

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



Dissertação

**Esporotricose: aspectos clínicos e terapêuticos, correlação com
retrovirose e susceptibilidade à compostos químicos**

Ceres Cristina Tempel Nakasu

Pelotas, 2018

Ceres Cristina Tempel Nakasu

Esporotricose: aspectos clínicos e terapêuticos, correlação com retrovíroses e susceptibilidade a compostos químicos

Dissertação 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 Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Marlete Brum Cleff

Coorientadora: Renata Osório de Faria

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

N163e Nakasu, Ceres Cristina Tempel

Esporotricose : aspectos clínicos e terapêuticos, correlação com retrovíroses e susceptibilidade a compostos químicos / Ceres Cristina Tempel Nakasu ; Marlete Brum Cleff, orientadora. — Pelotas, 2018.

80 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Antifúngicos. 2. Resistência. 3. Esporotricose felina.
I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Título.

CDD : 636.089

Ceres Cristina Tempel Nakasu

Esporotricose: aspectos clínicos e terapêuticos, correlação com retrovíroses e susceptibilidade a compostos químicos

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

Data da Defesa: 23/02/2018

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a Marlete Brum Cleff
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(Orientadora)

Prof^a. Dr^a. Ana Raquel Mano Meinerz
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a Patrícia da Silva Nascente
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag
Doutor em química pela Universidade Federal de Santa Maria

Agradecimentos

Agradeço à minha família, em especial meus pais Ricarda e Bonifácio Nakasu pelo eterno incentivo, infinito apoio e colaboração no meu crescimento pessoal e profissional, a vocês meu amor incondicional.

À minha querida orientadora Marlete Brum Cleff que durante toda minha jornada dentro da Universidade Federal de Pelotas esteve ao meu lado, meu eterno agradecimento e admiração pela profissional e pessoa iluminada que és.

À querida colega Stefanie Waller, meu agradecimento mais sincero por todo esforço e auxílio nesta fase e minha grande admiração pela exímia profissional que és.

Ao Fitopeet (Grupo de pesquisa, ensino e extensão em produtos naturais na clínica médica veterinária), colegas e amigas, pela parceria em todos os momentos vividos dentro desta pequena grande família.

Aos amigos de sempre, minha segunda família, meus suportes de todos os momentos. Meu namorado Fernando, lendário “piano”, que apareceu no meio do caminho pra me amparar nessa jornada enlouquecedora.

Ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária UFPel (MicVet-UFPel), pelos ensinamentos e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e incentivo à pesquisa.

À Universidade Federal de Pelotas por todas as oportunidades de crescimento.

Aos felinos que são o grande motivo de eu sempre ter em mente do porque eu comecei e onde quero chegar por eles.

Resumo

NAKASU, Ceres Cristina Tempel. **Esporotricose: aspectos clínicos e terapêuticos, correlação com retrovíroses e susceptibilidade a compostos químicos.** 2018. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Esporotricose é uma micose subcutânea, que atinge animais e o homem, sendo causada por fungos do complexo *Sporothrix schenckii*. O fármaco de eleição para o tratamento da esporotricose em felinos é o itraconazol, e os portadores da micose podem apresentar quadros disseminados mesmo após tratamento com antifúngicos. Os dados epidemiológicos da esporotricose ainda não são totalmente conhecidos na região do estudo, e as escolhas terapêuticas para o tratamento dos felinos variam muito entre os profissionais da área, o que pode estar contribuindo para a resistência fúngica e perpetuação da doença. A coinfeção por retrovíroses imunossupressoras como a Imunodeficiência viral felina (FIV) e a Leucemia viral felina (FeLV) podem estar presentes em gatos acometidos pela esporotricose. Em contrapartida à resistência de fungos do complexo *Sporothrix schenckii* e falhas terapêuticas reportadas, extratos da família *Lamiaceae* demonstram atividade anti-*sporothrix*. Os objetivos deste estudo foram avaliar pacientes com esporotricose e a resposta aos tratamentos utilizados, diagnosticar a coinfeção por FIV e FeLV, correlacionar a presença de imunossupressão por retrovírose e a variação terapêutica encontrada como fatores de resistência ou recidivas de esporotricose, verificar a atividade *in vitro* de compostos fenólicos, terpênicos e flavonóides em isolados de *Sporothrix brasiliensis*. Os compostos isolados ácido caféico, gama-terpineno, ácido p-cumárico, 1,8-cineol e quercetina, presentes em extratos de plantas da família *Lamiaceae* foram testados sobre 15 isolados de *S. brasiliensis* provenientes de felinos; um *S. brasiliensis* isolado de canino e 2 cepas-padrão (*S. brasiliensis* e *Sporothrix* sp.), totalizando $n= 18$ amostras. O ácido caféico demonstrou atividade fungistática e fungicida em 100% das amostras testadas, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) entre 0,3125 a 0,605 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e concentração fungicida mínima (CFM) entre 0,3025 a 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O gama-terpineno demonstrou atividade antifúngica com CIM e CFM de 0,7575 a $>5\mu\text{g mL}^{-1}$. Já o p-cumárico apresentou CIM de 0,3788 a $>5\text{ mL}^{-1}$, e CFM de 2,5 a $>5\text{ mL}^{-1}$ e por fim, o eucaliptol foi o composto com menor ou nenhuma atividade antifúngica entre os compostos testados, apresentando CIM entre 0,7575 a $>10\mu\text{g mL}^{-1}$ e CFM $>10\mu\text{g mL}^{-1}$. A CIM de itraconazol nos isolados testados foi de 0,5 a acima de 16 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados sugerem atividade promissora dos compostos ácido caféico e gama-terpineno, os quais foram efetivos na inibição e destruição de isolados de *Sporothrix* sp., destacando isolados resistentes ao itraconazol.

Palavras-chave: antifúngicos; resistência; esporotricose felina; retrovírose

Abstract

NAKASU, Ceres Cristina Tempel. **Sporotrichosis: clinical and therapeutic aspects, correlation with retrovirus and susceptibility to a chemical compound.** 2018. 80 f. Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis, which produces animals and man, being caused by fungi of the complex *Sporothrix schenckii*. The drug of choice for the treatment of sporotrichosis in felines and itraconazole. However, the fungal resistance of *sporothrix schenckii* complex and therapeutic failures has been reported. In contrast, extracts from lamiaceae family demonstrate anti-sporothrix activity. Thus, the objectives of the study were to clinically evaluate patients with sporotrichosis, to evaluate the presence of retroviruses and the evolution of patients with sporotrichosis in relation to the treatment, to analyze possible resistance factors to established treatments or to relapse of clinical conditions, as well as to verify the in vitro activity of phenolic, terpene and flavonoid compounds in isolates of *Sporothrix brasiliensis*. Epidemiological data on sporotrichosis are not fully known in the study region, and therapeutic choices for feline treatment vary widely among professionals in the area, which may be contributing to the fungal resistance and disease perpetuation in the region. Feline carriers of ringworm can present widespread conditions even after treatment with antifungal agents. Felines with sporotrichosis may present retrovirus co-infection, especially FeLV, which was the most frequent retrovirus. The compounds isolated from coffee, gamma-terpinene, p-coumaric acid, 1,8-cineole and quercetin, constituents of plants of the family Lamiaceae were tested on 15 isolates of *S. brasiliensis* feline participation; *S. brasiliensis* isolated from canine and 2 standard strains (*S. brasiliensis* and *Sporothrix* sp.), totalizing n = 18 samples. The minimum inhibitory concentration (MIC) ranged from 0.3125 to 0.605 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and the minimum fungicidal concentration (CFM) ranged from 0.3025 to 1.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for coffee extract, demonstrating activity in 100% of samples tested. Gamma-terpinene also demonstrated antifungal activity with MIC and CFM ranging from 0.7575 to > 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The p-coumaric presented MICs of 0.3788 to > 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and CFM of 2.5 to > 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and finally, and eucalyptol presented MIC ranging from 0.7575 to > 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CFM > 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ - the compound with lower or absence of antifungal activity among the tested compounds. Regarding the quercetin compound, it was not possible to interpret antifungal response in the method used. MIC of itraconazole in the isolates tested ranged from 0.5 to above 16 $\mu\text{g / ml}$. The results suggest promising activity of the compounds caffeic acid and gamma-terpinene, since they were effective in the inhibition and destruction of *Sporothrix* sp. Isolates, especially those resistant to itraconazole.

Keywords: antifungals; resistance; feline sporotrichosis; Retroviruses

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1	Demonstração de felinos diagnosticados com esporotricose, testados para retrovíruses, e taxa de positividade para FeLV e FIV (HCV-UFPel, 2013 a 2017).....	30
----------	--	----

Artigo 2

Figura 1	(G3) Lesões focais em plano nasal após 3 anos de tratamento antifúngico.....	44
Figura 2	2A e 2B: (G11) Lesões focais em plano nasal após 1 ano de tratamento antifúngico.....	44
Figura 3	3A e 3.B: (G12) Lesões focais em plano nasal após 2 anos de tratamento antifúngico.....	45
Figura 4	4.A, 4.B e 4.C: exemplo de lesões disseminadas em regiões de face, membros e cauda, como exemplo de regiões mais comuns de desenvolvimento da micose.....	46
Figura 5	5.A, 5.B, 5.C e 5.D: Quadro de esporotricose disseminada em felino doméstico.....	47

Lista de Tabelas

Artigo 2

Tabela 1	Histórico de felinos com esporotricose atendidos no HCV-UFPeI no período de 2016 a 2017. S/H: Sem histórico; S/R: Sem resposta; FPV: FPV: Fármaco padrão veterinário; FPH: Fármaco padrão humano; FM: Fármaco Manipulado.	41
----------	---	----

Artigo 3

Tabela 1	Descrição dos compostos adquiridos comercialmente e avaliados in vitro em isolados de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	66
Tabela 2	Concentração mínima inibitória (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de compostos fenólicos, flavonóides e terpênicos ($\mu\text{g/mL}$) para <i>Sporothrix brasiliensis</i>	67
Tabela 3	Susceptibilidade de isolados do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> ao itraconazol ($\mu\text{g/mL}$).....	68

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Objetivos.....	13
3 Revisão Bibliográfica.....	15
4 Artigos.....	25
4.1 Artigo 1.....	25
4.2 Artigo 2.....	35
4.3 Artigo 3.....	51
5 Considerações Finais.....	69
Referências.....	70
Anexos.....	77

1 Introdução

Os agentes etiológicos da esporotricose são amplamente distribuídos no meio ambiente. As características clínicas, epidemiológicas e ecológicas do fungo e da micose variam de acordo com a localização geográfica, tendo maior ocorrência em regiões de clima tropical e subtropical (RIPPON, 1988; LARSSON et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013). Em vista, da proximidade e a mudanças de hábitos em relação ao cuidado com os animais de companhia, a forma de transmissão da micose vem se alterando, já que os primeiros relatos de esporotricose foram relacionados a pessoas com hábitos ligados diretamente ao ambiente, como agricultores e trabalhadores rurais. Até então, a infecção era primordialmente ligada à infecção ambiental através do solo ou elementos como espinhos, farpas e troncos contaminados (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013; MONTENEGRO et al., 2014).

Atualmente, a proximidade entre o homem e os felinos domésticos, sejam estes domiciliados, semi- domiciliados ou errantes, é tida como a principal fonte de transmissão da micose em nosso país (ALVES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013; OROFINO-COSTA, 2017). Sendo que na região Sul do Rio Grande do Sul, tem sido descrito aumento significativo de casos de esporotricose com transmissão zoonótica (MADRID et al, 2012), desta forma o estado do RS junto com o RJ são considerados como áreas endêmicas para a micose. Assim, durante as duas últimas décadas, devido às mudanças epidemiológicas, distribuição e evolução taxonômica, a esporotricose emergiu como uma importante doença fúngica em veterinária, causadora de múltiplos surtos e que apresenta uma transmissão zoonótica substancial (CHAKRABARTI et al, 2014). Ainda assim, somente no estado do Rio de Janeiro a esporotricose é uma doença de notificação obrigatória (GUTIERREZ-GALHARDO, 2015; OROFINO-COSTA et al., 2017).

Embora a literatura defenda que não há relação entre felinos portadores de doenças retrovirais como FIV e/ou FELV e a predisposição à infecção por esporotricose, estudos demonstram que gatos portadores de retrovírus tendem a desenvolver um quadro clínico mais severo quando coinfetados pelo agente fúngico, o que ocorre provavelmente devido a característica oportunista do fungo em

organismos imunossuprimidos (SOUZA et al., 2005; SCHUBACH et al., 2008; LARSSON, 2011). Ainda, a inabilidade do felino portador de retrovíroses em desenvolver uma resposta imune adequada, poderia torná-lo suscetível à patógenos oportunistas e o desenvolvimento de infecções crônicas em cavidade bucal, trato urinário, tegumento cutâneo, vias aéreas superiores, ou infecções persistentes por micobactérias, parasitas, bem como, infecções fúngicas.

Acredita-se que a resposta imune de felinos gravemente afetados pela esporotricose possa ser deficiente, o que poderia estar associado a presença de imunossupressão causada por coinfeção com retrovírus, assim como ocorrência de refratariedade ou dificuldade de resposta às terapias (SOUZA et al.,2005).

Entretanto, existem condições que colocam os felinos suscetíveis a ambas infecções, pois da mesma forma que na esporotricose, felinos machos não castrados, semidomiciliados ou de vida livre desempenham um importante papel na disseminação das retrovíroses (MEINERZ et al.,2010).

Desta forma, acredita-se que, por não serem de notificação obrigatória, a real incidência destas infecções ainda é desconhecida, e provavelmente sejam subdiagnosticadas no país. Assim, reveste-se de importância o entendimento e coleta de dados epidemiológicos de pacientes com retrovíroses na rotina dos clínicos veterinários, bem como, a busca pelo diagnóstico correto e específico de esporotricose, a fim de entender se há relação entre as mesmas e a resposta ao tratamento instituído para a micose, procurando evitar a perpetuação e a disseminação de tais infecções que apresentam-se como prejudiciais à saúde dos felinos domésticos e a saúde pública (SANCHOTENE et al.,2015).

Em adição a estes fatores, a esporotricose é uma doença que geralmente ocorre em áreas urbanas, em condições sociais precárias, onde há dificuldade de acesso à saúde e sanidade básica, demonstrando mais uma vez a importância de realizar estudos que elucidem suas causas e o controle em prol da saúde pública (SANCHOTENE et al., 2015). Apesar da esporotricose ser uma micose de ampla ocorrência e, de existirem opções terapêuticas disponíveis, o uso indiscriminado e inadequado de antifúngicos, e as dificuldades relacionadas a terapia da micose nos felinos domésticos, tem sido relacionado a ocorrência de isolados resistentes de fungos do complexo *Sporothrix Schenckii*, o que tem servido de alerta para a importância do controle da enfermidade devido a se caracterizar como um problema de saúde pública (SANCHOTENE et al.,2015).

Desta forma inúmeras pesquisas tem sido desenvolvidas na busca por opções terapêuticas, investindo em produtos de origem vegetal com atividade anti-sporothrix. Á partir de resultados importantes, demonstrando a atividade antifúngica de espécies da família Lamiaceae, em isolados clínicos de esporotricose humana e animal, existe a probabilidade destes extratos serem fontes importantes de novas moléculas antifúngicas ativas, sendo importante a continuidade destes estudos avaliando os efeitos dos compostos ativos observados nas moléculas vegetais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os felinos atendidos no setor de clínicas do Ambulatório e Hospital Veterinário com sinais compatíveis e diagnóstico de esporotricose, assim como em relação a frequência da FIV/FELV, além de verificar a susceptibilidade de isolados de *Sporothrix* spp. a antifúngico padrão e aos compostos fenólicos, flavonóide e terpênicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar clinicamente os pacientes felinos com esporotricose e descrever as lesões e alterações clínicas;
- Verificar a escolha terapêutica e o tempo de tratamento instituído dos pacientes diagnosticados com esporotricose e que apresentam refratariedade ou resistência à tratamentos instituídos com antifúngicos convencionais;
 - Analisar os pacientes com esporotricose coinfectados por FIV/FeLV;
 - Avaliar a resistência e a sensibilidade dos isolados de *Sporothrix* spp. frente aos antifúngicos convencionais utilizados;
 - Verificar a atividade fungistática e fungicida *in vitro* de compostos fenólicos, flavonóide e terpênicos contra isolados clínicos de *Sporothrix* spp. de casos de esporotricose felina.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Esporotricose e os felinos domésticos

Esporotricose é uma infecção que ocorre no tecido subcutâneo de animais e humanos, de forma aguda ou crônica, causada por fungos dimórficos do complexo *Sporothrix*. A infecção geralmente acontece através de inoculação traumática na pele por fragmentos de plantas, arranhões ou mordidas de animais infectados. (RIPPON, 1988; PEREIRA et al., 2009; BRILHANTE et al., 2014; OROFINO-COSTA et al., 2017). Atualmente o complexo *sporothrix* é formado por pelo menos cinco espécies patogênicas: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa* e *S. luriei*.

Os agentes etiológicos da esporotricose são amplamente distribuídos no meio ambiente. Suas características clínicas, epidemiológicas e ecológicas variam de acordo com a região geográfica, tendo maior ocorrência em regiões de clima tropical e subtropical (RIPPON, 1988; LARSSON, 2011; RODRIGUES et al., 2013). Durante as duas últimas décadas, devido às mudanças epidemiológicas, distribuição e evolução taxonômica, a esporotricose emergiu como uma importante doença fúngica causadora de múltiplos surtos e é a única doença fúngica dimórfica aparenta ter uma transmissão zoonótica substancial. (CHAKRABARTI et al., 2014).

