

AVALIAÇÃO DE TRATAMENTOS ADJUVANTES NO AUXÍLIO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA FRENTE A ESPOROTRICOSE EXPERIMENTAL

ANTÔNIO GONÇALVES DE ANDRADE JUNIOR¹; AMANDA DIAS STUMPF²;
MARTHA BRAVO CRUZ PIÑEIRO³; SABRINA DE OLIVEIRA CAPELLA⁴;
SERGIANE BAES PEREIRA⁵; MÁRCIA DE OLIVEIRA NOBRE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – antonio_3@icloud.com

²Universidade Federal de Pelotas – amanda-stumpf@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – martha.pineiro@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – capellas.oliveira@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – sergiane@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – marciaonobre@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de aspecto zoonótico causada pelo fungo termodimórfico e saprófito do complexo *Sporothrix schenckii* (SANTOS et al., 2018). É uma importante micose que acomete diversos mamíferos, sendo cães, gatos e seres humanos os mais suscetíveis a doença. Por ser uma micose de implantação, a transmissão ocorre pela inoculação do fungo *Sporothrix spp.* na pele do animal susceptível, normalmente, pela inoculação de matéria orgânica, mordedura, arranhadura e contato com exsudato de lesões, especialmente de felinos doentes (SANTOS et al., 2018).

O tratamento é baseado no uso de antifúngicos, o itraconazol é atualmente o recurso terapêutico de primeira escolha (DE PAULA, 2008). Porém, devido ao seu uso indiscriminado têm se observado relatos de resistência fúngica frente ao tratamento, dificultando a cura da doença em felinos (MEINERZ, 2007). Nesses casos, surge como terapia adjuvante o uso de imunomoduladores que auxiliam estimulando o sistema imunológico frente a resposta contra a esporotricose (MARTINS, 2008). Além disso, considerando que a doença gera lesões cutâneas, o uso de fórmulas com extratos vegetais cicatrizantes pode ser utilizado como método terapêutico adjuvante, já que apresentam efeito pró inflamatório no local das feridas (CAPELLA, 2019).

A imunidade celular dos animais acometidos é de extrema importância frente à resposta contra a infecção. Ativação de células como macrófagos e neutrófilos são ferramentas importantes no controle da infecção por *Sporothrix spp.* (MIRANDA, 2013). Considerando a importância da micose, e as particularidades no tratamento, o objetivo do presente trabalho foi avaliar tratamentos adjuvantes que possam auxiliar a resposta celular frente a doença em ratos *Wistar*.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados 42 ratos norvergicus (*Rattus rattus*), albinos, linhagem *Wistar*, com idade inicial de 8 semanas, machos. Os animais foram alojados no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sendo mantidos em condições constantes de umidade, temperatura e ciclo de claro e escuro, recebendo dieta de acordo com o peso corporal e água ad libitum durante o período experimental. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal – UFPEL sob o registro nº 25990 -201.

Os animais foram inoculados a partir de um isolado leveduriforme de *Sporothrix brasiliensis* proveniente de esporotricose cutânea de felino doméstico (*Felis catus*) padronizado em $10^7/100\mu\text{l}$ UFC (DELLA TERRA et al., 2017). Para o desenvolvimento da esporotricose experimental, esses animais foram previamente anestesiados com associação de xilazina (10mg/kg) e cetamina (100mg/kg) por via intraperitoneal e posterior inoculação de 0,2ml da suspensão fúngica ($10^7 /100\mu\text{l}$) pela via subcutânea em ambos coxins dos membros posteriores. Após 10 dias da inoculação, foi confirmada a esporotricose no ponto de inoculação e os animais foram divididos aleatoriamente em seis grupos (seis animais/grupo) e iniciado o tratamento. Os animais foram tratados com solução de NaCl 0,9% estéril e aplicação de creme LCFT2002 (GF2); timomodulina 4mg/kg e itraconazol 10mg/kg, e aplicação de creme LCFT 2002 (GITF2); timomodulina 4mg/kg e itraconazol 10mg/kg (GIT); timomodulina 4mg/kg (GT); itraconazol 10mg/kg (GI); NaCl 0,9% estéril (GCN).

