anfotericina B.

Não houve nem o impedimento do surgimento, nem o agravamento do estresse oxidativo gerado na esporotricose com o uso dos diferentes tratamentos durante o tempo de avaliação da doença.

## Referências

- ABREU, Daniel Paiva Barros. **Caracterização fenotípica, genotípica e perfil de sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos de cães e gatos pertencentes ao Complexo *Sporothrix schenckii* oriundos do estado do Rio de Janeiro**. 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- ALMEIDA, L. G. F.; ALMEIDA, V. G. F. UMA REVISÃO INTERDISCIPLINAR DA ESPOROTRICOSE. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 4, n. 2, p. 171–179, 2015.
- ALMEIDA, R. B. DE; SCHEFFER, T. P. Estudo Sobre a Utilização de Recursos Vegetais com Potencial Terapêutico. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 5, n. 1, p. 59–71, 2012.
- ANTACHOPOULOS, C.; ROILIDES, E. Cytokines and fungal infections. **British Journal of Haematology**, v. 129, n. 5, p. 583–596, 2005.
- ANTUNES, T. A.; NOBRE, M. O.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; MARTINS, A. F.; CLEFF, M. B.; FERNANDES, C. G.; MEIRELES, M. C. A. Esporotricose cutânea experimental: Avaliação in vivo do itraconazol e terbinafina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 6, p. 706–710, 2009.
- BAMPIDIS, V. A.; CHRISTODOULOU, V.; FLOROU-PANERI, P.; et al. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. **British Poultry Science**, v. 46, n. 5, p. 595–601, 2005.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BARROS, M. B. DE L.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633–654, 2011.
- BARROS, M. B. DE L.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; et al. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, p. 455–460, 2010.
- BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169–172, 2004.

BEIGH, S. A.; SOODAN, J. S.; SINGH, R.; KHAN, A. M.; DAR, M. A. Evaluation of trace elements, oxidant/antioxidant status, vitamin C and  $\beta$ -carotene in dogs with dermatophytosis. **Mycoses**, v.57, p 358-365, 2013.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; BARROS, M. DE L.; ZEITUNE, T.; et al. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 28–33, 2015.

BLANK, D. E.; ALVES, G. H.; FREITAG, R. A.; et al. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE DE *Origanum vulgare* L. E *Rosmarinus officinalis* L. **SCIENCE AND ANIMAL HEALTH**, v. 4, n. 2, p. 117–130, 2016.

BODEY, G. P. Azole Antifungal Agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. Supplement 1, p. S161–S169, 1992.

BRASIL. Decreto nº 5813, de 14 de setembro de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília.

BRAUNWALD, E.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L.; et al. **Medicina Interna de Harrison**. 18º ed., v. 2. Brasil: Amgh Editora, 2013.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 2, n. 1, p. 85–94, 2004.

CARVALHO, B. T. C.; NUDELMAN, V.; CARNEIRO-SAMPAIO, M. M. S. Mecanismos de defesa contra infecções. **Journal of Pediatric**, v. 74, n. 1, p. 3–11, 1998.

CASTRO, L. L. D. DE; MADRID, I. M.; AGUIAR, C. L. G.; et al. *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 4, p. 508–513, 2013.

CASTRO, V. S. P.; DA SILVA, A. S.; THOMÉ, G. R.; et al. Oxidative stress in rats experimentally infected by *Sporothrix schenckii*. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 1–5, 2017.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; et al. Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8261–8267, 2004.

CLEFF, M. B.; MADRID, I.; MEINERZ, A. R.; et al. Essential oils against *Candida* spp: in vitro antifungal activity of *Origanum vulgare*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 20, p. 2245–2250, 2013.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; SCHUCH, L. F. D.; et al. Atividade in vitro do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 513–526, 2008.

COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A.; QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v. 49, n. 8, p. 785–798, 2011.

CORRÊA, A. D.; BATISTA, R. S.; QUINTAS, L. E. M. **Plantas medicinais: do cultivo à terapêutica: contém formulação e modo de preparo de cosméticos**. Vozes. 2003. 247 p.

COSTA, A. C. DA; SANTOS, B. H. C. DOS; SANTOS FILHO, L.; LIMA, E. DE O. Antibacterial activity of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) against bacterial multiresistant strains isolated from nosocomial patients. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 236–241, 2009.