O *S. schenckii* é um fungo produtor de melanina, característica que o protege da fagocitose e destruição pelo organismo hospedeiro e há indícios de que este seja um fator de resistência a determinados antifúngicos (LARSSON, 2011; OROFINO-COSTA et al., 2017). Em temperatura ambiente de 25°C a 30°C tem crescimento micelial, apresentando hifas delgadas em forma de margaridas, enquanto em temperatura de 37°C, as colônias apresentam células leveduriformes, microscopicamente visualizadas em formato de charuto, sendo esta a forma parasitária no hospedeiro (MARIMON et al., 2007; PEREIRA et al., 2009; LARSSON, 2011; RODRIGUES et al., 2014).

Benjamin Schenck foi o primeiro pesquisador a descrever a doença em 1898, e durante mais de um século, o *Sporothrix schenckii* foi atribuído como único agente etiológico da esporotricose (MARIMON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013; OROFINO-COSTA et al., 2017). No entanto, novos estudos a partir de técnicas moleculares que descrevem características de sequenciamento proteico e morfologia, possibilitaram a descrição de seis espécies, sendo o *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei* e o agora conhecido como *S. schenckii sensu strictu*, espécies clinicamente relevantes, além do *S. mexicana* e *S. albicans* como fungos ambientais (CHAKRABARTI et al., 2014). Dentre estas, o *S. brasiliensis* foi descrito como altamente patogênico para humanos e animais, além de ser uma espécie de ocorrência restrita ao Brasil e a mais encontrada em isolados de felinos domésticos (RODRIGUES et al., 2013; MONTENEGRO et al., 2014; BRILHANTE et al., 2015; DELLA TERRA et al., 2017).

A transmissão da esporotricose de forma zoonótica é relatada em diversas regiões ao redor do mundo, sendo transmitida por diferentes animais infectados de acordo com a atividade cultural, a relação ou a proximidade entre o agente e o hospedeiro (CHAKRABARTI et al., 2014; BRILHANTE et al., 2015). No Uruguai por exemplo, a infecção por esporotricose está principalmente correlacionada à caça aos tatus, atividade presente na região (CHAKRABARTI et al., 2014). Já no Brasil, a proximidade entre o homem e os felinos domésticos, sejam estes semi- domiciliados ou errantes, é tida como a principal fonte de transmissão da doença fúngica (ALVES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013; OROFINO-COSTA et al., 2017).

No Brasil casos de esporotricose foram relatados em aproximadamente oito estados, sendo a maior concentração de casos de forma endêmica no estado do Rio de Janeiro seguido pelo Rio Grande do Sul. Ainda assim, somente no estado do Rio de Janeiro a esporotricose é uma doença de notificação obrigatória (GUTIERREZ-GALHARDO, 2015; OROFINO-COSTA et al., 2017).

Um estudo descreveu que no Brasil entre os anos de 1998 e 2009, ocorreu um índice de aproximadamente 3244 casos de esporotricose em felinos e 2200 casos em humanos só na cidade do Rio de Janeiro (BARROS et al., 2010). Em adendo, descreve-se que no país duas são as formas mais comuns de infecção: através de matéria vegetal, e através da exposição e contato com cães e gatos infectados, em especial, transmitidos por aqueles animais errantes recolhidos e/ou

tratados por quem decide por acolhê-los, sendo o felino o principal agente transmissor da doença (BARROS et al, 2008; OROFINO-COSTA et al., 2014).

Na região Sul do Rio Grande do Sul foi observado um aumento significativo de casos de esporotricose nos últimos anos. Um estudo onde compara-se a ocorrência de 92 casos diagnosticados em sete municípios num período de 10 anos entre 2000 e 2010, com um substancial aumento para 129 casos diagnosticados em uma única cidade em um período de 5 anos entre 2010 e 2014, demonstra a exponencial incidência e/ou diagnóstico da doença com potencial zoonótico na região, e o quanto este número pode estar subestimado, visto que a notificação não é obrigatória (SANCHOTENE et al., 2015). Em adição a estes fatores, a esporotricose é uma doença que geralmente ocorre em áreas urbanas em condições sociais precárias de acesso à saúde e sanidade básica, demonstrando mais uma vez a importância de buscar estudos que elucidem suas causas e o controle em prol da saúde pública (SANCHOTENE et al., 2015).

Como o fungo encontra-se no ambiente presente no solo, vegetais secos ou em decomposição, os felinos por seus hábitos naturais de escavar terra, encobrir dejetos e arranhar troncos acabam por carrear o agente etiológico nas unhas, bem como na cavidade oral devido ao hábito de higienização por lambedura. A infecção fúngica ocorre através da inoculação traumática do agente no tegumento e assim, através da arranhadura ou mordedura, os felinos transmitem e inoculam o fungo no hospedeiro (PEREIRA et al., 2009; MADRID et al., 2009; LARSSON, 2011; MONTENEGRO et al., 2014).

Os felinos domésticos estão cada vez mais presentes na intimidade dos lares brasileiros, o que torna o estudo e o conhecimento da esporotricose um assunto de suma importância em termos de saúde pública. Há exemplo disto há um relato de um caso de esporotricose humana na região labial, em que o paciente contraiu a doença após beijar um felino infectado (CHAKRABARTI et al., 2014), o que demonstra a relação de proximidade entre os felinos domésticos e os seus respectivos tutores, fortalecendo a importância do estudo supracitado.

Os primeiros relatos de esporotricose foram relacionados a pessoas com hábitos ligados diretamente ao ambiente, como agricultores e trabalhadores rurais. Até então, a infecção era primordialmente ligada à infecção ambiental através do solo ou elementos como espinhos, farpas e troncos contaminados. A doença era

popularmente conhecida como “doença dos jardineiros” (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013; MONTENEGRO et al., 2014).

Quando a inoculação do agente ocorre a partir de um trauma proveniente de algum elemento ambiental como farpas e solo por exemplo, o fungo encontra-se na forma micelial, sendo assim, a tendência é de que o desenvolvimento das lesões demorem mais a ocorrer até que o fungo se adapte à nova condição de temperatura e multiplicação no organismo hospedeiro e adquira a forma leveduriforme de parasitismo (RODRIGUES et al., 2013; CRUZ, 2013).

Somente a partir da década de 80, com o surgimento do primeiro caso de esporotricose humana relacionada ao contato com um gato infectado é que se iniciou a associação do felino doméstico como fonte de transmissão importante da zoonose, e a partir de uma nova visão a despeito da epidemiologia da doença, os gatos passaram a ser primordialmente citados como agentes transmissores da esporotricose (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013). Os gatos são reservatórios importantes da esporotricose, visto que carregam o fungo nas unhas, cavidade oral, cavidade nasal e nas próprias lesões ligadas ao desenvolvimento da doença (MADRID et al., 2010; CRUZ, 2013; CHAKRABARTI et al., 2014).

Sabe-se que os felinos por seus hábitos inatos de caça, disputa por fêmeas e território envolvem-se constantemente em brigas e efetivamente através de arranhões e mordidas, os felinos carreadores ou infectados disseminam o fungo, causando a inoculação do agente na pele do hospedeiro. As lesões variam de acordo com as condições encontradas pelo agente no organismo infectado (CRUZ, 2013).

Quando a transmissão ocorre através de um felino infectado, portador de lesões ulceradas, uma grande quantidade de células leveduriformes é inoculada no organismo do hospedeiro, e portanto já estando na forma parasitária, o fungo não necessita de adaptações, iniciando a multiplicação e o desencadeamento da doença (CRUZ, 2013).

Embora a literatura defenda que não há relação entre felinos portadores de doenças retrovirais como FIV e/ou FELV serem predispostos à infecção por esporotricose, estudos demonstram que gatos portadores de retrovíroses tendem a desenvolver um quadro clínico mais severo quando coinfetados pelo agente fúngico, isto se dá pela característica oportunista do mesmo em organismos imunossuprimidos (SOUZA et al., 2005; SCHUBACH et al., 2008; LARSSON, 2011).

As retrovíroses então não são fatores predisponentes da esporotricose nos felinos domésticos, mas podem estar relacionadas ao agravamento do quadro clínico apresentado quando dá-se o desenvolvimento clínico da doença (DUNSTAN, 1986; DAVIS e TROY, 1996; SCHUBACH, 2008; SOUZA, 2010). Em contrapartida, estudos recentes discutem a relação de que na realidade, o fato de o felino ser portador de alguma retrovírose não interfere na severidade das lesões clínicas e sim na resposta do felino à doença em geral, e defendem ainda a possibilidade de que a severidade das lesões estejam diretamente relacionadas à cepa fúgica que o paciente apresenta. No Brasil por exemplo, há uma prevalência de *S. brasiliensis* nas lesões, tanto em gatos quanto em humanos, a qual é descrita como a mais patogênica entre as espécies do complexo (MIRANDA et al., 2013; MONTENEGRO et al., 2014; DELLA TERRA et al., 2017). De forma geral, autores concordam que há necessidade de maiores estudos em relação às cepas encontradas e a resposta do organismo dos felinos para maior entendimento.

O período entre a inoculação e o desenvolvimento da doença é variável, podendo ocorrer dentro de três dias a vários meses, com uma média de até três semanas (MAHAJAN, 2014). Após a inoculação traumática do fungo na pele lesionada, a doença pode se desenvolver de três diferentes formas: cutânea localizada, disseminada ou extra cutânea. Quando ocorre a inoculação do agente, formam-se no local pápulas ou nódulos que se permanecerem de formas localizadas, são conhecidos como esporotricoma (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013). Uma vez que o hospedeiro apresente alguma imunossupressão ou o agente consiga se desenvolver, as lesões localizadas podem evoluir para úlceras, áreas necróticas com produção de exsudato purulento e caso atinja a circulação pode ocorrer o quadro de linfangite. O gato que é portador da esporotricose apresenta grande quantidade de leveduras ao longo do corpo, na superfície do pelo e principalmente nas áreas de lesão, facilitando ainda mais a evolução da forma clínica localizada para disseminada através da prática de grooming e auto inoculação em episódios de prurido, por exemplo, bem como, para a transmissão para outros animais ou pessoas (CRUZ, 2013).

Quanto a apresentação clínica da esporotricose, os felinos tendem a apresentar lesões em região facial, coxins, cauda e ao longo do corpo. Não existe predileção por sexo ou idade, embora felinos machos, jovens, inteiros e semidomicilados tenham maior incidência por maior envolvimento em confrontos

com outros gatos por questões de territorialismo e reprodução (CRUZ, 2013; MIRANDA et al., 2013; CHAKRABARTI et al., 2014).

O diagnóstico definitivo para esporotricose é feito através de cultura fúngica a partir de uma coleta da amostra e análise de crescimento fúngico laboratorial. No entanto, por vezes o resultado pode levar de 7 a 30 dias. O exame direto de citologia intralesional submetido à coloração de gram, wright, giemsa ou azul de metileno, pode ser considerado como exame complementar sugestivo e imediato, visto que de forma geral as lesões dos felinos apresentam grande quantidade de células leveduriformes evidenciadas em microscopia com o formato de “charutos” de 3 a 4µm de diâmetro, características do *Sporothrix spp.* Tal exame em caráter de urgência dependendo do estado clínico do paciente pode ser um ponto importante na escolha do tratamento e conduta por parte do médico veterinário. (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013; MONTENEGRO et al., 2014; SANCHOTENE et al., 2015). Porém, deve-se sempre associar as características clínicas apresentadas, à incidência da doença na região e considerar os diagnósticos diferenciais como candidose, criptococose, leishmaniose e até mesmo neoplasias (LARSSON, 2011; SANCHOTENE et al., 2015).

3.2 Abordagem terapêutica e resistência da esporotricose

O protocolo clássico de tratamento para esporotricose em cães e gatos é a base se azólicos como o cetoconazol e itraconazol, triazólicos como posaconazol e fluconazol, os iodetos de potássio e sódio, as alilaminas como a terbinafina, e ainda a anfotericina B. Além dos tratamentos medicamentosos, a criocirurgia e ressecção das lesões cutâneas também tem sido consideradas como meio de tratamento em casos de esporotricose (ROSSI et al., 2013).

Nos gatos o itraconazol tem sido utilizado como tratamento padrão na dose de 100mg/gato, uma vez ao dia (ALMEIDA et al., 2015). O itraconazol tem sido a escolha medicamentosa entre os demais antifúngicos devido sua alta eficácia e segurança, com baixo índice de efeitos adversos (ROSSI et al., 2013). No entanto sabe-se que a administração medicamentosa por via oral em felinos por vezes é dificultada pela inexperiência do tutor ou responsável pela medicação, bem como, pela própria falta de cooperação dos felinos que não respondem bem à manipulação forçada e/ou elementos que não lhes sejam favoráveis ao paladar. Além disso, o

tratamento para esporotricose com itraconazol tem uma média de no mínimo três meses de administração contínua, e mais um mês após desaparecimento das lesões. Então dependendo da extensão das lesões apresentadas e do estado imunológico do paciente afetado, associado ao sucesso de administração terapêutica, o tratamento pode variar de meses a até mesmo anos sem resolução. O longo tempo de tratamento, associado a dificuldade de administração do medicamento e confinamento dos felinos, além do alto valor comercial do itraconazol por vezes fazem com que os tutores abandonem o tratamento ou mesmo, os próprios gatos (REIS et al., 2016).

O iodeto de potássio tem sido utilizado na dose de 20mg/kg, uma vez ao dia também por via oral em associação ao itraconazol. O iodeto de potássio em associação ao itraconazol tem demonstrado boa resolução em felinos portadores de esporotricose, principalmente em casos previamente tratados em monoterapia com itraconazol em período prolongado sem resolução ou que apresentem recidivas (REIS et al., 2016). Apesar de ser uma boa escolha para o tratamento da esporotricose, deve-se manter um acompanhamento do estado geral dos felinos submetidos à terapia principalmente por considerar os efeitos colaterais do iodismo como anorexia, perda de peso, vômito e demais alterações que comprometam o estado de saúde geral do paciente. Uma vez que o felino apresente um quadro de efeito colateral negativo, o tratamento deve ser imediatamente suspenso para controle dos sinais clínicos e de acordo com a resposta do felino, após uma semana de controle, pode se reiniciar o tratamento em uma dosagem menor que a preconizada previamente, sempre com acompanhamento clínico. O mecanismo de ação antifúngica dos iodetos não é totalmente compreendida até o momento, bem como sua atividade anti *sporothrix in vitro* ainda não foi confirmada (REIS et al., 2016).

Terbinafina e posaconazol apresentaram boas atividades *in vitro* contra fungos do complexo *sporothrix*, no entanto faltam estudos a respeito do seu uso e segurança em felinos com esporotricose (MEINERZ et al., 2007; REIS et al., 2016).

Além da terapia medicamentosa, em lesões localizadas a termoterapia com imersão ou aplicação de água quente em temperatura igual ou superior à 40°C pode ser indicada. A partir desta temperatura o crescimento de *S. schenckii* é inibido, no entanto, dependendo do local da lesão e/ou da cooperação do animal, a termoterapia pode ser dificultada (PEREIRA et al., 2009; HONSE et al., 2010).

Remoção cirúrgica de lesões localizadas quando não responsivas à tratamentos convencionais ou recidivas em regiões passíveis de cirurgia também são consideradas uma alternativa terapêutica. Ainda em termos cirúrgicos, a criocirurgia tem sido estudada mais recentemente como alternativa para os locais de difícil acesso cirúrgico e pobre resposta ao tratamento convencional. Isto porque de forma geral, defende-se que os organismos vivos são sensíveis à temperaturas extremas e o *S. schenckii* não é exceção (SOUZA et al., 2016).

De qualquer forma apesar de a esporotricose ser uma doença de ampla ocorrência e cada vez mais estudos a respeito de sua forma de atuação e permanência nos organismos hospedeiros, ainda há muito o que ser estudado a fim de solucionar o melhor manejo e controle.

3.3 FIV E FELV

O vírus da FeLV é um gammaretrovírus que apresenta quatro subtipos: FeLV-A, FeLV-B, FeLV-C e FeLV-T, onde cada subtipo utiliza um receptor específico para sua inserção na célula do hospedeiro. Destes, o FeLV-A é o único subtipo transmissível e é através dele que os demais subtipos irão sofrer mutação ou recombinação, capazes de influenciar na expressão clínica e desenvolvimento de doenças (PEREIRA et al., 2010). No entanto, o FeLV-T é uma variante com tropismo por células-T, e portanto pode estar particularmente associado à imunossupressão em felinos (ANDRADE et al., 2015).

O contato prolongado com secreções salivares dos felinos é o principal modo de transmissão do FeLV-A, podendo desta forma também ocorrer através de mordedura. Em um primeiro momento, a viremia acontece por replicação do agente no interior das células linfoides, mieloides e epiteliais. A fase de viremia persistente dar-se-á a partir da incapacidade de resposta do sistema imunológico do hospedeiro frente à destruição celular em massa, e é quando irão ocorrer as doenças progressivas relacionadas ao FeLV, como anemias arregenerativas e falência medular e o desenvolvimento de infecções oportunistas (ANDRADE et al., 2015).

Infecções oportunistas como as bacterianas que afetam o trato urinário, hemoplasnose, infecções de trato respiratório, peritonite infecciosa felina, estomatite crônica, bem como, infecções fúngicas como criptococose podem ocorrer em felinos FeLV positivos (ANDRADE et al., 2015).