Os animais foram tratados por via oral (gavagem) e/ou tópica (utilizando aplicador) de acordo com os grupos experimentais, uma vez ao dia, durante 42 dias que foi o período experimental. Aos 42 dias, foram coletadas amostras sanguíneas, realizada a contagem de leucócitos totais através da câmara de Neubauer, também foram confeccionadas lâminas através de esfregaço e posterior coloração pelo Kit Panótipo Rápido para diferenciação das células por leitura manual. Dessa forma, foi realizado média dos leucogramas totais e a mediana dos leucócitos diferenciais de cada grupo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se que os valores de leucograma total se mostraram acima do normal em todos os grupos (Tabela 1) quando comparados aos valores referência para ratos *Wistar* machos do estudo de CARVALHO et al. (2009) o qual o valor absoluto de leucócitos foi $(8,52 \times 10^3 \mu\text{L})$. Pode-se observar que os dois tratamentos sem o uso do itraconazol, GF2 e GCN mostraram os maiores valores de leucócitos totais no leucograma. Esses valores acima do padrão demonstram uma intensa resposta medular, já que a esporotricose é uma doença que cursa com leucocitose (SCHUBACH, et al., 2003). E sem o uso de uma medicação efetiva para atuar contra o fungo ocorre uma exigência dos mecanismos de defesa, como a resposta inata, celular e humoral que tem um papel importante no controle da esporotricose (ALMEIDA, 2013). Como o itraconazol é o antifungo de primeira escolha para a esporotricose ele atua no combate à doença e, conseqüentemente, auxilia o sistema imune (DE PAULA, 2008). Ainda, no GF2 a leucocitose foi ainda mais intensa, possivelmente pela conhecida ação pró inflamatória do creme LCFT2002 (CAPELLA, 2019).

Os demais tratamentos (GITF2, GIT e GI) apresentaram uma resposta parecida em relação aos leucócitos totais, possivelmente por estarem sendo tratados com o itraconazol e/ou também por terem o uso de mediadores da resposta imune sistêmica ou local, assim, segundo MIRANDA (2013) evidencia a importância da colaboração entre células do sistema monocítico fagocitário, células T e o antifúngico na eliminação da infecção (Tabela 1).

Com relação aos valores referentes ao leucograma diferencial dos animais de acordo com os diferentes tratamentos utilizados, observou-se em nossos estudos que os bastonetes, neutrófilos, linfócitos e monócitos apresentaram valores elevados (Tabela 1) quando comparados com CARVALHO et al. (2009) que obteve os valores relativos de leucócitos (%) monócitos $16,24 \pm 1,62$; bastonetes $2,63 \pm 0,41$; segmentados $37,43 \pm 1,62$; linfócitos $43,41 \pm 1,32$. Pôde-se

observar que os nossos estudos alteraram significativamente os valores de leucograma, considerando que a esporotricose é uma doença que altera os padrões hematológicos que geralmente cursam com desvio a esquerda regenerativo (SCHUBACH, 2008). Os eosinófilos e basófilos se encontraram dentro dos valores de referência 0% para basófilos em todos os grupos de tratamento, 1% para eosinófilos no GF2 e 0% nos demais grupos.

Tabela 1 – Valores referentes ao leucograma dos animais com esporotricose cutânea, de acordo com os diferentes grupos de tratamento após 42 dias de tratamento.

Grupos de tratamento	Leucócitos totais (x10 ³ µL)	Bastonetes (%)	Segmentados (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)
GF2	15,37	7	30	55	3
GITF2	9,37	7	23	50	10
GIT	9,64	3	32	57,5	7,5
GT	9,26	5	28	64	3
GI	10,74	3	34	49	11
GCN	12,69	5	37	51,5	5

GF2 - LCFT2002; GITF2 - timomodulina e itraconazol por via oral e aplicação de creme LCFT 2002; GIT - timomodulina e itraconazol; GT – timomodulina; GI - itraconazol; GCN - NaCl 0,9% estéril.