COUTO, C. S. F.; RAPOSO, N. R. B.; ROZENTAL, S.; et al. Chemical composition and antifungal properties of essential oil of *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 1207–1212, 2015.

DINARELLO, C. A. Introduction to the interleukin-1 family of cytokines and receptors: Drivers of innate inflammation and acquired immunity. **Immunological Reviews**, v. 281, n. 1, p. 5–7, 2018.

DIXON, D. M.; SALKIN, I. F.; DUNCAN, R. A.; et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 1106–1113, 1991.

DIXON, J. M.; DOBIE, V.; LAMB, J.; WALSH, J. S.; CHETTY, U. Assessment of the acceptability of conservative management of fibroadenoma of the breast. **British Journal of Surgery**, v. 83, n. 2, p. 264–265, 1996.

DONADEL, K. W.; REINOSO, Y. Y. D.; OLIVEIRA, J. C.; AZULAY, R. D. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 68, n. 11, p. 45–52, 1993.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista MultiCiência**, v. 7, p. 17, 2006.

FERNANDES, G. F.; SANTOS, P. O. DOS; RODRIGUES, A. M.; et al. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241–249, 2013.

FONTES, S. D.; SILVA, A. S. A.; PORTILHO, C. A. ESPOROTRICOSE – REVISÃO DE LITERATURA. **ANAIS SIMPAC**, v. 6, n. 1, 2016.

FREITAS, Dayvison Francis Saraiva. **Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos associados à esporotricose**. 2014. 148f. Tese (Doutorado em Medicina) Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

FREITAS, M. A.; ANDRADE, J. C.; GUEDES, G. M. M.; et al. AVALIAÇÃO In Vitro DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CARVACROL ATRAVÉS DOS MÉTODOS DE CONTATO DIRETO E GASOSO. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 3, p. 781–786, 2013.

GRAM, D. Esporotricose. **Consulta Veterinária em 5 minutos**. 1ª edição Brasileira ed., p.1210. São Paulo: Manole Ltda, 2003.

GREMIÃO, I.; SCHUBACH, T.; PEREIRA, S.; et al. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 9, p. 346–351, 2011.

GUTERRES, K. A. **Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GUTERRES, K. A.; MATOS, C. B. DE; OSÓRIO, L. D. G.; SCHUCH, I. D.; CLEFF, M. B. The Use of (1–3)  $\beta$ -Glucan Along with Itraconazole Against Canine Refractory Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3–4, p. 217–221, 2014.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469–488, 1996.

HOLLENBACH, Clarissa Boemler. **Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em ratos Wistar**. 2013. 94f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

JOHNSON, E. M.; WARNOCK, D. W. Azole drug resistance in yeasts. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 36, n. 5, p. 751–755, 1995.

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. **Food Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 245–250, 2001.

KUSHNER, I. Semantics, Inflammation, Cytokines and Common Sense. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 9, n. 3–4, p. 191–196, 1998.

LACAZ, C. DA S. Aspectos Clínicos e Epidemiológicos das Micoses Profundas Na América do Sul. **Mycopathologia et mycologia applicata**, v. 10, n. 4, p. 355–378, 1959.

- LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, 2005.
- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. **Revista Fitos**, n. 3, p.14-24, 2007.
- LOPES, J. O.; ALVES, S. H.; MARI, C. R.; et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 541–545, 1999.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2ª ed. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.
- LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Rev Med São Paulo**, v. 21, p. 433–450, 1907.
- LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. Systemically Administered Antifungal Agents. **Drugs**, v. 44, n. 1, p. 9–35, 1992.
- MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; SANTIN, R.; et al. Inhibitory effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine digluconate in clinical isolates of *Sporothrix schenckii*. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 281–285, 2012.
- MADRID, I. M.; MATTEI, A. S.; TELES, A. J.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A. Alterações hematológicas em felinos com esporotricose cutânea. **Arquivos de Ciências Veterinária e Zoologia da UNIPAR**, v. 15, n. 1, p. 33–35, 2012.
- MADRID, I. M.; OLIVEIRA, D. M.; NETO, F. M. S. Ações de vigilância e controle da esporotricose zoonótica na cidade de Pelotas, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, n. 1, p. 77–77, 2017.
- MADRID, I. M.; XAVIER, M. O.; MATTEI, A. S.; et al. **Brazilian Journal of Veterinary Research and animal Science**, v. 44, n. 6, p. 441-443, 2007
- MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, p. 272376, 2014.
- MAIA, D. C. G.; GONÇALVES, A. C.; FERREIRA, L. S.; et al. Response of Cytokines and Hydrogen Peroxide to *Sporothrix schenckii* Exoantigen in Systemic Experimental Infection. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3–4, p. 207–215, 2015.
- MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.
- MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *Sporothrix* Species of In Vitro Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 732–734, 2008.