Algumas infecções como criptococose por exemplo, parecem ocorrer com a mesma frequência em animais FeLV positivos e negativos, no entanto, a resposta destes felinos frente à infecção fúngica é deficiente e a infecção tende a ser mais severa devido à imunossupressão, assim como ocorrência de refratariedade às terapias (ANDRADE et al., 2015).

Já o vírus da imunodeficiência felina (FIV), é um lentivírus que é transmitido primariamente através da mordedura, que invade as células do hospedeiro através de um receptor expressado nas células CD4+ nos linfócitos T; linfócitos B e macrófagos ativados. A imunossupressão induzida por FIV ocorrerá devido à inibição da proliferação e indução de apoptose celular de células de defesa, o comprometimento das células T associado à alteração na funcionalidade de citocinas e anergia imunológica (BORBA-SANTOS et al., 2015).

Desta forma, a inabilidade do felino em desenvolver uma resposta imune adequada, o torna suscetível à patógenos oportunistas e o desenvolvimento de infecções crônicas em cavidade bucal, trato urinário, tegumento cutâneo, vias aéreas superiores, ou infecções persistentes por micobactérias, parasitas, entre outros (ANDRADE et al., 2015).

Inúmeros patógenos fúngicos são capazes de causar imunossupressão, incluindo *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, entre outros. O *cryptococcus* por exemplo, é capaz de suprimir a resposta do hospedeiro em favor do seu crescimento e permanência no organismo infectado (ANDRADE et al., 2015). Junto a isso, em algumas regiões do Brasil, como no Rio Grande do Sul, a esporotricose destaca-se pela gravidade das lesões podendo ocorrer de forma endêmica nos felinos (RODRIGUES et al., 2014).

Da mesma forma que na esporotricose, felinos machos não castrados, semidomiciliados ou de vida livre desempenham um importante papel na disseminação das retrovirose (RODRIGUES et al., 2014).

Estudos demonstraram que o vírus da FELV tem a capacidade de replicação in vitro em células de animais de outras espécies como cães; bovinos; macacos; murinos e humanos.

Relatos de infecção em felinos não domésticos em diversas partes do mundo tem sido reportados, inclusive em uma espécie de felino selvagem no sul do Brasil, o que implica na severidade e risco de vida destes animais na natureza (MONTENEGRO et al., 2014).

Em relação à taxa de prevalência mundial da FeLV, de 1989 a 1995 relata-se um decréscimo de 8 para 4% nos Estados Unidos, uma constante diminuição de 6 para 1% no período de 1993 a 2002 na Alemanha, uma prevalência entre 2,2 a 3,3% na América do Norte, a 2,9% na Ásia. Na Europa tem-se uma taxa que varia entre 1 a 15,6% de prevalência, provavelmente devido à diferenças de comportamento e distribuição ambiental dos felinos domésticos (MONTENEGRO et al., 2014).

Já a FIV tem uma taxa de prevalência na América do Norte de 4 a 24% e na Europa, varia de acordo com a localização, sendo a Itália onde há um maior percentual de gatos errantes e portanto, onde a taxa de prevalência pode atingir até 30% (MONTENEGRO et al., 2014).

No Brasil não existem dados a respeito da distribuição e prevalência destas retrovíroses apesar de constantes relatos de ocorrência em diversas localidades.

Não existem tratamentos curativos e específicos contra as retrovíroses uma vez que o animal seja infectado, sendo as retrovíroses, infecções que comprometem a vida dos felinos infectados.

3.4 Família Lamiaceae e compostos ativos em fungos do complexo *Sporothrix schenckii*

Na busca por novas opções terapêuticas, as espécies da família Lamiaceae se destacam. A família é composta por plantas aromáticas, sendo inúmeras espécies largamente utilizadas como medicinais, com uma enorme variedade conhecidas e utilizadas pelas populações a muito tempo, como orégano, alecrim, manjerona, manjerição, sálvia. Ainda, na família Lamiaceae, as espécies são bastante conhecidas por sua extensa produção de compostos voláteis ricos em substâncias ativas, os quais constituem os óleos essenciais. Com destaque para os gêneros *Origanum* spp., *Rosmarinus* spp. e *Salvia lavanduloides* (sálvia), devido a atividade in vitro contra patógenos fungos, destacando-se os fungos do complexo *Sporothrix schenckii* (CLEFF et al., 2010 ; WALLER et al., 2016).

Dentre as diversas propriedades biológicas que o gênero *Origanum* e *Rosmarinus* apresentam, podemos citar atividade antifúngica em espécies de interesse médico e veterinário, como *Candida* spp., *Malassezia pachydermatis* e *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, que têm sido sensíveis a diferentes plantas desta família.

Uma diversidade de compostos químicos tem sido identificados nos óleos essenciais e outros extratos de plantas da família Lamiceae e vem apresentando atividade em isolados clínicos e cepas padrões de fungos do complexo *Sporothrix schenckii*. Acredita-se que os compostos majoritários, sejam os responsáveis por atividade antifúngica diversa, com destaque para atividade anti-sporothrix. Dentre as substâncias reconhecidas estão o 1,8-cineol, 4-terpineol, timol, carvacrol, gama-terpineno, p-cimeno, sabineno, entre outras presentes nos óleos essenciais, enquanto que nos extratos hidroalcoolicos e etanólicos tem se destacado a quercetina, ácido cafêico, p-cumárico, etc as quais tem sido avaliados de forma isolada ou em associação em relação ao efeito anti-sporothrix.

De acordo com alguns autores, os compostos químicos, como timol, 4-terpineno, 4-terpineol, gama-terpineno, p-cimeno, etc., que apresentam anéis aromáticos na estrutura e grupo polar inserido nos anéis, consegue estabelecer uma ligação de hidrogênio aos sítios ativos de enzimas microbianas, o que permitiria o aumento de permeabilidade da membrana citoplasmática fúngica ocasionando alteração e/ou destruição da célula fúngica, explicando assim atividade desses compostos. Ainda, estas alterações poderiam levar a perda de constituintes citoplasmáticos da célula, como a depleção do esterol da membrana fúngica.

Em estudos recentes desenvolvidos pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil), a fase leveduriforme de *S. brasiliensis* isolado de cães e gatos foi sensível ao óleo essencial extraído de partes aéreas de *O. vulgare* coletadas no Chile e do óleo comercial originário da Moldávia frente a *S. brasiliensis* resistentes ao itraconazol. A atividade fungicida também foi demonstrada por ambos óleos essenciais em concentrações similares às fungistáticas (WALLER et al., 2016) Estudos com compostos isolados, como 4-terpineol, 1-8 cineol ,quercetina vem sendo desenvolvidos e tem demonstrado o efeito destes em isolados fungicos. Com destaque para a ação de tal composto em isolados de *S. schenckii*.

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Casuística de Felinos Portadores de Esporotricose e Retrovíroses: Estudo Retrospectivo em Área Endêmica

Ceres Nakasu; Stefanie Bressan Waller; Jessica Paola Salame; Renata Osório de Faria; Marlete Brum Cleff

Será submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Casuística de felinos portadores de esporotricose e retrovíroses: estudo retrospectivo em área endêmica

C. Nakasu^{1*}, S.B. Waller³, J.P. Salame⁴, R.O. Faria⁵, M.B. Cleff²

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil. *Autor para correspondência: ceresnaku@hotmail.com

²DSc. Departamento de Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

³Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil

⁴ Programa de Residência Multiprofissional em Clínica Médica de Animais de companhia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil

⁵de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil

RESUMO

A esporotricose é uma micose considerada endêmica no Rio Grande do Sul e apesar do seu caráter zoonótico, não é uma doença de notificação obrigatória. Tal qual a esporotricose, as retrovíroses dos felinos domésticos tem sido cada vez mais diagnosticadas na mesma região, no entanto são escassos dados a respeito da sua epidemiologia. Considerando a importância da compreensão da epidemiologia destas enfermidades, tanto para os felinos domésticos, quanto para os tutores e animais contactantes, o estudo objetivou realizar um estudo retrospectivo acerca da casuística de coinfeções por esporotricose e retrovíroses em felinos domésticos. O estudo analisou os registros sobre os felinos diagnosticados com esporotricose no Hospital de Clínicas Veterinárias e testados para retrovíroses entre os anos de 2013 a 2017. Do total de 112 casos de esporotricose felina, somente 41(36,6%) gatos foram testados para FIV/FelV, dos quais, 26 (63,41%) apresentaram resultado positivo para uma (39% FelV; 9,75%FIV) ou ambas (14,6%) retrovíroses. Houve aumento gradual na ocorrência de esporotricose ao longo dos 4 anos avaliados, assim como no número de animais testados e positivos para retrovíroses. Esporotricose, assim como as retrovíroses, são

enfermidades bastante prejudiciais aos felinos, apresentando prognóstico reservado, desfavorável ou até fatal. Desta forma, conclui-se que a esporotricose continua afetando grande número de felinos, sendo que 63,41% dos pacientes testados apresentaram-se co-infectados por retrovíruses, com destaque para FeLV, que foi a retrovíruses mais ocorrente.

Palavras chave: FIV, FeLV, *Sporothrix*, epidemiologia, gatos

ABSTRACT

Sporotrichosis is a mycosis considered endemic in Rio Grande do Sul and despite its zoonotic nature, it is not a notifiable disease. Like sporotrichosis, the retroviruses of domestic felines have been increasingly diagnosed in the same region, but there are few data on their epidemiology. Considering the importance of understanding the epidemiology of these diseases, both for domestic cats and for tutors and contact animals, the study aimed to conduct a retrospective study on the casuistry of sporotrichosis and retrovirus coinfections in domestic cats. The study analyzed the records on felines diagnosed with sporotrichosis at the Hospital of Veterinary Clinics and tested for retrovirus between the years 2013 to 2017. Of the total of 112 cases of feline sporotrichosis, only 41 (36.6%) cats were tested for IVF / FeLV, of which 26 (63.41%) presented positive results for one (39% FeLV, 9.75% IVF) or both (14.6%) retroviruses. There was a gradual increase in the occurrence of sporotrichosis over the 4 years evaluated, as well as in the number of animals tested and positive for retroviruses. Sporotrichosis, as well as retroviruses, are diseases that are very harmful to cats, presenting a reserved, unfavorable or even fatal prognosis. Thus, we conclude that sporotrichosis continues to affect a large number of felines, and 63.41% of the patients tested were co-infected with retroviruses, with FeLV being the most frequent retrovirus.

Key words: FIV, FeLV, *Sporothrix*, epidemiology, cats

INTRODUÇÃO

A variedade de agentes infecciosos capazes de induzir imunossupressão em felinos é extensa, e os mecanismos pelos quais estes agentes induzem a imunodeficiência no organismo do hospedeiro, em prol da sua própria manutenção, ainda não estão totalmente elucidados (SYKES, 2010).

Entre os principais agentes infecciosos que sabidamente causam imunossupressão em felinos estão os retrovirus, onde destacam-se o vírus da leucemia viral felina (FeLV) e o vírus da imunodeficiência felina (FIV). Apesar do conhecimento de que o FIV e a FeLV são agentes comuns na indução da imunodeficiência em gatos, ainda são escassos estudos que correlacione um aumento e/ou prevalência de infecções oportunistas por outros agentes (SYKES, 2010), como por exemplo, fungos do complexo *Sporothrix spp.*, em felinos portadores de retrovirose.

A esporotricose caracteriza-se como uma micose subcutânea causada pelo complexo de fungos *Sporothrix schenckii*, acomete humanos e animais, sendo o felino doméstico o animal que apresenta a maior frequência de casos (PEREIRA et al., 2014). Acredita-se que as apresentações clínicas da esporotricose variam de acordo com a condição do hospedeiro, a virulência do agente, a rota de infecção e a espécie de *Sporothrix* inoculada (FERNANDES et al., 2013). As formas clínicas clássicas de manifestação da micose são a forma cutânea localizada, linfocutânea e disseminada, podendo atingir dessa forma diversos órgãos e causar múltiplas lesões, sendo que o envolvimento ósseo também é possível, apesar de raros relatos (FRANCESCHI et al., 2017). A forma cutânea é caracterizada pela formação de múltiplos nódulos, por vezes com presença de crostas e ulcerações, sendo as regiões de face, membros e cauda as mais comumente afetadas nos felinos (HARTMANN, 2013). Secundário à progressão da forma localizada, pode ocorrer o comprometimento sistêmico, geralmente por consequência da auto-inoculação por lambedura ou arranhadura, disseminação hematogena ou linfática dos fungos (HARTMANN, 2013).

Diante do exposto, acredita-se que tanto as retrovirose quanto a esporotricose são enfermidades com potencial imunossupressor importante nos felinos domésticos, e que podem dificultar a resposta clínica a terapia, além do que, relatos a respeito da coexistência destes agentes ainda são escassos na literatura.

Levando em consideração a importância dos registros epidemiológicos em medicina veterinária, objetivou-se fazer um estudo retrospectivo acerca da casuística de coinfeções por esporotricose e retrovíroses em felinos domésticos atendidos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, e avaliar os impactos da coexistência de tais enfermidades na vida dos gatos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo transversal com coleta de dados de casos de esporotricose felina e incidência de coinfeção por retrovíroses. Avaliou-se dados independente de raça ou sexo dos pacientes atendidos no Hospital de Clínicas Veterinário da Universidade Federal de Pelotas (HCV- UFPel), Brasil, entre os anos de 2013 a 2017. O estudo foi desenvolvido a partir dos dados de consultas e avaliação das fichas clínicas dos casos em que houve diagnóstico definitivo de esporotricose, a partir de isolamento de fungos do complexo *sporothrix schenckii* e pesquisa concomitante de retrovíroses. Para detecção do vírus da imunodeficiência felina (FIV) e do vírus da leucemia felina (FeLV) no sangue total, soro ou plasma felino, utilizou-se o teste rápido comercial “Alere FIV Ac/FeLV Ag Test Kit®”, a partir de imunoenensaio cromatográfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das fichas clínicas avaliadas, observou-se 112 felinos portadores de esporotricose entre os anos de 2013 a 2017 no HCV – UFPel. Acredita-se que estes dados não representem a realidade da região em relação a micose, já que no Rio Grande do Sul apesar de ter regiões consideradas endêmicas, a notificação ainda não é obrigatória (SANCHOTENE et al., 2015). Um estudo realizado no sul do Rio Grande do Sul, demonstrou um aumento que variou de 0,75 novos casos de esporotricose por mês em 2010, para significativos 3,33 novos casos por mês em 2014, só na cidade de Rio Grande (SANCHOTENE et al., 2015). É provável que a baixa casuística observada em nosso estudo, seja devido a esporotricose ser uma micose bastante ocorrente em nossa região, e já ser identificada pelos tutores e veterinários locais, chegando poucos

felinos para diagnóstico da micose no Hospital Veterinário. Com relação a casuística de coinfeção por retrovírus, no ano de 2013 foram registrados 15 casos de esporotricose atendidos no HCV- UFPel, e destes, nenhum felino realizou o teste rápido para diagnóstico de retrovírus. No ano de 2014, de um total de 13 casos diagnosticados com esporotricose, 3 (23%) felinos foram testados para as retrovírus, sendo 2 (66,6%) felinos positivos para FeLV e 1 felino negativo para ambas. Já em 2015, de um total de 23 felinos portadores de esporotricose, 5 (21,73%) felinos foram testados para retrovírus e 2 (40%) foram positivos para FeLV; 1 (20%) positivo para FIV e FeLV, 1 positivo para FIV (20%), e 1 negativo para ambas. Em 2016, de 32 felinos atendidos com esporotricose, 7 (21,87%) felinos foram testados para retrovírus e destes, 3 (42,85%) felinos foram positivos para FeLV, 1 (14,28%) para FIV e FeLV e 3 foram negativos para ambas. Entretanto, até outubro de 2017, 29 casos de esporotricose felina foram diagnosticados e 26 (89,65%) destes felinos foram testados, sendo 9 (34,6%) positivos para FeLV, 4 (15,38%) para FiV e FeLV, 3 (11,5%) positivos para FIV e 10 negativos para ambas as retrovírus. A relação de animais diagnosticados com esporotricose, testados para retrovírus, bem como a taxa de ocorrência de FeLV e FiV nos felinos incluídos no estudo, podem ser observado na Figura 1.