Observou-se que nos grupos GF2 e GITF2 referentes ao tratamento com o creme LCFT2002 os bastonetes tiveram resultados acima dos valores fisiológicos, reforçando o efeito pró-inflamatório do creme (CAPELLA, 2019). Os bastonetes são precursores na linhagem dos neutrófilos, os quais são capazes de destruir o fungo através da fagocitose e de liberação de espécies reativas de oxigênio (ALMEIDA, 2013). O aumento de bastonetes sugere um estímulo na produção das células de defesa e resposta medular imediata frente a enfermidade geralmente em quadros de infecções agudas e doenças graves (SCHUBACH, 2008).

Com relação a análise de linfócitos pôde-se observar que os grupos GIT e GT apresentaram uma linfocitose acentuada, ambos os grupos receberam tratamento com a timomodulina, que tem efeito imunomodulador, ou seja, atua beneficiando o sistema imune e tem a capacidade de modular a medula óssea quanto a produção de células da série branca (FUKUDA, et al., 1999). Além disso os linfócitos possuem um papel fundamental na produção de citocinas e para o desenvolvimento de granuloma, que é um componente essencial na defesa do hospedeiro contra o fungo (ALMEIDA, 2013).

Assim, os tratamentos utilizando a timomodulina e/ou o creme LCFT 2002, agiram estimulando a resposta celular com a produção de linfócitos e bastonetes promovendo uma leucocitose total, mantendo as linhas de defesa do sistema imune altas em animais com esporotricose.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que os tratamentos com timomodulina e creme LCFT 2002 auxiliam na resposta celular estimulando a produção de leucócitos em animais com esporotricose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J.R.F. **Avaliação da virulência e da resposta imune de diferentes espécies de *Sporothrix* sp. Na esporotricose experimental.** 2013. 86f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de ciências farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- CAPELLA, S.O. **Potencial terapêutico de formulações no tratamento de feridas cutâneas.** 2019. 88f. Tese (Doutorado em ciência) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- CARVALHO, D; MASSENO, G. B; BATISTA, M. A. P; SANTOS, Z. M; DURAMA, F. Z.; CARDOSO, P. L.; MACHADO, J. P.; MAUAD, H. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos **Revista Ceres**, vol. 56, núm. 1, 2009, pp. 51-57.
- DELLA TERRA, P.P.; RODRIGUES, A.M.; FERNANDES, G.F.; NISHIKAKU, A.S.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z.P. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v.11, n.8, p.e0005903, 2017.
- MIRANDA, L. H. M. **Avaliação da resposta inflamatória in vivo e in vitro na esporotricose felina em diferentes apresentações clínicas.** 2013. 88f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.
- DE PAULA, R. B. Revisão de literatura: Esporotricose Canina e Felina. **CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO “LATO SENSU” EM CLÍNICA MÉDICA E CIRÚRGICA EM PEQUENOS ANIMAIS.** Universidade Castelo Branco Rio de Janeiro, p. 48, 2008.
- FUKUDA, Y.; JORDÃO-NEVES, B. M.; DA-CUNHA, J.; MANGABEIRA, P. L. Assessment of efficacy and safety of thymomodulin (Leucogen®) in the prevention of recurrent otitis media and recurrent tonsillitis (Estudo clínico- imunológico da eficácia de timomodulina (Leucogen®) na otite média aguda recorrente e na amigdalite de repetição). **Pediatria Moderna**, n.XXV, v.10, p.828-834, 1999.
- MARTINS, A. A.; ANTUNES, T.A.; SILVA, F.V. **Tratamento da esporotricose cutânea experimental: uso de b-glucana associada ao itraconazol.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 35., Gramado, 2018. Anais...Gramado, RS: Sociedade de Veterinária do Rio Grande do Sul, 2008.
- MEINERZ, A. R.; NASCENTE, P.; SCHUCH L. F. Esporotricose Felina – Relato de casos. **Revista Ciência Animal Brasileira.** v. 8, n. 3, p. 575-577, julho/setembro, 2007.
- SANTOS, A. F.; ROCHA, B. D.; BASTOS, C. V.; et al. Guia Prático para enfrentamento da Esporotricose Felina em Minas Gerais. **Revista V&Z Em Minas**, n. 137, Abr/Mai/Jun, 2018.
- SCHUBACH, A. O.; BARROS M. B. L.; WANKE, B. **Epidemic sporotrichosis.** *Current Opinion in Infectious Diseases.* v. 21, n. 129, p. 33, 2008.