MARIO, D. A. N.; SANTOS, R. C. V.; DENARDI, L. B.; et al. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 1, p. 21–25, 2016.

MARIO, D. N.; GUARRO, J.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; CAPILLA, J. In Vitro and In Vivo Efficacy of Amphotericin B Combined with Posaconazole against Experimental Disseminated Sporotrichosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 5018–5021, 2015.

MARTINS, Anelise Afonso. **Esporotricose sistêmica experimental: Avaliação in vivo da  $\beta$  (1-3) glucana em associação ao itraconazol em modelo murino**. 2012. 118f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MATOS, C. B. DE; GUTERRES, K. A.; GIORDANI, C.; et al. Germicidal activity of plant extracts of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against *Sporothrix schenckii* complex. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 10, n. 3, p. 246–252, 2016.

MCGINNIS, M. R.; NORDOFF, N.; LI, R. K.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. **Medical Mycology**, v. 39, n. 4, p. 369–371, 2001.

MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. DE Á.; SILVA, F. V.; et al. Esporotricose experimental sistêmica em ratos Wistar: avaliação hematológica e perfil hepático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 1026–1028, 2008.

MEINERZ, A. R. M.; NACENTE, P. DA S.; SCHUCH, L. F. D.; et al. Suscetibilidade in vitro de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 60–62, 2007.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B. L.; et al. Synthesis of Melanin-Like Pigments by *Sporothrix schenckii* In Vitro and during Mammalian Infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4026–4033, 2003.

NASCIMENTO, R. C.; ALMEIDA, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 241–247, 2005.

NOBEN-TRAUTH, N.; HU-LI, J.; PAUL, W. E. Conventional, Naive CD4<sup>+</sup> T Cells Provide an Initial Source of IL-4 During Th2 Differentiation. **The Journal of Immunology**, v. 165, n. 7, p. 3620–3625. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3620, 2000.

NOBRE, M. DE O.; NASCENTE, P. DA S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. ANTIFUNGICAL DRUGS FOR SMALL AND LARGE ANIMALS. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 175–184, 2002.

ODDS, F. C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 31, n. 4, p. 463–471, 1993.

- OLIVEIRA, D. C.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T. B.; et al. Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* Complex Identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3047–3049, 2011.
- OLIVEIRA, D. C.; LORETO, É. S.; MARIO, D. A. N.; et al. *Sporothrix schenckii* COMPLEX: SUSCEPTIBILITIES TO COMBINED ANTIFUNGAL AGENTS AND CHARACTERIZATION OF ENZYMATIC PROFILES. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 289–294, 2015.
- PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D.; KITADA, A. A. B.; et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392–393, 2014.
- PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P.; GREMIÃO, I. D.; et al. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 311–321, 2009.
- PEREIRA SILVEIRA, C.; TORRES-RODRÍGUEZ, J. M.; ALVARADO-RAMÍREZ, E.; et al. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1607–1610, 2009.
- REIS, T. A.; GOULART, P. DE F. P.; OLIVEIRA, R. M. E. DE; et al. Parâmetros metabólicos de ratos wistar submetidos à dieta suplementada com estévia e açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1477–1488, 2011.
- REX, J. H.; PFALLER, M. A.; WALSH, T. J.; et al. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 643–658, 2001.
- RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. DE M.; HOOG, G. S. DE; et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLOS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.
- ROMERO, A. L.; ROMERO, R. B.; SILVA, E. L.; et al. Composição Química e Atividade do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* Sobre Fungos Fitopatogênicos. **Journal of Health Sciences**, v. 14, n. 4, 2015.
- ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696–3703, 2000.
- ROSSATO, Luana. **Sporothrix brasiliensis: aspectos imunológicos e virulência**. 2017. 120f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- SANCHOTENE, K. O.; MADRID, I. M.; KLAFKE, G. B.; et al. Sporothrix brasiliensis outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, p. 652–658, 2015.
- SANTIN, Rosema. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família lamiaceae**. 2013. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SANTIN, R.; GIORDANI, C.; MADRID, I. M.; et al. Antifungal activity of Origanum vulgare essential oil against Malassezia pachydermatis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 367–373, 2014.
- SANTOS, C. H. DA S.; PICCOLI, R. H.; TEBALDI, V. M. R. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 76, p. e1719, 2017.
- SARAVOLATZ, L. D.; DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 11, p. 1445–1457, 2003.
- SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. Bull Johns Hop-kins Hosp. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v. 9, p. 286–290, 1898.
- SCHUBACH, A. DE O.; SCHUBACH, T. M. P.; BARROS, M. B. L.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Esporotricose zoonótica—abordagem entre medicina humana e veterinária. **Ciência Rural**, v. 11, p. 192, 2001.
- SCHUBACH, A. DE O.; SCHUBACH, T. M. P.; BARROS, M. B.; WANKE, B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1952–1954, 2005.
- SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A. DE O.; OKAMOTO, T.; et al. Utilidade do coágulo sangüíneo para o isolamento de Sporothrix schenckii de gatos naturalmente infectados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 6, p. 404–408, 2004.
- SGARBI, D. B.; DA SILVA, A. J.; CARLOS, I. Z.; et al. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus Sporothrix schenckii. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 9–14, 1997.
- SILVA, L. L. DA; OLIVEIRA, G. M. G. DE; NETO, M. J. ATIVIDADE FUNGICIDA DE PLANTAS DO CERRADO CONTRA MICOSES SUPERFICIAIS E CUTÂNEAS. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2018.
- STOPIGLIA, C. D. O.; MAGAGNIN, C. M.; CASTRILLÓN, M. R.; et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the Sporothrix schenckii complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v. 52, n. 1, p. 56–64, 2014.
- TEIXEIRA, M. M.; DE ALMEIDA, L. G.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P.; et al. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal

Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC Genomics**, v. 15, p. 943, 2014.

ULTEE, A.; SLUMP, R. A.; STEGING, G.; SMID, E. J. Antimicrobial Activity of Carvacrol toward *Bacillus cereus* on Rice. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 620–624, 2000.

WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; CLEFF, M. B.; et al. Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn. and *Origanum vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* complex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 991–999, 2016.

WALLER, STEFANIE BRESSAN; MADRID, I. M.; SERRA, E. F.; et al. In vitro susceptibility of the *Sporothrix brasiliensis* to aqueous extracts of the green tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 4, p. 342–347, 2016.

XAVIER, M. O.; BITTENCOURT, L. R.; SILVA, C. M.; VIEIRA, R. S.; PEREIRA, H. C. Atypical presentation of sporotrichosis: report of three cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 116–118, 2013.

XAVIER, M. O.; NOBRE, M. DE O.; SAMPAIO JR, D. P.; et al. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1961–1963, 2004.

## **Anexos**

## Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 22 de março de 2012

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Professor Mário Carlos Araújo Meireles

*Faculdade de Veterinária*

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: "**Prospecção de plantas da família Lamiaceae para o tratamento e controle da esporotricose**", processo nº23110.001622/2012-55, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 1622).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEA*

Ciente em: 23 / 03 / 2012

Assinatura do Professor Responsável:

Prof. Mário C. A. Meireles  
Méd. Veterinário - CRMV/R3 2116  
Faculdade de Veterinária - UFPel

## Anexo II – Documento estágio em Toulouse – França



Isabelle Oswald  
Directeur de Recherche



Par la présente, je soussignée, Dr Isabelle OSWALD, française, directrice de recherche chercheur à l'INRA de Toulouse – France (matricule XXX), co-conseillée de la thèse de CAROLINE BOHNEN DE MATOS dans le programme de doctorat en vétérinaire, atteste que la candidate a effectué un stage sous ma direction à INRA ToxAlim, du 03/mars/2016 au 01/juin/2016. Ce stage était focalisé sur l'extraction d'ARN pour la réalisation de PCR

Je promets de garder co-orientation et le suivi des étudiants pendant la période du stage à l'étranger, en collaboration avec le superviseur de l'institution brésilienne, la conduite des activités proposées dans le plan et le calendrier approuvé ici, y compris les efforts visant à l'étudiant présenter l'engagement requis, afin de rentabiliser les activités, qui seront évalués au moyen de rapports périodiques. Je certifie également que l'étudiant a la compétence requise dans la langue française pour communiquer et développer le travail prévu.

Fait à Toulouse le 24 Aout 2016