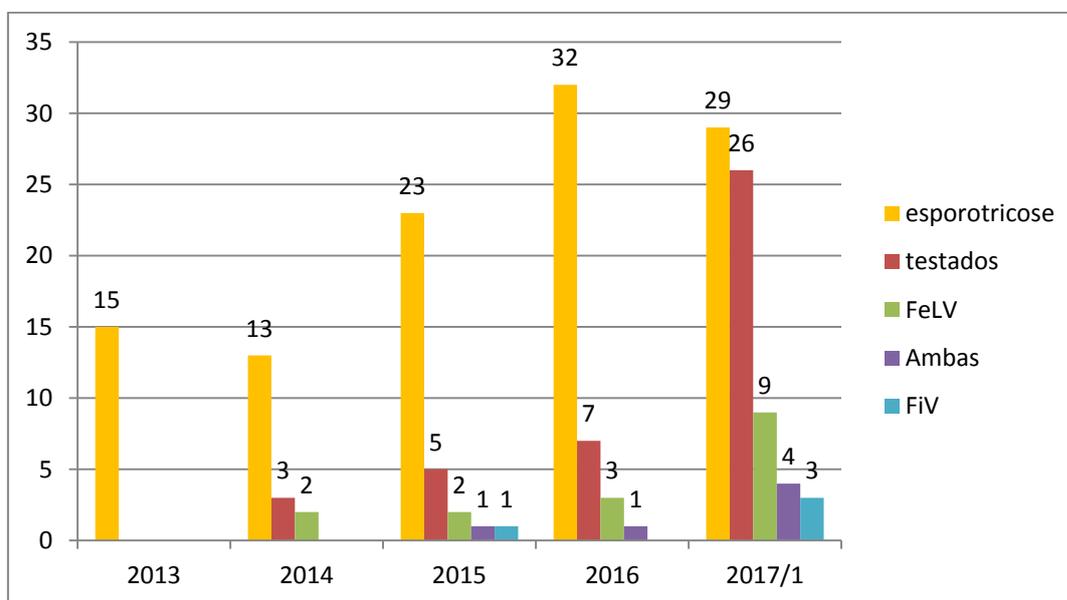


Figura 1: Demonstração de felinos diagnosticados com esporotricose, testados para retrovírus, e taxa de positividade para FeLV e FiV (HCV-UFPel, 2013 a 2017)

Do total de 112 gatos atendidos diagnosticados com esporotricose, somente 41 (36,6%) dos felinos foram testados para diagnóstico de retrovíroses, sendo que destes, 26 (63,41%) apresentaram diagnóstico de uma ou ambas retrovíroses. A taxa de prevalência mundial da FeLV é bastante variável, indo de 1% a 84% em felinos clinicamente saudáveis e, de 12% a mais de 30% entre felinos doentes ou em grupos de risco, onde a infecção foi recentemente introduzida. A incidência da FeLV é significativamente maior em gatos com acesso à rua comparado aos domiciliados (HAGIWARA; JUNQUEIRA-JORGE; STRICAGNOLO, 2007; PAULA, 2014), sendo considerado um dos patógenos infecciosos mais importante como causador de morte nos felinos no mundo todo (KIM et al., 2013). Assim como o FeLV, o FIV também tem distribuição mundial, e sua incidência está diretamente relacionada a densidade populacional, relacionado ao estilo de vida, idade, gênero e saúde do felino infectado. Estima-se uma soroprevalência de 1% a 14% de FIV em gatos com sinais clínicos e até 44% em animais doentes (LEITE et al., 2013). De acordo com estudos epidemiológicos, a taxa de prevalência de FeLV é maior quando comparada a FIV, o que está de acordo com os dados demonstrados nos felinos do presente estudo.

No Brasil taxas de prevalência de FeLV variam de 8% a 63% de acordo com pesquisas em gatos domésticos domiciliados e errantes, nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Rio Grande do Sul (CALDAS et al., 2000; SOUZA et al., 2002; CAXITO, 2003; ALMEIDA et al., 2004., TEIXEIRA et al, 2007 citado por PAULA et al., 2014). Sendo que na região Sul do Brasil, estudos avaliando a ocorrência de felinos portadores de FeLV são escassos (MEINERZ et al., 2010).

Apesar de somente 41 (36,6%) dos 112 felinos incluídos em nosso estudo terem sido avaliados para retrovíroses, os índices de positividade demonstraram que mais da metade da população testada estava positiva (63,41%) para um ou ambos agentes virais, sendo que a maior prevalência encontrada foi de FeLV, com 16 (39%) felinos positivos, seguido de 6 (14,6%) felinos FIV e FeLV positivos, e de 4 animais (9,75%) FIV positivos. Estes índices são bem superiores aos citados na literatura, onde estudo realizado na mesma região, avaliando 120 felinos no ano de 2010, observou-se taxa de prevalência da FeLV de 38,3% (MEINERZ et al., 2010).

Estudo realizado em 2005, na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, observou que em uma população de 90 gatos, que viviam em um aglomerado em precárias

condições higiênico-sanitárias, 18 animais apresentavam diagnóstico de esporotricose e ao serem testados para retrovírus, resultou em 22,2% de felinos positivos para FeLV. A partir dos resultados obtidos, os autores defendem que a coinfeção de esporotricose e retrovírus, associado ao modo de vida dos felinos, pode ter sido um provável fator agravante para os quadros clínicos observados (SOUZA et al.,2005).

Observa-se que nos anos iniciais do estudo, apenas uma pequena parcela da população de felinos foi avaliada quanto a retrovírus (em torno de 20%) e, somente no último ano e a partir da verificação da presença de FeLV e FiV na população de felinos atendidos na região é que os testes foram intensificados. Apesar da literatura recomendar a verificação da presença de retrovírus nos felinos domésticos, esta prática ainda não foi incorporada a triagem básica nos ambientes veterinários, justificado pelo custo dos testes, mas é provável que ocorra devido ao desconhecimento quanto a importância de diagnóstico das retrovírus. Felinos FeLV positivos frequentemente são acometidos por infecções oportunistas, como infecções bacterianas de trato urinário e respiratório, as hemoplasmoses, infecções virais como peritonite felina e estomatite crônica, bem como, infecções fúngicas (SYKES, 2010).

É importante salientar que os felinos avaliados neste estudo apresentavam sinais clínicos e diagnóstico de esporotricose, e que foram testados para retrovírus em função da pesquisa, mas que as manifestações clínicas de FiV e FeLV podem não terem sido observadas ou até mesmo negligenciadas, especialmente em pacientes com outras enfermidades concomitantes como foi o caso. Segundo a literatura, a patogênese do FeLV varia de acordo com o estado imunitário de cada gato, podendo se apresentar de forma latente e não infecciosa, transitória ou regressiva, atípica, ou ainda progressiva, onde irão ocorrer enfermidades, como anemias arregenerativas e falência medular ou desenvolvimento de infecções oportunistas (LEITE 2013).

Ainda hoje, são escassos os estudos a respeito do papel exato da resposta imunológica de felinos sobre a esporotricose e retrovírus, bem como a inter-relação entre a resposta imunológica na presença de doenças fúngicas e retrovirais coexistentes (MIRANDA 2016). Felinos infectados com FIV e/ou FeLV podem apresentar as barreiras imunológicas comprometidas e com isto, facilitar a ocorrência de enfermidades oportunistas como a esporotricose, que é considerada uma importante zoonose (LEITE 2013). Assim, torna-se relevante a conscientização, tanto de tutores

como dos profissionais da área da saúde, acerca da importância do reconhecimento das retrovíroses nos felinos e do papel que desempenham na perpetuação de infecções oportunistas, como no caso da esporotricose assim como, sua influência na resposta terapêutica dos felinos acometidos.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, foi possível perceber um aumento gradual na ocorrência de esporotricose ao longo dos 4 anos avaliados pelo estudo, demonstrando que a região sul Rio Grande do Sul, pode ser considerada endêmica, especialmente considerando que estes dados são referentes à atendimentos realizados apenas no Hospital de Clínicas Veterinário, e que por não ser uma doença de notificação obrigatória, a taxa de ocorrência pode ser ainda maior na região como um todo. Além da esporotricose, a prevalência de retrovíroses também demonstrou um aumento significativo quando em comparação a estudos prévios de incidência na mesma região.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FRANCESCHI, N.T.; SPANAMBERG, A.; DHEIN, J.O.; et al. Esporotricose óssea em gato causada por *Sporothrix brasiliensis*. *Acta Scie. Vet.*, v.45, n.1, p.1-5, 2017.

HAGIWARA, M.K.; JUNQUEIRA-JORGE, J.; STRICAGNOLO, C. Infecção pelo Vírus da Leucemia Felina em gatos de diversas cidades do Brasil. *Clín. Vet.*, n.66, p.44-47, 2007.

KIM, W.S.; CHONG, C.K.; KIM, H.Y.; et al. Development and clinical evaluation of a rapid diagnostic kit for feline leukemia virus infection. *J. Vet. Sci.*, v.15, n.1, p.91-97, 2014.

LEITE, R.C.; REIS, J.K.P.; OLIVEIRA, A.P.; et al. Retrovíroses dos animais domésticos. *Vet. Zootec.*, v.20, p.73–93, 2013.

LLORET, A.; HARTMANN, K.; PENNISI, M.G.; et al. 2013. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.*, v.15, n.7, p.619-623, 2013.

MEINERZ, A.R.M.; ANTUNES, T.A.; SOUZA, L.L.; et al. Frequência do vírus da Leucemia Felina (VLF_e) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. *Ci. Anim. Bras.*, v.11, n.1, p.90 - 93, 2010.

MIRANDA, L.H.M. ; CONCEIÇÃO-SILVA, F. ; QUINTELLA, L ; et al. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.36, p.425-432, 2013.

PAULA, E.M.N.; CRUZ, C.A.; MORAES, F.C.; et al. Características epidemiológicas da Leucemia Viral Felina. *PUBVET*, v.8, n.16, p. 1940-2029, 2014.

PEREIRA, S.A.; GREMIÃO, I.D.F.; KITADA, A.A.B.; et al . The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.47, n.3, p.392-393, 2014

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.

SOUZA, L.L.; NOBRE, M.O.; SILVEIRA, E.; et al. Esporotricose em gatos portadores do vírus da leucemia felina. *Rev. Bras. Ci. Vet.*, v.12, n.1-3, p.99-101, 2005.

SYKES, J.E. Immunodeficiencies caused by infectious diseases. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v.40, n.3, p.409–23, 2010.

4.2 Artigo 2

Epidemiologia e fatores de resistênciada da esporotricose felina na região Sul do Rio Grande do Sul

Ceres Nakasu; Stefanie Bressan Waller; Jessica Paola Salame; Marlete Brum Cleff

Será submetido à revista Veterinary Dermatology

Epidemiologia e fatores de resistênciada da esporotricose felina na região Sul Do Rio Grande Do Sul

Ceres Nakasu¹, Stefanie B. Waller³, Jessica P. Salame⁴, Marlete B. Cleff²

¹Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil

²DSc. Departamento de Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas

³Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil

⁴ Programa de Residência Multiprofissional em Clínica Médica de Animais de companhia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil

RESUMO

A região sul do Brasil é considerada endêmica para esporotricose, no entanto, a notificação da enfermidade não é obrigatória. A transmissão direta da doença entre os felinos domésticos e o homem, caracteriza a esporotricose como uma enfermidade zoonótica emergente. Ainda, as dificuldades frente ao tratamento da esporotricose felina podem acarretar em abandono do tratamento ou mesmo dos próprios gatos, culminando com a resistência fúngica, proliferação da doença e dificuldade no controle da enfermidade. Considerando a escassez de registros a respeito do histórico e epidemiologia de felinos portadores de esporotricose na região, realizou-se o estudo objetivando relatar o histórico de felinos com esporotricose atendidos no sul do Rio Grande do Sul, descrever as características clínicas apresentadas, bem como avaliar os protocolos terapêuticos instituídos. O trabalho foi desenvolvido á partir de dados coletados de felinos positivos, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinário da UFPel, entre os anos de 2016 e 2017. Á partir dos resultados obtidos, foi constatado que de um total de 14 felinos com esporotricose, 10 (71,4%) eram machos e 4 (28,5%) eram fêmeas. Cinco (35,71%) pacientes apresentaram uma ou mais recidivas das lesões de esporotricose, 3 (21,42%) estavam em tratamento há mais de três meses sem melhora clínica, e 2 (14,28%) gatos haviam sido recolhidos da rua com lesões e sem histórico e vieram a óbito. Todos os felinos portadores de esporotricose, apresentavam lesões disseminadas mesmo após tratamento com antifúngicos. Com isto, observa-se a necessidade de maiores estudos a respeito do comportamento da doença, bem como, analisar a efetividade dos protocolos utilizados para os felinos com esporotricose.

Palavras-chave: Gatos; recidiva; terapêutica; retrovíroses; zoonose

ABSTRACT

The southern region of Brazil is considered endemic for sporotrichosis, however, notification of the disease is not mandatory. Direct transmission of the disease between domestic felines and man, characterizes sporotrichosis as an emerging zoonotic disease. Still, the difficulties with the treatment of feline sporotrichosis can lead to abandonment of the treatment or even of the cats

themselves, culminating with fungal resistance, proliferation of the disease and difficulty in controlling the disease. Considering the scarcity of records regarding the history and epidemiology of felines with sporotrichosis in the region, the study was carried out in order to report the history of felines with sporotrichosis treated in southern Rio Grande do Sul, to describe the clinical characteristics presented, as well as to evaluate the established therapeutic protocols. The work was based on data collected from positive cats, attended at the Hospital of Veterinary Clinics of UFPel, between 2016 and 2017. From the results obtained, it was observed that out of a total of 14 felines with sporotrichosis, 10 (71.4%) were males and 4 (28.5%) were females. Five (35.71%) patients had one or more recurrences of sporotrichosis lesions, 3 (21.42%) had been treated for more than three months without clinical improvement, and 2 (14.28%) cats had been collected from street with injuries and without history and came to death. All cats with sporotrichosis had disseminated lesions even after antifungal treatment. With this, it is observed the need for further studies regarding the behavior of the disease, as well as, to analyze the effectiveness of the protocols used for felines with sporotrichosis. Keywords: Cats; recurrence; therapy; retroviruses; zoonosis

INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma micose subcutânea que tem como agentes causadores um conjunto de espécies fungicas pertencentes ao complexo *Sporothrix Schenckii* (RODRIGUES et al., 2013, TELLEZ et al., 2014; BAZZI et al., 2016). Dentre as espécies destacam-se *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa* e *S. Schenckii*, distribuídos ao redor do mundo, incluindo Japão, China, Austrália, Índia, América Central e América do Sul, sendo que no Brasil a espécie *S. brasiliensis* tem maior ocorrência (STOPIGLIA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; CHAKRABARTI et al., 2015). As espécies pertencentes ao complexo *S. Schenckii* diferem entre si em relação a distribuição geográfica, propriedades biomecânicas, graus de virulência e padrão de doença (RODRIGUES et al., 2014; CHAKRABARTI et al., 2015). Entre os países da América do Sul, o Brasil encontra-se como uma das regiões de maior incidência da esporotricose, provavelmente ligado ao fato de que os fungos deste complexo são particularmente mais comuns em regiões tropicais e subtropicais, com clima úmido e quente, que favorecem o seu crescimento (MARIMON et al., 2007; LARSSON, 2011; RODRIGUES et al., 2013; TELLEZ et al., 2014).

Sporothrix spp. é um fungo dimórfico, que se apresenta na forma filamentosa em temperatura ambiente de 25°C, e leveduriforme em temperaturas em torno de 37°C, o que faz com que a temperatura corporal de humanos e animais, sejam apropriadas ao seu desenvolvimento. *Sporothrix* spp. apresentam-se como sapróbios do solo, estando comumente presentes em locais como madeira em decomposição, troncos e vegetais (LARSSON, 2011; ALMEIDA, 2015; OROFINO-COSTA et al., 2017). A inoculação fúngica ocorre através de implantação traumática no tegumento cutâneo, seja através de farpas ou espinhos que contenham o fungo ou mesmo, ou através de arranhadura ou mordedura de gatos infectados. Desta forma, a esporotricose é uma doença comum aos profissionais de áreas rurais que lidam diretamente com o solo ou plantas, como fazendeiros e jardineiros, bem como pessoas que tenham contato direto com felinos e caninos infectados, como

profissionais da área de medicina veterinária e tutores de gatos domésticos (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013; TELLEZ et al., 2014; ALMEIDA et al., 2015).

A transmissão direta da doença, entre os felinos domésticos enfermos ou portadores assintomáticos e o homem, caracteriza a esporotricose como uma enfermidade zoonótica emergente (LARSSON, 2011; REIS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014). Neste contexto, os gatos tem demonstrado ser um importante veículo de disseminação de fungos do complexo *Sporothrix Schenckii* em epidemias de longa duração no Brasil, devido a suas características como vetor no ciclo de transmissão da doença (LARSSON, 2011; RODRIGUES et al., 2014; SANCHOTENE et al., 2015). Não existe predileção por sexo ou idade para ocorrência de esporotricose nos felinos, no entanto, devido aos hábitos comportamentais da espécie, como disputa por territórios ou fêmeas, os machos se tornam mais suscetíveis à infecção fúngica (MEINERZ et al., 2007; LARSSON, 2011; CRUZ, 2013; MIRANDA et al., 2013; CHAKRABARTI, et al., 2015).

As características morfológicas das lesões na esporotricose variam de nódulos, placas, lesões ulcerativas ou nodulocísticas, até inchaços ou massas subcutâneas, sendo que esta heterogeneidade pode dificultar o diagnóstico clínico, principalmente em regiões não endêmicas, prolongando o curso clínico da doença e tornando-se um fator de morbidade importante na saúde pública (MIRANDA et al., 2013).

O diagnóstico e tratamento da micose, nos humanos e felinos infectados é o principal pilar para a prevenção da transmissão da esporotricose. É de suma importância considerar que, o tratamento dos animais doentes, necessita de um período longo de atenção, além de investimento por parte do tutor, sendo que esta fase deve ser bem orientada, já que devido a estes fatores muitas vezes o responsável pelo animal desiste do tratamento, dificultando o controle da micose (CRUZ, 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho foi de relatar o histórico de 14 felinos diagnosticados portadores de esporotricose, provenientes de três cidades do sul do Rio Grande do Sul, bem como, descrever as características clínicas apresentadas por estes pacientes, e avaliar a escolha e a resposta aos protocolos terapêuticos instituídos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um levantamento à partir de dados coletados de felinos portadores de esporotricose, atendidos no Hospital de Clínicas Veterinário da Universidade Federal de Pelotas (HCV-UFPe), entre os anos de 2016 e 2017. Para o estudo, foi realizada coleta de material das lesões cutâneas presentes nos felinos, durante consulta clínica, onde utilizou-se zaragatoas estéreis que foram acondicionadas e encaminhadas para diagnóstico micológico no Laboratório de Micologia da UFPe (MICVET).

Foram considerados para o estudo, felinos que apresentassem lesões características ou suspeitas de esporotricose, independente de raça, idade ou sexo.

Os tutores responsáveis pelos animais foram questionados a respeito do histórico dos felinos em relação ao tempo de aparecimento de lesões e de tratamento, tratamentos anteriormente instituídos e respostas dos pacientes a terapia até o momento da consulta, assim como foi observado o padrão de lesões presentes (cutânea, cutâneafixo ou cutâneo disseminado) nos animais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de estudo, foram atendidos 14 felinos domésticos, todos com diagnóstico confirmado para esporotricose, em que os tutores aceitaram participar da pesquisa. Destes, 10 (71,4%) felinos eram machos, e 4 (28,5%) eram fêmeas. Segundo a literatura, na esporotricose não existe predileção por sexo ou idade, embora felinos machos, jovens, inteiros e semidomicilados tenham maior incidência da micose, devido a maior envolvimento em confrontos com outros gatos por questões de territorialismo e reprodução (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013; MIRANDA et al., 2013; CHAKRABARTI et al., 2015). Trabalho desenvolvido na região Sul do Rio Grande do Sul, observou ampla distribuição geográfica para os casos de esporotricose diagnosticados, destacando a dinâmica de transmissão da doença entre a população felina nas áreas urbanas estudadas. Chamando a atenção para a maior prevalência da micose em felinos machos, com livre acesso à rua e que desenvolveram lesões cutâneas ulceradas mais de 30 dias antes do diagnóstico ser realizado, o que leva ao agravamento do cenário da enfermidade (SANCHOTENE et al., 2015). Tais características estão de acordo com os dados encontrados no presente estudo, onde entre os felinos machos atendidos, somente dois eram castrados, apresentando livre acesso à rua e outros animais.

Entre os felinos machos inteiros, quatro deles foram acolhidos da rua já apresentando lesões disseminadas e, os outros quatro eram semi domiciliados, com histórico de brigas com animais de vida livre. Já entre as quatro fêmeas, duas irmãs que viviam juntas eram castradas, no entanto, mantiveram contato parcial com um felino macho portador de esporotricose, que vivia no mesmo domicílio, e que veio à óbito dois meses antes do desenvolvimento das lesões nas mesmas. A outra fêmea foi resgatada com lesões e tratada durante aproximadamente um ano, sem resposta clínica, propiciando o desenvolvimento de lesões disseminadas de forma grave e irresponsiva aos protocolos terapêuticos. E por fim, uma gata jovem, com alteração pós fratura em membro, foi encaminhada para amputação de membro pélvico, e um período após a cirurgia, desenvolveu esporotricose no local da amputação. Segundo a tutora, a gata não tinha acesso à rua ou à outras fontes possíveis de infecção.

Os dados apresentados, são de extrema importância para uma melhor compreensão da epidemiologia da esporotricose, do desenvolvimento da doença, das lesões clínicas, do comportamento do fungo no ambiente e a transmissão entre animais e humanos. Rodrigues et al. (2013), sugere que o contato direto entre felinos, e entre felinos e humanos, associado à brigas, mordidas e arranhões podem contribuir para a transmissão horizontal da micose em um curto período de tempo. Outra dado importante é que, o fungo não morre no momento em que o hospedeiro vem a óbito, desta forma, devido ao mecanismo de termotolerância e resistência no ambiente, o agente pode ser transmitido para o próximo hospedeiro. Tal fato está de acordo com o que foi observado no caso das duas fêmeas domiciliadas, que viviam no mesmo ambiente em que um felino veio a óbito devido a esporotricose, sendo que as fêmeas somente apresentaram sintomas clínicos meses após estabelecido o contato. Apesar da ocorrência e do diagnóstico frequente, considera-se que a

esporotricose é uma doença negligenciada em humanos e animais, mesmo sendo a micose subcutânea mais frequente na América Latina (MONTENEGRO et al., 2014).

Com relação à distribuição das lesões avaliadas nos 14 felinos no momento da consulta, 4 (28,57%) pacientes apresentaram lesões disseminadas por todo corpo. Dos pacientes, 3 (21,42%) apresentaram lesões apenas na região facial, porém com histórico prévio de lesões disseminadas, um (33,3%) apresentava histórico de mais de três anos com lesões focais esporádicas, utilização de diversos protocolos terapêuticos e sem cura clínica definitiva. Ainda, 6 (42,85%) felinos apresentaram lesões disseminadas entre região cefálica, membros e cauda, enquanto um felino (9%) apresentou lesões apenas em regiões de membros. A distribuição das lesões está de acordo com a literatura, que descreve que felinos com esporotricose tendem a apresentar lesões em região facial, coxins, cauda e ao longo do corpo (CRUZ, 2013; MIRANDA et al., 2013; CHAKRABARTI et al., 2015). Do total de 14 felinos avaliados, 13 (71,42%) apresentaram no momento da consulta, histórico de terem apresentado lesões múltiplas ou disseminadas, que podem ter sido desenvolvidas devido a presença de grande quantidade de leveduras na superfície corporal e nas áreas de lesão dos felinos com a micose, favorecendo a evolução da forma clínica localizada para disseminada nos animais, através da prática de grooming e auto inoculação em episódios de prurido, por exemplo (CRUZ 2013). Dados da literatura consideram que, mesmo não havendo relação direta entre felinos portadores de retrovírus e a predisposição à infecções fúngicas (MEINERZ et al., 2010) como esporotricose por exemplo, há possibilidade de que a coinfeção por ambas enfermidades possa influenciar negativamente a resposta imunológica dos felinos, afetando assim a resposta ao tratamento e o desenvolvimento das alterações manifestadas (LEITE et al., 2013; MIRANDA et al., 2015; BAZZI et al., 2016).

No atual estudo, quanto ao histórico de protocolos terapêuticos utilizados e respostas aos tratamentos para esporotricose, obteve-se que 5 (35,71%) dos 14 pacientes apresentaram uma ou mais recidivas das lesões da micose.

O histórico e evolução dos casos positivos para a micose e atendidos no HCV- UFPel podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1: Histórico de felinos com esporotricose atendidos no HCV-UFPel no período de 2016 a 2017.

S/H: Sem histórico; S/R: Sem resposta; FPV: FPV: Fármaco padrão veterinário; FPH: Fármaco padrão humano; FM: Fármaco Manipulado.

Felino	Sexo	Município	Retrovíroses	Tempo tratamento	Lesões	Tratamento	Evolução clínica
G1	Macho	Pelotas	FIV/FeLV	S/H	Disseminada	S/H	óbito
G2	Macho	Rio Grande	FIV/FeLV	S/H	Disseminada	Itraconazol 100mg/gato	1 recidiva
G3	Macho	Pelotas	FeLV	> 12 meses	Disseminada	Diversos antifúngicos	Lesão focal em plano nasal e abandono de tratamento
G4	Macho	Rio Grande	Negativo	S/H	Disseminada	S/H	óbito
G5	Fêmea	Pelotas	Negativo	> 12 meses	Disseminada	Itraconazol, fluconazol, cetoconazol, (manipulados)pvpi, antibiótico	óbito
G6	Macho	Capão do Leão	Negativo	> 90 dias	Disseminada	Itraconazol 50mg/gato, (manipulado), antibiótico	Resistente
G7	Fêmea	Pelotas	Negativo	10 dias	Disseminada	Spray cicatrizante	S/R
G8	Fêmea	Rio Grande	Negativo	30 dias	Localizada	Itraconazol 25mg/gato, antibiótico	S/R
G9	Macho	Pelotas	Negativo	>12 meses	Disseminada	Itraconazol (25mg/gato/30 dias;50mg/gato/180 dias;100mg/gato até o presente (manipulado)	Lesão focal em região periocular
G10	Macho	Pelotas	Negativo	> 90 dias	Disseminada	Antibióticos, meloxicam 1mg, itraconazol 25mg/gato (manipulado)	Abandono do tratamento
G11	Macho	Pelotas	Negativo	> 12 meses	Disseminada	Itraconazol 100mg/gato (comercial, veterinário e manipulado)	Lesão focal em plano nasal
G12	Macho	Pelotas	Negativo	S/H	Disseminada	Itraconazol 100mg/gato (manipulado)	Lesão focal em plano nasal e abandono do tratamento
G13	Macho	Capão do Leão	FeLV	>60dias	Disseminada	Itraconazol 100mg/gato, iodeto de potássio 20mg/kg, leucogem	Resposta clínica positiva até o momento
G14	Fêmea	Pelotas	Negativo	10 dias	Disseminada	Spray cicatrizante	S/R

Quanto ao histórico de protocolos terapêuticos utilizados e respostas ao tratamento para esporotricose, obteve-se que 5 (35,71%) dos 14 pacientes apresentaram uma ou mais recidivas das lesões da micose. Em todos felinos, a recidiva ocorreu uma ou mais vezes, mesmo tratando, sendo que um (20%) era FIV e FeLV positivo (G2), proveniente das ruas sem histórico, com lesões disseminadas em região facial e membro anterior, e apresentou uma recidiva após 60 dias de terapia com itraconazol (100mg/Gato) em ambiente hospitalar. Dentro deste mesmo grupo, um (20%) dos felinos (G3) era FeLV positivo, foi recolhido das ruas por uma tutora protetionista, a qual tentou diversos protocolos terapêuticos (tutor não soube citar quantos e nem quais foram fármacos), e ao final de três anos sem cura clínica, desistiu do tratamento, sendo que o felino apresentava uma lesão única localizada internamente em plano nasal e sem resolução após 36 meses de tratamento. Por fim, outros 2 (40%) felinos (G9 e G11) que apresentaram vários episódios de recidiva com históricos semelhantes, eram negativos para retrovírus. Ambos, utilizaram itraconazol (100mg/gato) por mais de um ano e permaneceram com lesão única, localizada também em interior de cavidade nasal sem resolução. O que diferenciava os pacientes, é que um dos felinos era proveniente das ruas, tratado durante 26 meses em ambiente hospitalar com medicamento manipulado, enquanto o outro apesar de ter uma tutora, era semidomiciliado e mesmo com uso de medicamento comercial, admite algumas falhas durante administração do tratamento. O tratamento para esporotricose, com itraconazol, tem uma média de no mínimo três meses de administração contínua, e mais um mês após desaparecimento das lesões. Desta forma, dependendo da extensão das lesões apresentadas e do estado imunológico do paciente afetado, associado ao sucesso de administração terapêutica, o tratamento pode variar de meses a até mesmo anos, sem haver a resolução das lesões (REIS et al., 2016). De acordo com a literatura, dependendo do histórico prévio de tratamento e resistência a antifúngicos, infiltração em ossos da cavidade nasal pode ocorrer em 12,5% a 41,2% dos pacientes (FRANCESCHI et al., 2017).

Do total dos 14 felinos avaliados, 2 (14,28%) pacientes (G6, G10) negativos para FIV e FeLV, estavam em tratamento há mais de três meses, com itraconazol comercial e sem evolução de resposta clínica no momento da consulta. Em um dos casos, a tutora relatou que havia doado o felino antes do aparecimento clínico da doença, e quando o novo tutor percebeu o desenvolvimento das lesões, decidiu não ficar com o animal, devolvendo-o. Para este paciente (G10) foi prescrito uso de enrofloxacino (50mg, VO, SID, 10 dias), itraconazol comercial (25mg, VO, SID, 10 dias) e meloxicam (1mg, VO, BID, 5 dias). A tutora repetiu o mesmo protocolo algumas vezes, por conta própria, e decidiu consultar quando percebeu que não havia resolução do quadro clínico, relatando ainda não ter condições financeiras de manter o tratamento. A mesma não tinha conhecimento a respeito da definição de doença zoonótica. Embora a região do estudo, seja uma região considerada endêmica para esporotricose, percebe-se que a população ainda não tem conhecimento exato a respeito das zoonoses e o impacto destas na saúde pública. O longo período de tratamento, associado a dificuldade de administração do medicamento e confinamento dos felinos, além do alto valor comercial do itraconazol e outros fármacos, propiciam o abandono do tratamento pelos tutores e até mesmo o abandono dos animais (REIS et al., 2016), e isto pode representar um importante obstáculo no controle da doença (CRUZ, 2013; PEREIRA et al., 2014).

No histórico do outro felino (G5), inclui o uso constante de antifúngicos como cetoconazol, fluconazol e itraconazol, todos manipulados e sem resposta clínica.

Lamentavelmente, quando o felino foi incluído no presente estudo, as lesões já estavam em caráter disseminado, evoluindo em poucos dias para óbito. O protocolo clássico de tratamento para esporotricose em felinos no Brasil é com a utilização de fármacos azólicos, como o cetoconazol e itraconazol, e em alguns casos utiliza-se triazólicos como fluconazol. O itraconazol tem sido a escolha medicamentosa, entre os demais antifúngicos, devido sua alta eficácia e segurança, com baixo índice de efeitos adversos (ROSSI, 2013). Entretanto, o uso indiscriminado e inadequado dos azóis nos felinos domésticos, bem como, uso de medicamentos como imunossupressores, podem favorecer a evolução para a forma disseminada da esporotricose (LARSSON, 2011). Além da falha terapêutica, a demora em procurar o atendimento para diagnóstico precoce, aliada a escolha errônea do protocolo de tratamento ideal para cada caso, são fatores prejudiciais para o controle da micose (PEREIRA et al., 2014).

Ainda, outro felino (G6) com tratamento durante 90 dias, foi indicado o uso de itraconazol (50mg/gato) manipulado, uma vez ao dia, além de ter feito uso de enrofloxacino no estágio inicial da doença para controle de infecções oportunistas. O felino convivia no mesmo ambiente com dois cães, que apresentaram lesão única em região palmar, sendo também diagnosticados positivos para esporotricose. A tutora, que administrava as medicações para o felino, também apresentou uma lesão na mão, no entanto o exame foi negativo para esporotricose. Destaca-se ainda neste caso, que a residência era localizada em zona rural, com grandes áreas de terra e presença de roseiras onde o felino vivia solto. O contato com animais infectados, em especial, aqueles felinos errantes recolhidos e/ou tratados por quem decide por acolhê-los, tem sido relatado como um grande risco para transmissão da micose (BARROS et al., 2008, OROFINO-COSTA et al., 2014). Como o fungo encontra-se no ambiente, estando normalmente presente no solo, vegetais secos ou em decomposição, os felinos por seus hábitos naturais de escavar terra, encobrir dejetos e arranhar troncos, acabam por carrear o agente etiológico nas unhas, bem como na cavidade oral devido ao hábito de higienização por lambedura. A infecção fúngica ocorre através da inoculação traumática do agente no tegumento e assim, através da arranhadura ou mordedura, os felinos transmitem e inoculam o fungo a outros animais e ao homem (PEREIRA et al., 2009; MADRID, 2009; LARSSON, 2011; MONTENEGRO et al., 2014).

Por fim, 2 (14,28%) gatos (G1 e G4) que haviam sido recolhidos da rua com lesões disseminadas, e sem histórico de tratamento, sendo um deles positivo para FIV e FeLV, evoluíram para óbito em poucos dias. Alguns autores relatam que apesar das retroviroses, como FeLV e FIV, não serem fatores predisponentes para a esporotricose nos felinos, estes podem estar relacionadas ao agravamento do quadro clínico apresentado (DUNSTAN, 1986; DAVIS e TROY 1996; SCHUBACH, 2008; SOUZA 2010). Em contrapartida, estudos recentes defendem que o fato do felino ser portador de alguma retrovírose, não interfere na severidade das lesões clínicas e, sim na resposta do felino à doença em geral, e levantam a hipótese de que a severidade das lesões esteja diretamente relacionadas à cepa fúngica infectante. No Brasil, se tem observado predominantemente *S. brasiliensis* nas lesões, tanto em gatos quanto em humanos, a qual é descrita como a mais patogênica entre as espécies do complexo *Sporothrix* (MIRANDA 2013, MONTENEGRO 2014, DELLA TERRA 2017).

A apresentação clínica e aspecto das lesões dos felinos (G3, G11, G12, G13, G1) com esporotricose pode ser observada nas figuras abaixo (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5).



Figura 1: (G3) Lesões focais em plano nasal após 3 anos de tratamento antifúngico.



Figura 2.A e 2.B: (G11) Lesões focais em plano nasal após 1 ano de tratamento antifúngico.



Figura 3.A e 3.B: (G12) Lesões focais em plano nasal após 2 anos de tratamento antifúngico.



Figura 4.A, 4.B e 4.C: (G13) exemplo de lesões disseminadas em regiões de face, membros e cauda, como exemplo de regiões mais comuns de desenvolvimento da micose.

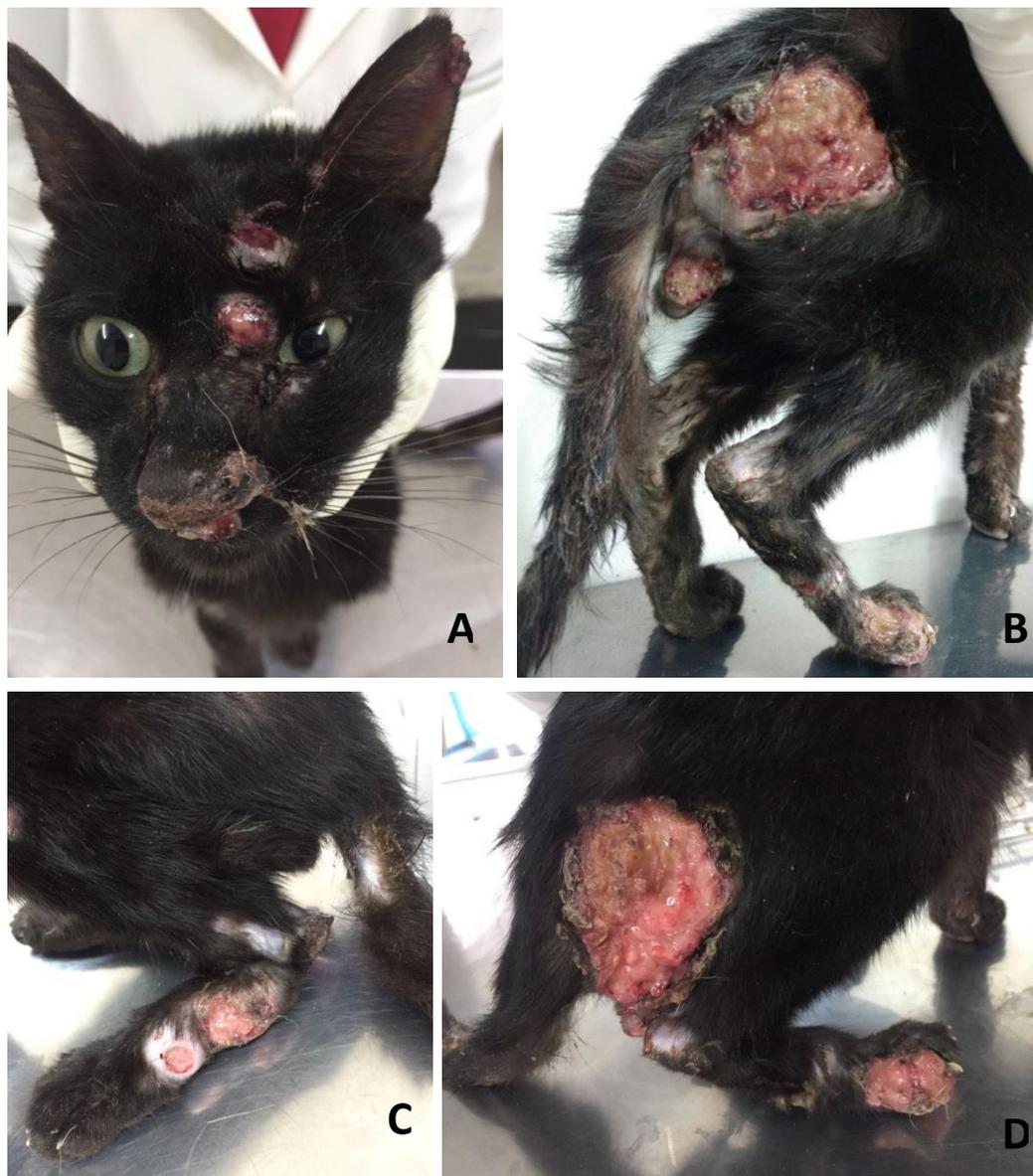


Figura 5.A, 5.B, 5.C e 5.D: (G1) Quadro de esporotricose disseminada em felino doméstico.

A manutenção do fungo nos felinos caracteriza-se como um grave problema, seja para o paciente, para o tutor ou outros contactantes, já que a esporotricose emergiu como uma importante doença fúngica, causadora de múltiplos surtos no Brasil, onde a enfermidade é considerada endêmica em algumas áreas como no Rio Grande do Sul (MADRID et al., 2012), o que reveste-se de importância, já que a micose apresenta uma transmissão zoonótica substancial (CHAKRABARTI et al., 2015). A proximidade entre o homem e os felinos domésticos, sejam estes domiciliados, semi- domiciliados ou errantes, é tida como a principal fonte de transmissão da doença fúngica (ALVES et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013; OROFINO-COSTA et al., 2017). A descrição de casos de infecção acidental são cada vez mais frequentes, como no relato de esporotricose humana na região labial, em que o paciente contraiu a doença após beijar um felino infectado (CHAKRABARTI et al., 2015), o que demonstra os riscos da relação de proximidade entre os felinos

domésticos e os seus respectivos tutores, fortalecendo a importância do estudo e controle da enfermidade.

Considerando-se que o estudo foi realizado uma região endêmica para esporotricose, associada à falta de estudos relacionados à tratamentos efetivos ou alternativos disponíveis, e a importância do papel dos felinos na epidemiologia da esporotricose, é eminente a necessidade do desenvolvimento de protocolos terapêuticos efetivos, tal qual a educação e conscientização populacional a respeito da doença e sobre a importância da busca do diagnóstico precoce e definitivo em prol da prevenção e controle da doença.

CONCLUSÃO

Os felinos portadores de esporotricose, apresentavam lesões disseminadas mesmo após tratamento com antifúngicos, o que pode estar associado a erros nos protocolos terapêuticos instituídos, assim como a falhas na administração dos fármacos. Entretanto, em felinos com uso de fármaco padrão e internação hospitalar, não ocorreu a resolução da micose, evidenciando as dificuldade na terapêutica da esporotricose felina e a necessidade de protocolos terapêuticos individualizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

BAZZI, T.; MELO, S.M.P. de; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D. Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.4, p.303-311, 2016.

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

CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte de literatura e considerações sobre diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.8-28, 2013.

LARSSON, Carlos Eduardo. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, n.3, p.250-259, 2011.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3198-3206, 2007.

MEINERZ, A.R.M.; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.D. Esporotricose felina: relato de casos. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, p.575–577, 2007.

MEINERZ, A.R.M.; ANTUNES, T.A.; SOUZA, L.L.; NASCENTE, P.S.; DE FARIA, R.O.; CLEFF, M.B.; GOMES, F.R.; NOBRE, M.O.; REISCHAK, D.; SCHUCH, L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. Frequência do vírus da Leucemia Felina (VLFe) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.90 - 93, 2010.

MIRANDA, L.H.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; QUINTELLA, L.P.; KURAIEM, B.P.; PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M. Feline sporotrichosis: profile of cutaneous lesions

and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.36, p.425-432, 2013.

MIRANDA, L.H.; SANTIAGO, M.A.; SCHUBACH, T.M.; MORGADO, F.N.; PEREIRA, S.A.; OLIVEIRA, R.V.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8 low cells and a decrease in CD4+ cells. **Medical Mycology**, v.54, n.1, p.29–39, 2016.

MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A.M.; GALVÃO DIAS, M.A.; DA SILVA, E.A.; BERNARDI, F.; CAMARGO, Z.P. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v.10, n.1, p.269, 2014.

OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P.M.; RODRIGUES, A.M.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v.92, n.5, p.606-620, 2017.

PEREIRA, S.A.; GREMIÃO, I.D.; KITADA, A.A.; BOECHAT, J.S.; VIANA, P.G.; SCHUBACH, T.M. 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.

REIS, E.G.; GREMIÃO, I.D.; KITADA, A.A.; ROCHA, R.F.; CASTRO, V.S.; BARROS, M.B.; MENEZES, R.C.; PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.14, n.6, p.399-404, 2012.

REIS, E.G.; SCHUBACH, T.M.P.; PEREIRA, S.A.; SILVA, J.N.; CARVALHO, B.W.; QUINTANA, M.S.B.; GREMIÃO, I.D.F. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. **Medical Mycology**, v.54, n.7, p.684–690, 2016.

RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z.P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes & Infections**, v.3, n.5, e32, 2014.

RODRIGUES, A.M.; DE MELO, T.M.; DE HOOG, G.S.; SCHUBACH, T.M.; PEREIRA, S.A.; FERNANDES, G.F.; BEZERRA, L.M.; FELIPE, M.S.; DE CAMARGO, Z.P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.6, e2281, 2013.

ROSSI, C.N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C.E. Retrospective assessment of the treatment of sporotrichosis in cats and dogs using itraconazole. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.01-05, 2013.

SANCHOTENE, K.O.; MADRID, I.M.; KLAFKE, G.B.; BERGAMASHI, M.; DELLA TERRA, P.P.; RODRIGUES, A.M. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v.58, p.652–658, 2015.

STOPIGLIA, C.M.; MAGAGNIN, M.R.; CASTRILLÓN, S.D.; MENDES, D.; HEIDRICH, P.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M.L. Antifungal Susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v.52, p.56-64, 2014

TÉLLEZ, M.D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS, .I. Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v.160, p.2352-2365, 2014.

4.3 Artigo 3

Investigação in vitro da atividade de compostos essenciais presentes em extratos vegetais sobre isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis*

Ceres Nakasu; Stefanie Bressan Waller; Anna Luiza Silva; Renata Osório de Faria;
João Roberto Braga de Mello; Marlete Brum Cleff

Submetido à revista Ciência Rural

**Investigação *in vitro* da atividade de compostos essenciais presentes em extratos vegetais
sobre isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis***

***In vitro* investigation of the activity of essential compounds present in plant extracts on
clinical isolates of *Sporothrix brasiliensis***

Ceres Nakasu^{1*} Stefanie Bressan Waller¹ Anna Luiza Silva¹ Renata Osório
de Faria² João Roberto Braga de Mello³ Marlete Brum Cleff⁴

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil. * Autor para correspondência: : ceresnaku@hotmail.com

¹ Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil

¹ ⁴ Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

¹ Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil

RESUMO

1 Esporotricose é uma micose subcutânea, que atinge animais e o homem, sendo causada por
2 fungos do complexo *Sporothrix schenckii*. O fármaco de eleição para o tratamento da
3 esporotricose em felinos é o itraconazol, utilizado como monoterapia ou associado aos
4 iodetos. Entretanto a resistência de fungos do complexo *Sporothrix schenckii* vem sendo
5 reportada, em contrapartida extratos derivados da família Lamiaceae demonstram atividade
6 anti-*sporothrix* satisfatória. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade *in vitro* de
7 compostos fenólicos, terpênicos e flavonóide em isolados clínicos do complexo *S. schenckii*.
8 Os compostos ácido cafêico, quercetina, ácido p-cumárico, eucaliptol e gama-terpineno,

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil. * Autor para correspondência: : ceresnaku@hotmail.com

² Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, RS, Brazil

³ ⁴ Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil

1 foram adquiridos de indústria (Sigma), sendo preparados e testados conforme o documento
2 M38-A2 (CLSI, 2008). Os produtos foram testados sobre 15 isolados de *S. brasiliensis*
3 provenientes de felinos; um *S. brasiliensis* isolado de canino e 2 cepas-padrão (*S. brasiliensis*
4 e *Sporothrix sp.*), totalizando $n= 18$ amostras. O ácido caféico demonstrou 100% de respostas
5 frente aos isolados testados, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 0,3125 a
6 0,605 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e concentração fungicida mínima (CFM) variando de 0,3025 a 1,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$,
7 sendo o composto mais efetivo quando comparados aos demais. Seguido do ácido-caféico, o
8 gama-terpineno também demonstrou atividade antifúngica com CIM e CFM variando de
9 0,7575 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a $>5\mu\text{g mL}^{-1}$, tendo apenas 1 cepa de *S. brasiliensis* de isolado felino e 1 cepa
10 de *S. schenckii* de isolado padrão sem resposta em CIM e CFM, e 1 cepa de *S. brasiliensis*
11 que não apresentou CFM. Já o p-cumárico apresentou CIM de 0,3788 a $>5 \text{ mL}^{-1}$ e CFM de
12 2,5 a $>5 \text{ mL}^{-1}$, demonstrando baixa ou nenhuma atividade antifúngica nas concentrações
13 testadas. O eucaliptol apresentou CIM variando de 0,7575 a $>10 \mu\text{g mL}^{-1}$ e CFM $>10\mu\text{g mL}^{-1}$,
14 sendo o composto com menor ou nenhuma atividade antifúngica entre os compostos testados,
15 considerando ainda que não foi possível interpretação de resposta para o composto quercetina
16 no método utilizado. A CIM de itraconazol nos isolados testados variou de 0,5 a $>16\mu\text{g/mL}$.
17 Os resultados sugerem atividade promissora dos compostos ácido caféico e gama-terpineno,
18 que apresentaram-se efetivos na inibição e destruição de isolados de *Sporothrix sp.*,
19 destacando principalmente os resistentes ao itraconazol.

20

21 **Palavras-chave:** antifúngicos, resistência, esporotricose, fenólicos, terpenos.

22

23 ABSTRACT

24 Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis, which strikes animals and man, being
25 caused by fungi of the complex *Sporothrix schenckii*. The drug of choice for the treatment of

1 sporotrichosis in felines is itraconazole, used as monotherapy or associated with iodides.
2 However, the fungal resistance of the *Sporothrix schenckii* complex has been reported,
3 whereas extracts derived from the Lamiaceae family demonstrate satisfactory anti-sporothrix
4 activity. Thus, the objective of the study was to evaluate the in vitro activity of phenolic,
5 terpene and flavonoid compounds in clinical isolates of the *S. schenckii* complex. The
6 compounds caffeic acid, quercetin, p-coumaric acid, eucalyptol and gamma-terpinene were
7 purchased from industry (Sigma), being prepared and tested according to document M38-A2
8 (CLSI, 2008). The products were tested on 15 isolates of *S. brasiliensis* from felines; a *S.*
9 *brasiliensis* isolated from canine and 2 standard strains (*S. brasiliensis* and *Sporothrix sp.*),
10 totalizing n = 18 samples. Caution was observed in the presence of a minimal inhibitory
11 concentration (MIC) ranging from 0.3125 to 0.605 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and minimal fungicidal
12 concentration (CFM) ranging from 0.3025 to 1.25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, being the compound more
13 effective when compared to the others. Following the acid-caffeic acid, gamma-terpinene also
14 demonstrated antifungal activity with MIC and CFM ranging from 0.7575 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to > 5 μg
15 mL^{-1} , having only 1 strain of feline isolate *S. brasiliensis* and 1 strain of *S. schenckii* isolates
16 with no response in CIM and CFM, and 1 strain of *S. brasiliensis* that did not present CFM.
17 The p-coumaric group had a MIC of 0.3788 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and CFM of 2.5 to > 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$,
18 demonstrating low or no antifungal activity at the concentrations tested. Eucalyptol had a
19 MIC ranging from 0.7575 to > 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and CFM > 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and the compound had
20 little or no antifungal activity among the tested compounds, considering that it was not
21 possible to interpret the response for quercetin in the method used. The MIC of itraconazole
22 in the tested isolates ranged from 0.5 to > 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results suggest promising activity of
23 the compounds caffeic acid and gamma-terpinene, which were effective in inhibiting and
24 destroying *Sporothrix sp.* Isolates, especially those resistant to itraconazole.

25

26 **Keywords:** antifungals, resistance, sporotrichosis, phenolics, terpenes.

1 INTRODUÇÃO

2 A esporotricose é uma micose subcutânea, de carácter zoonótico, apresentando-se
3 como endêmica em algumas regiões do Brasil (MADRID et al., 2010; RODRIGUES et al.,
4 2014; SANCHOTENE et al., 2015; WALLER et al., 2016), sendo transmitida pela
5 inoculação dos conídios na pele por traumas com material vegetal, ou mordidas e
6 arranhaduras de animais doentes, principalmente felinos (MADRID et al., 2012;
7 SANCHOTENE et al.,2015; GREMIÃO et al., 2017), constituindo uma zoonose de
8 importância em saúde pública. No Brasil há uma prevalência de *S. brasiliensis* isolados de
9 lesões de felinos, a qual é descrita como a mais patogênica entre as espécies do complexo
10 *Sporothrix* (MIRANDA et al., 2013; MONTENEGRO et al., 2014; WALLER et al., 2016;
11 DELLA TERRA et al., 2017). De forma geral, diversos autores concordam que há
12 necessidade de maiores estudos em relação às cepas encontradas e a resposta do organismo
13 dos felinos em relação a micose, assim como sensibilidade dos isolados.

14 Dentre as opções terapêuticas, o antifúngico itraconazol é considerado de primeira
15 escolha para a terapia da esporotricose felina. Entretanto, recentemente, a emergência da
16 resistência antifúngica tem sido descrita, o que preocupa em função das dificuldades já
17 observadas na terapia da esporotricose nos felinos domésticos (RODRIGUES et al., 2014a;
18 BORBA-SANTOS et al., 2015; WALLER et al., 2016) e estimula a busca por novas
19 moléculas com propriedades antifúngicas.

20 Desta forma inúmeras pesquisas tem sido desenvolvidas na busca por opções
21 terapêuticas, investindo em produtos de origem vegetal com atividade anti-*sporothrix*
22 (CLEFF et al., 2008; WALLER et al., 2016). Á partir de resultados importantes,
23 demonstrando a atividade antifúngica de espécies da família Lamiaceae, em isolados clínicos
24 de esporotricose humana e animal (WALLER et al., 2016), existe a probabilidade destes
25 extratos serem fontes importantes de novas moléculas antifúngicas. Dentre as substâncias

1 reconhecidas estão o 1,8-cineol, 4-terpineol, timol, carvacrol, gama-terpineno, p-cimeno,
2 sabineno, entre outras presentes nos óleos essenciais, enquanto que nos extratos
3 hidroalcoolicos e etanólicos tem se destacado a quercetina, ácido cafêico, p-cumárico, e
4 gama-terpineno.

5 Entretanto, pouco se conhece sobre a eficácia desses produtos em isolados clínicos,
6 especialmente em *Sporothrix brasiliensis* provenientes de lesões de felinos. Desta forma, o
7 estudo objetivou avaliar a atividade *in vitro* de compostos fenólicos, terpênicos e flavonoide
8 sobre *Sporothrix brasiliensis* isolados de felinos com esporotricose.

9

10 **MATERIAIS E MÉTODOS**

11 **Isolados Fúngicos**

12 Foram utilizados para o experimento 15 cepas isoladas de felinos domésticos, 1 cepa
13 isolada de um canino e 1 cepa-padrão (IPEC 16969) de esporotricose humana de *S.*
14 *brasiliensis*, além de 1 cepa-padrão de *S.schenckii*, totalizando $n= 18$ amostras provenientes
15 da micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (Universidade
16 Federal de Pelotas, Brazil). Os isolados fúngicos foram também foram avaliados quanto a
17 sensibilidade ao antifúngico padrão itraconazol.

18 A identificação fúngica foi realizada por análises macromorfológicas e
19 micromorfológicas das colônias, com comprovação do dimorfismo fúngico. Para a
20 identificação molecular, os isolados foram analisados pelo Laboratório de Micologia Médica
21 Molecular (Universidade Federal de São Paulo, Brasil) pela técnica de polymerase chain
22 reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), e foram compatíveis com
23 o padrão de restrição de *Sporothrix brasiliensis* (Rodrigues *et al.*, 2013).

24

25

1 **Avaliação da susceptibilidade antifúngica**

2 Para os testes, o itraconazol e os compostos comerciais foram preparados
3 individualmente, conforme as diretrizes do documento M38-A2 do Clinical and Laboratory
4 Standards Institute (CLSI, 2008). Os produtos foram dissolvidos em dimetil-sulfóxido, e
5 diluídos em RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium, Sigma, Steinheim,
6 Germany) contendo MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid] e suplementado com
7 glicose a um pH de 7.0.

8 Os inóculos fúngicos foram preparados à partir de subculturas de isolados do
9 complexo *S. schenckii*, com prevalência de *S. brasiliensis* em ágar batata dextrose (Acumedia,
10 Lansing, Michigan, United States) mantidos a 27°C por sete dias até a formação de conídios e
11 ajustado por espectometria (Spectrum Instruments Co., Shanghai, China) em uma densidade
12 ótica de 80-82% e 530 nm de transmitância. Após, os inóculos fúngicos foram diluídos em
13 meio RPMI-1640 até uma concentração final de 10^4 CFU/mL a qual foi utilizada num volume
14 de 100 µL para o teste de susceptibilidade. Também foram estabelecidos controle positivo (100
15 µL da suspensão fúngica e 100 µL de RPMI-1640) e negativo (200 µL RPMI-1640), assim
16 como utilizou-se o itraconazol (16 a 0.03 µg mL⁻¹) com o objetivo de avaliar a sensibilidade
17 dos isolados. Os resultados foram expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM) por
18 leituras visuais do crescimento das colônias ou turvação do meio, comparados ao controle
19 positivo, após um período de 72 horas em estufa a 27°C. Para determinação da Concentração
20 Fungicida Mínima (CFM), 10µL das suspensões das microplacas foram semeadas e incubadas
21 em meio de cultura até o crescimento das colônias.

22 Os compostos fenólicos, terpênicos e flavonóide foram adquiridos de distribuídos
23 comercial (Sigma-Aldrich) e avaliados em triplicata nas concentrações de 10 mg/mL a
24 0,09mg/mL e de 20mg/mL a 0,19 mg/mL para eucaliptol.

25

1 **Análise Estatística**

2 Análise de variância e a comparação de meios geométricos foram realizadas utilizando
3 o teste de Kruskal Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn para ensaios
4 antifúngicos e o teste de diferenças menos significativas de Fisher para análises citotóxicas,
5 foram analisadas utilizando o software estatístico BioEstat (versão 5.30 e P – valores de 0,05
6 e 0,01, respectivamente, foram considerados significativos.

7

8 **RESULTADOS**

9 Os compostos ácido p-cumárico, γ -terpineno e ácido caféico apresentaram atividades
10 fungistáticas e fungicidas sobre os isolados clínicos de *S. brasiliensis*. De acordo com a tabela
11 1, observa-se uma atividade antifúngica variável entre os compostos químicos estudados. De
12 acordo com a análise estatística, observou-se que o Ácido caféico obteve melhor resultado de
13 CIM e CFM em relação aos compostos p-cumárico, quercetina e eucaliptol, não havendo
14 diferença estatística em relação ao composto gama-terpineno, embora o ácido caféico se
15 destaque devido a apresentar atividades fungistáticas e fungicidas em 100% dos isolados
16 testados (18 isolados), incluindo 9 isolados felinos de *S. brasiliensis* que apresentaram CIM
17 entre 8 e $>16\mu\text{g mL}^{-1}$ no teste com itraconazol. O gama-terpineno também apresenta atividade
18 promissora visto que apresentou-se efetivo em 8 isolados resistentes ao itraconazol e de
19 acordo com a análise estatística, apresentou melhor atividade de CIM e CFM do que os
20 compostos quercetina e eucaliptol.

21 Para o composto gama-terpineno valores de atividade antifúngica variaram de 0,7575
22 a $5\mu\text{g mL}^{-1}$ (CIM) e de 3,03 a $5\mu\text{g mL}^{-1}$ (CFM), onde apenas 1 cepa de *S. brasiliensis* de
23 isolado felino e 1 cepa de *S. schenckii* de isolado não apresentaram resposta às concentrações
24 testadas para CIM, e 1 cepa de *S. brasiliensis* que não apresentou CFM.

25 Já os compostos ácido p-cumárico (CIM 0,378 a >5 e CFM 0 a $>5\mu\text{g mL}^{-1}$) e
26 eucaliptol (CIM e CFM $>10\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentaram mínima ou nenhuma atividade

1 antifúngica, sendo que o ácido p-cumárico em um dos experimentos apresentou CIM de 0,378
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apenas para um isolado felino de *S. brasiliensis*, e não apresentou CIM contra 5
3 isolados felinos e um padrão de *S. brasiliensis*, e um padrão de *S. schenckii*, e ainda neste
4 mesmo experimento não houve resposta de CFM para nenhum isolado. Já num segundo
5 experimento, apresentou CIM e CFM que variaram de 2,5 a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. De acordo com a
6 análise estatística, não houve diferença significativa entre os compostos supracitados em
7 relação à CIM, já em relação à CFM, o composto p-cumárico demonstrou melhor atividade
8 em relação ao composto eucaliptol. O composto flavonóide quercetina não foi considerado,
9 visto que a leitura de CIM no método utilizado foi prejudicado pela coloração do composto
10 impossibilitando interpretação.

11 Os resultados da atividade dos compostos avaliados quanto a atividade anti-*Sporothrix*
12 *brasiliensis* estão apresentados na tabela 2.

13 Considerando que o antifúngico de primeira escolha para tratamento de felinos com
14 esporotricose é o itraconazol, cabe salientar que 50% dos isolados testados foram sensíveis ao
15 antifúngico padrão (7 isolados felinos e 1 isolado padrão de *Sporothrix brasiliensis* e mais 1
16 isolado padrão de *S. schenckii*), apresentando CIM que variou de 0,5 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e 50%
17 apresentaram resistência (8 isolados felinos e 1 isolado de canino de *S. brasiliensis*) com CIM
18 acima de 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O ponto de corte para os padrões aplicados ao itraconazol foi estabelecido
19 de acordo com o documento M38-A2 (NCCLS, 2008), onde são considerados sensíveis os
20 isolados fúngicos onde a concentração inibitória mínima (CIM) tem valores inferiores ou
21 iguais a 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, os isolados de felinos que apresentaram valores de CIM
22 variando de 8 a > 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, foram considerados resistentes ao itraconazol (Tabela 3).

23

24 **DISCUSSÃO**

25 O tratamento convencional na esporotricose humana e animal é realizado com o
26 itraconazol, considerado o fármaco de eleição (GREMIÃO et al., 2017). Itraconazol apresenta

1 atividade antifúngica através da inibição da 14- α -lanosterol desmetilase (KELLY et al., 1995),
2 enzima pertencente ao citocromo P450, importante para a biossíntese de ergosterol, o qual é
3 essencial para integridade e manutenção da célula. A inibição do ergosterol na célula fúngica
4 leva a alterações morfológicas, aumento da permeabilidade e em divisão celular defeituosa,
5 ocasionando a perda de sua viabilidade celular da célula fúngica (BORGERS & VAN DE
6 VEN, 1989).

7 Embora não exista um valor de referência padrão para considerar resistência de
8 isolados fúngicos do complexo *Sporothrix schenckii* aos antifúngicos comerciais, as diretrizes
9 do protocolo M38-A2 do CLSI (CLSI, 2008) recomendam que os isolados fúngicos com
10 valores de CIM iguais ou acima de 4 μ g mL⁻¹ para o itraconazol, sejam considerados
11 resistentes para esse antifúngico. A resistência antifúngica de fungos do complexo *Sporothrix*
12 *schenckii* já foi demonstrada em isolados humanos e animais provenientes do Brasil
13 (RODRIGUES et al., 2014b; WALLER et al., 2016), assim como observado em nosso estudo,
14 onde 8 isolados de felinos e 1 de canino da cepa de *S. brasiliensis* foram resistentes ao
15 itraconazol. Por sua vez, os isolados de *Sporothrix* spp. resistentes ao itraconazol
16 apresentaram sensibilidade *in vitro* aos compostos químicos estudados, embora o mecanismo
17 de ação desses produtos ainda seja desconhecido sobre fungos do complexo *Sporothrix*
18 *schenckii*.

19 Dos compostos testados, o ácido caféico destacou-se por sua atividade antifúngica
20 contra 100% dos isolados fúngico testados. A atividade antifúngica do ácido caféico e seus
21 derivados é documentada na literatura (SINGH et al., 2016), sendo o mecanismo de ação
22 sugerido por provocarem alterações morfológicas com perdas de potássio na membrana
23 celular dos patógenos, levando-os à morte (Andrade et al., 2015). O ácido caféico é
24 abundante em extratos de *Origanum majorana* e *Origanum vulgare* (WALLER et al., 2016),
25 os quais ambas plantas tem com comprovada atividade antifúngica contra cepas de *S.*

1 *brasiliensis* (WALLER et al., 2016), como em concordância com os resultados encontrados
2 neste estudo. Estudos de citotoxicidade devem ser conduzidos, utilizando este composto, para
3 avaliar o uso seguro em células animais, especialmente considerando que os resultados foram
4 positivos mesmo contra cepas resistentes ao itraconazol.

5 Assim como demonstrado em nosso estudo, o composto γ -terpineno também tem sido
6 destacado por ser ativo contra *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, o qual provocou alterações
7 morfológicas nas hifas e redução no número de conídios em isolados fúngicos quando
8 tratados com óleo essencial de *Origanum vulgare*, rico nesse composto (COUTO et al., 2015).

9 Em relação ao 1,8-cineol (eucaliptol), esse composto foi descrito como um dos
10 compostos majoritários no óleo essencial de alecrim e manjerona (WALLER et al., 2016) e 5
11 isolados testados foram sensíveis a esse composto. Embora a atividade anti-*Sporothrix* spp.
12 desse composto tenha sido menor em comparação aos demais, 1,8-cineol já foi descrito com
13 atividade contra outros patógenos fúngico, como *Aspergillus* spp. (MOREIRA et al., 2010).
14 Seu mecanismo de ação parece ser relacionado à alteração morfológica, com diminuição na
15 formação de conídios e degradação na sua membrana plasmática e, conseqüentemente, sua
16 morte (MOREIRA et al., 2010). O ácido p-cumárico, por sua vez, também já foi relatado com
17 atividade contra *Fusarium ananatum* (BARRAL et al., 2017), *Aspergillus niger* e *Penicillium*
18 *chrysogenum* (SENGER et al., 2013) e sua atividade antifúngica contra fungos
19 fitopatogênicos foi atribuída diretamente à mitocôndria fúngica (MORALES et al., 2017), e
20 deve ser investigada quanto ao complexo *Sporothrix schenckii*. Por fim, a quercetina foi o
21 composto testado sem atividade anti-*Sporothrix* spp. nas concentrações testadas.

22 Pesquisas, investigando novos produtos e moléculas para o tratamento da
23 esporotricose são essenciais, pois muitos autores tem alertado para isolados de *S. brasiliensis*
24 resistentes *in vitro* ao itraconazol (PEREIRA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014a;
25 WALLER et al., 2015), preocupando os profissionais médicos e veterinários.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

CONCLUSÃO

De acordo com o estudo os compostos ácido caféico e gama-terpineno demonstram potencial antifúngico em isolados de *S. brasiliensis*, incluindo em isolados que apresentaram resistência ao itraconazol. Sendo que, acredita-se no potencial dessas moléculas no tratamento da esporotricose e estudos adicionais devem ser realizados para elucidar o mecanismo de ação e toxicidade.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M.; et al. Fine-tuning of the hydrophobicity of caffeic acid: studies on the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **RSC Advances**, v.5, p.53915–53925, 2015.

ASHBURN, T.T.; THOR; K.B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. **Nat. Rev. Drug Design**, v.3, p.673-683, 2004.

BORBA-SANTOS, L.P.; et al. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Med. Mycol.**, v.53, p.178–188, 2015.

BORGERS, M.; VAN DE VEN, M.A. Mode of action of itraconazole: morphological aspects. **Mycoses**, v.32, n.1, p.53–9, 1989.

BORGERS, M.; VAN DE VEN, M.A. Mode of action of itraconazole: morphological aspects. **Mycoses**, v.32, Suppl.1, p.53-9, 1989.

CHAVES, A.R.; et al. Treatment abandonment in feline sporotrichosis and study of 147 cases. **Zoon. Public. Hlth.**, v.60, p.149–153, 2013.

CORSELLO, S.M.; et al. The drug repurposing hub: A next generation drug library and information resource. **Nat. Med.**, v.23, p.405-409, 2017.

- 1 COUTO, C.S.F.; et al. Chemical composition and antifungal properties of essential oil of
2 *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix*
3 *brasiliensis*. **Trop. J. Pharm. Res.**, v.14, p.1207-1212, 2015.
- 4 DE ARAÚJO, M.L.; et al. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical
5 transmission types in Espírito Santo, Brazil. **Mycoses**, v.58, p.485–490, 2015.
- 6 GREMIÃO, I.D.; et al. Zoonotic epidemic os sporotrichosis: cat to human transmission.
7 **PLoS Pathogen.**, v.13, p.1–11, 2017.
- 8 KELLY, S. L.; et al. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the
9 formation of 14a-methylergosta-8,24(28)-dien-3b,6a-diol. **Biochem. Biophys. Res.**
10 **Commun.**, v.197, p.428–432, 1995.
- 11 KELLY, S.L.; et al. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the
12 formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. **Biochem. Biophys. Res.**
13 **Commun.**, v.207, n.3, p.910–5, 1995.
- 14 MADRID, I.M.; et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a
15 description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. **Mycopathol.**, v.173, p.265–273,
16 2012.
- 17 MARIMON, R.; et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new
18 *Sporothrix* species of clinical interest. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p.3198–3206, 2007.
- 19 MONTENEGRO, H.; et al. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging
20 animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Vet. Res.**, v.10, p.269, 2014.
- 21 MORALES, J.; et al. Alteration of oxidative phosphorylation as a possible mechanism of the
22 antifungal action of p-coumaric acid against *Botrytis cinerea*. [J. Appl. Microbiol.](#), v.123, n.4,
23 p.969-976, 2017.

- 1 MOREIRA, A.C.P.; et al. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens*
2 (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Braz. J. Microbiol.**, v.41, p.28-33,
3 2010.
- 4 NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution**
5 **Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi:** approved standard M38-A of
6 NCCLS. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- 7 PEREIRA, S.A.; et al. 2010. Response to azolic antifungal agents for treating feline
8 sporotrichosis. **Vet. Rec.**, v.166, n.10, p.290–294, 2010.
- 9 RODRIGUES, A.M.; et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in
10 causative agents of sporotrichosis. **BMC Infect. Dis.**, v.14, p.219, 2014a.
- 11 RODRIGUES, A.M.; et al. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-
12 RFLP of calmodulin. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.78, p.383–387, 2014b.
- 13 SANCHOTENE, K.O.; et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of
14 feline sporotrichosis. **Mycoses.**, v.58, p.:652–658, 2015.
- 15 SCHUBACH, T.M.; et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases
16 (1998–2001). **J. Am. Vet.Med. Assoc.**,v.224, p.1623–1629, 2004.
- 17 SENGER, G.; et al. Determinação da atividade antioxidante, antifúngica,antibacteriana e
18 identificação de compostos fenólicos de extratos de diversas variedades de plantas visando
19 sua incorporação na produção de cosméticos: resultados preliminares. **Mostra Nacional de**
20 **Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar – VI MICTI**, Instituto Federal
21 Catarinense – Câmpus Camboriú, 2013.
- 22 SINGH, J.P.; et al. *In vitro* antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium*
23 *cumini*) fruit polyphenols. **LWT - Food Sci. Technol.**, v.65, p.1025–1030, 2016.

- 1 WALLER, S.B. et al . Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn.and *Origanum*
2 *vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii*
3 complex. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.4, p.991-999, 2016b.
- 4 WALLER, S.B.; et al . Anti- *Sporothrix* spp. activity of medicinal plants. **Braz. J. Pharm.**
5 **Sci.**, v.52, n.2, p.221-237, 2016a.
- 6 WALLER, S.B.; Et al. Chemical composition and cytotoxicity of extracts of marjoram and
7 rosemary and their activity against *Sporothrix brasiliensis*. **J Med Microbiol.**, v.66, n.7,
8 p.1076-1083, 2017.
- 9 WALLER, S.B.; et al. *In vitro* susceptibility of the *Sporothrix brasiliensis* to aqueous
10 extracts of the green-tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Acta Vet. Bras.**, v.9, n.4, p.342–347,
11 2015.
- 12 WALLER, S.B; et al. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oils of
13 Lamiaceae family. **Mycopathol.**, v.181, p.857–863, 2016
14 .

Tabela 1. Descrição dos compostos adquiridos comercialmente e avaliados *in vitro* em isolados de *Sporothrix brasiliensis*

Identificação	Origem	Concentração Testada	Classe Química	Fórmula química
Ác. Cafêico	Industrial	10 mg/ml a 0,09 mg/mL	Composto Fenólico	$C_9H_8O_4$
p-cumárico	Industrial	10 mg/mL a 0,09mg/mL	Composto Fenólico	$C_9H_8O_3$
Eucaliptol	Industrial	20mg/mL a 0,19 mg/mL	Monoterpeno	$C_{10}H_{18}O$
Quercetina	Industrial	10 mg/mL a 0,09mg/mL	Flavonóide	$C_{15}H_{10}O_7$
Gama-terpineno	Industrial	10 mg/mL a 0,09mg/mL	Monoterpeno	$C_{10}H_{16}$

Tabela2. Concentração mínima inibitória (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de compostos fenólicos, flavonóide e terpênicos ($\mu\text{g/mL}$) para *Sporothrix brasiliensis*.

Código	Hospedeiro	Ác. Cafeico		γ -terpineno		Ácidop-cumarico		Quercetina		Eucaliptol		Itraconazol	
		MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
S68	Felino (RS)	0,3025	0,605	0,7575	0,7575	0,3788	n.f	n.i.	n.f	0,7575	n.f	1	n.f.
S119	Felino (RS)	0,3025	0,605	0,03	n.f	n.i	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f	1	n.f.
S120	Felino (RS)	0,605	0,605	n.f	n.f	n.i	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f.
Ss126	Humano (SP)	0,3025	0,3025	n.f	n.f	n.i	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f	1	n.f.
S146	Felino (RS)	0,605	0,605	3,03	3,03	n.i	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f.
S141	Felino (RS)	0,3025	0,3025	3,03	3,03	n.i	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f	1	n.f.
S144	Felino (RS)	0,3025	0,3025	3,03	n.f	n.i	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f	1	n.f.
Ss177	Humano (RJ)	0,605	0,605	3,03	3,03	n.i	n.f	n.i.	n.f	n.i.	n.f	1	n.f.
S08	Felino (RS)	0,3125	1,25	2,5	5	5	5	n.i.	n.f	10	n.f	n.i.	-
S72	Felino (RS)	0,3125	1,25	2,5	5	5	5	n.i	n.f	n.i	n.f	n.i.	-
S73	Canino (RS)	0,3125	0,625	2,5	2,5	5	5	n.i.	n.f	10	10	n.i.	-
S76	Felino (RS)	0,3125	0,625	2,5	5	5	n.f	n.i	n.f	n.i	n.f	n.i.	-
S79	Felino (RS)	0,3125	1,25	2,5	2,5	5	n.f	n.i.	n.f	n.i	n.f	n.i.	-
S80	Felino (RS)	0,3125	0,625	2,5	2,5	5	5	n.i	n.f	n.i	n.f	n.i.	-
S99	Felino (RS)	0,3125	0,625	2,5	2,5	5	5	n.i.	n.f	10	10	n.i.	-
S103	Felino (RS)	0,3125	0,625	2,5	2,5	2,5	2,5	n.i	n.f	10	10	0,5	-
S137	Felino (RS)	0,3125	0,3125	2,5	2,5	5	5	n.i.	n.f	n.i	n.f	2	-
S139	Felino (RS)	0,3125	0,625	5	5	5	5	n.i	n.f	10	10	2	-

Escala de concentração testada: 10 mg/mL a 0,09mg/mL(Compostos ácido caféico, gama-terpineno, ácido p-cumarico, quercetina), 20 mg/mL a 0,19 mg/mL (eucaliptol), itraconazol (16 a 0,03 $\mu\text{g/ml}$) ; n.i.:nenhuma atividade inibitória nas concentrações testadas; n.f.: nenhuma atividade fungicida nas concentrações testadas.

Tabela 3. Susceptibilidade de isolados do complexo *Sporothrix schenckii* ao itraconazol ($\mu\text{g/mL}$)

Complexo <i>Sporothrix schenckii</i> (n)	Hospedeiro	Itraconazol (n) ^a		
		Sensível	Resistente	Total
<i>S. brasiliensis</i> (8) ^b	Felino (RS/Brazil)	7	8	15
<i>S. brasiliensis</i> (1) ^c	Canino	-	1	1
<i>S. brasiliensis</i> (1) ^c	Humano (RJ/Brazil)	1	-	1
<i>S. schenckii</i> (1) ^c	Humano (SP/Brazil)	1	-	1
Geral(8)	-	9	9	18

^a Sensível (CIM $\leq 4 \mu\text{g/mL}$) e resistente (MIC $> 4 \mu\text{g/mL}$) de acordo com o valor sugerido em M38-A2 (NCCLS, 2008).

^b Isolados clínicos de esporotricose felina, provenientes da micoteca da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, RS, Brazil;

^c Cepa-padrão de esporotricose humana, proveniente da micoteca da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP, SP, Brazil) – *Sporothrix brasiliensis* (Ss177, outros códigos: FMR 8314, *Facultat de Medicina i Ciències de la Salut*, Reus, Spain; IPEC 16919, *Instituto de Pesquisa Evandro Chagas/FIOCRUZ*, RJ, Brazil); *Sporothrix schenckii* (Ss 126).

5 Considerações Finais

Apesar da região de Pelotas ser considerada endêmica para esporotricose, os dados epidemiológicos da doença ainda não são totalmente conhecidos, e as escolhas terapêuticas para o tratamento dos felinos variam muito entre os profissionais da área, o que pode estar contribuindo para a resistência fúngica e perpetuação da doença na região.

Os felinos portadores da micose, podem apresentar quadros disseminados mesmo após tratamento com antifúngicos. Com isto, observa-se a necessidade de maiores estudos a respeito do comportamento da doença, bem como, analisar a efetividade dos protocolos utilizados para os felinos com a enfermidade.

Felinos com esporotricose podem apresentaram-se co-infectados por retrovíruses, com destaque para FeLV, que foi a retrovíruses mais ocorrente.

Os isolados fúngicos do complexo *S. schenckii*, com destaque para o *Sporothrix brasiliensis* foram sensíveis a maioria dos compostos químicos comerciais testados.

O ácido cafeico apresentou atividade fungicida e fungistática em todos isolados testados. Gama terpineno também se destacou, por apresentaram atividade fungicida e fungistática para a maior parte de *S. brasiliensis*, incluindo isolados resistentes ao itraconazol. Os composto eucaliptol foi o composto com menor ou nenhuma atividade nos isolados nas concentrações testadas.

Referências

ANDRADE, M.; et al. Fine-tuning of the hydrophobicity of caffeic acid: studies on the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **RSC Advances**, v.5, p.53915–53925, 2015.

ASHBURN, T. T.; THOR; K. B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.3, p.673-683, 2004.

BAZZI, T.; MELO, S.M.P. de; FIGHERA, R.A.; KOMMERS, G.D. Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.4, p.303-311, 2016.

BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; DE CAMARGO, Z. P.; NUCCI, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.; ROZENTAL, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Medical Mycology**, v.53, p.178–188, 2015.

BORGERS, M.; VAN DE VEN, M.A. Mode of action of itraconazole: morphological aspects. **Mycoses**, v.32, n.1, p.53–9, 1989.

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

CHAVES, A. R.; CAMPOS, M. P.; BARROS, M. B.; DO CARMO, C. N.; GREMIÃO, I. D.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. Treatment abandonment in feline sporotrichosis and study of 147 cases. **Zoos and public health**, v.60, p.149–153, 2013.

CORSELLO, S. M.; BITTKER, J. A.; LIU, Z.; GOULD, J.; MCCARREN, P.; HIRSCHMANN, J. E.; JOHNSTON, S. E.; VRCIC, A.; WONG, B.; KHAN, M.; ASIEDU, J.; NARAYAN, R.; MADER, C. C.; SUBRAMANIAN, A.; GOLUB, T. R. The drug repurposing hub: A next generation drug library and information resource. **Nature Medicine**, v.23, p.405-409, 2017

COUTO, C.S.F.; RAPOSO, N. R. B; ROZENTAL, S.; BORBA-SANTOS, L. P.; BEZERRA, L. M. L.; ALMEIDA, P. A.; BRANDÃO, M. A. F. 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, p.1207-1212, 2015.

CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte de literatura e considerações sobre diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.8-28, 2013.

DE ARAÚJO, M.L.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; DE CAMARGO, Z.P.; DE HOOG, G. S. Human. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. **Mycoses**, v.58, p.485–490, 2015.

FERNANDES, G. F.; DOS SANTOS, P. O.; RODRIGUES, A. M.; SASAKI, A. A.; BURGER, E.; DE CAMARGO, Z. P. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu strict* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v.4, n.3, p.241-249, 2013.

FRANCESCHI, N. T.; SPANAMBERG, A.; DHEIN, J. O.; SCAPINI BAZOTTI, M.; RAVAZZOLO, A. P.; TOMAZI DA SILVA, I.; AMORIM DA COSTA, F. V.; FERREIRO, L. Esporotricose óssea em gato causada por *Sporothrix brasiliensis*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.45, n.1, p.1-5, 2017.

GREMIÃO, I. D.; MONTEIRO MIRANDA, L. H.; REIS, E. G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic epidemic os sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS Pathogens**, v.13, p.1–11, 2017.

HAGIWARA, M. K.; JUNQUEIRA-JORGE, J.; STRICAGNOLO, C. Infecção pelo Vírus da Leucemia Felina em gatos de diversas cidades do Brasil. **Clínica Veterinária**, n.66, p.44-47, 2007.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; CORRAN, A. J.; BALDWIN, B. C.; KELLY, D. E Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 α -methylergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.207, n.3, p.910–5, 1995.

KIM, W. S.; CHONG, C. K.; KIM, H. Y.; Lee, G. C.; Jeong, W.; An, D. J.; Jeoung, H. Y.; Lee, J.I.; Lee, Y. K. Development and clinical evaluation of a rapid diagnostic kit for feline leukemia virus infection. **Journal of Veterinary Science**, v.15, n.1, p.91-97, 2014.

LARSSON, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.48, n.3, p.250-259, 2011.

LEITE, R. C.; REIS, J. K. P.; OLIVEIRA, A. P.; Et al. Retrovíroses dos animais domésticos. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.73–93, 2013.

LLORET, A.; HARTMANN, K.; PENNISI, M. G.; et al. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.15, n.7, p.619-623, 2013.

MADRID, I. M.; et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. **Mycopathology**, v.173, p.265–273, 2012.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3198-3206, 2007.

MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F. D. Esporotricose felina: relato de casos. **Ciência Animal Brasileira**, v.8,p.575–577, 2007.

MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; SOUZA, L. L.; et al. Frequência do vírus da Leucemia Felina (VLFe) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.90 - 93, 2010a.

MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; SOUZA, L. L.; NASCENTE, P. S.; DE FARIA, R. O.; CLEFF, M. B.; GOMES, F. R.; NOBRE, M. O.; REISCHAK, D.; SCHUCH, L. F. D.; MEIRELES, M. C. A. Frequência do vírus da Leucemia Felina (VLFe) em felinos domésticos (*Felis catus*) semidomiciliados nos municípios de Pelotas e Rio Grande. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.90 - 93, 2010b.

MIRANDA, L. H.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; QUINTELLA, L. P.; KURAIEM, B. P.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. Feline sporotrichosis: profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v.36, p.425-432, 2013.

MIRANDA, L. H.; SANTIAGO, M. A.; SCHUBACH, T. M.; MORGADO, F. N.; PEREIRA, S. A.; OLIVEIRA, R. V.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8 low cells and a decrease in CD4+ cells. **Medical Mycology**, v.54, n.1, p.29–39, 2016.

MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A. M.; GALVÃO DIAS, M. A.; DA SILVA, E.A.; BERNARDI, F.; CAMARGO, Z.P. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v.10, n.1, p.269, 2014.

MORALES, J.; et al. Alteration of oxidative phosphorylation as a possible mechanism of the antifungal action of p-coumaric acid against *Botrytis cinerea*. **Journal Appl . Microbiology**, v.123, n.4, p.969-976, 2017.

MOREIRA, A. C. P.; et al. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal Microbiology**, v.41, p.28-33, 2010.

NCCLS - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi**: approved standard M38-A of NCCLS. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

OROFINO-COSTA, R.; MACEDO, P. M.; RODRIGUES, A. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v.92, n.5, p.606-620, 2017.

PAULA, E. M. N.; CRUZ, C. A.; MORAES, F. C.; et al. Características epidemiológicas da Leucemia Viral Felina. **PUBVET**, v.8, n.16, p. 1940-2029, 2014.

PEREIRA, S. A.; et al. 2010. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v.166, n.10, p.290–294, 2010.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D.; KITADA, A. A.; BOECHAT, J. S.; VIANA, P. G.; SCHUBACH, T.M. 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.

REIS, E. G.; GREMIÃO, I. D.; KITADA, A. A.; ROCHA, R. F.; CASTRO, V. S.; BARROS, M. B.; MENEZES, R. C.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.14, n.6, p.399-404, 2012.

REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S.A.; SILVA, J.N.; CARVALHO, B.W.; QUINTANA, M.S.B.; GREMIÃO, I.D.F. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. **Medical Mycology**, v.54, n.7, p.684–690, 2016.

RODRIGUES, A.M.; DE MELO, T.M.; DE HOOG, G.S.; SCHUBACH, T.M.; PEREIRA, S.A.; FERNANDES, G.F.; BEZERRA, L.M.; FELIPE, M.S.; DE CAMARGO, Z.P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.6, e2281, 2013.

RODRIGUES, A. M.; et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infect. Dis.**, v.14, p.219, 2014a.

RODRIGUES, A. M.; et al. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.78, p.383–387, 2014b.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G.; ZHANG, Y.; DE CAMARGO, Z.P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes & Infections**, v.3, n.5, e32, 2014c.

ROSSI, C. N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C. E. Retrospective assessment of the treatment of sporotrichosis in cats and dogs using itraconazole. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.41, p.01-05, 2013.

SANCHOTENE, K. O.; MADRID, I. M.; KLAFKE, G. B.; BERGAMASHI, M.; DELLA TERRA, P. P.; RODRIGUES, A. M. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v.58, p.652–658, 2015.

SCHUBACH, T. M.; et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, p.1623–1629, 2004.

SENGER, G.; et al. Determinação da atividade antioxidante, antifúngica, antibacteriana e identificação de compostos fenólicos de extratos de diversas variedades de plantas visando sua incorporação na produção de cosméticos: resultados preliminares. **Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar – VI MICTI**, Instituto Federal Catarinense – Câmpus Camboriú, 2013.

SINGH, J. P.; et al. *In vitro* antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. **LWT - Food Sci. Technol.**, v.65, p.1025–1030, 2016.

SOUZA, L. L.; NOBRE, M. O.; SILVEIRA, E.; et al. Esporotricose em gatos portadores do vírus da leucemia felina. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.12, n.1-3, p.99-101, 2005.

STOPIGLIA, C. M.; MAGAGNIN, M. R.; CASTRILLÓN, S. D.; MENDES, D.; HEIDRICH, P.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal Susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v.52, p.56-64, 2014

SYKES, J. E. Immunodeficiencies caused by infectious diseases. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.40, n.3, p.409–23, 2010.

TÉLLEZ, M. D.; BATISTA-DUHARTE, A.; PORTUONDO, D.; QUINELLO, C.; BONNE-HERNÁNDEZ, R.; CARLOS, J. Z. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v.160, p.2352-2365, 2014.

WALLER, S.B.; et al. *In vitro* susceptibility of the *Sporothrix brasiliensis* to aqueous extracts of the green-tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Acta Veterinária Brasileira**, v.9, n.4, p.342–347, 2015.

WALLER, S.B.; et al. Anti- *Sporothrix* spp. activity of medicinal plants. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.52, n.2, p.221-237, 2016a.

WALLER, S. 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, 2016b.

WALLER, S.B; et al. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oils of Lamiaceae family. **Mycopathology**, v.181, p.857–863, 2016c.

WALLER, S. B.; et al. Chemical composition and cytotoxicity of extracts of marjoram and rosemary and their activity against *Sporothrix brasiliensis*. **Journal of Medical Microbiology**, v.66

Anexos

Pelotas, 8 de fevereiro de 2018

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada “**Determinação de pacientes FIV/FeLV positivos com esporotricose, aspectos clínicos da micose e sensibilidade dos isolados de *Sporotrix* spp. a compostos fenólicos e terpênicos**”, registrada com o nº 23110.009219/2017-89, sob a responsabilidade de **Marlete Brum Cleff**- que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 05/02/2018.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	05/03/2018 a 20/12/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Felis catus</i> /SRD
Nº de animais	31
Idade	Variável
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Pacientes da rotina do HCV-UFPel

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

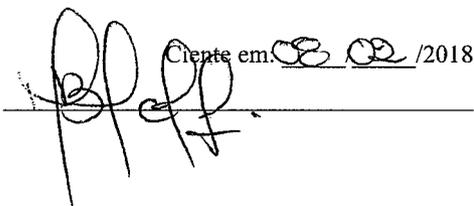
Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 9219-2017**).



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:



Ciente em 08/02 /2018