

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**



Dissertação

**Avaliação do uso do imunomodulador β (1-3) glucana isoladamente e em
associação ao Itraconazol na esporotricose experimental**

Anelise Afonso Martins

Pelotas, 2008

Anelise Afonso Martins

**Avaliação do uso do imunomodulador β (1-3) glucana isoladamente e em
associação ao Itraconazol na esporotricose experimental**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientador: Profa. Dra. Márcia de Oliveira Nobre

Pelotas
Rio Grande do Sul - Brasil
Fevereiro -2008

Dados de catalogação na fonte:

(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M386a Martins, Anelise Afonso

Avaliação do uso do imunomodulador $\beta(1-3)$ glucana isoladamente e em associação ao Itraconazol na esporotricose experimental. / Anelise Afonso Martins. – Pelotas, 2008.

83f.: il.

Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. – Pelotas, 2008, Mário Carlos Araújo Meireles, Orientador; co-orientador Márcia de Oliveira Nobre.

Banca Examinadora:

- Prof. Luiz Carlos Severo - UFRGS
- Prof^a. Cristina Gevehr Fernandes - UFPel
- Prof^a. Márcia de Oliveira Nobre - UFPel
- Dr^a. Patrícia da Silva Nascente - UFPel (Suplente)
- Prof. Mário Carlos Araújo Meireles - UFPel (Orientador)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e nunca me deixar desanimar perante os obstáculos, dando-me força redobradas para continuar e vencê-los.

Ao Grupo de Pesquisa em Micologia da Faculdade de Veterinária e a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho.

Aos meus orientadores, Mário Carlos Araujo Meireles e Márcia de Oliveira Nobre, pela confiança, incentivo, amizade, compreensão e ensinamentos em todos os momentos.

Às minhas amigas e colegas de pós-graduação Ana Raquel Mano Meinerz, Antonella Souza Mattei, Ana Paula Albano, Helen Silveira, Isabel Martins Madrid, Lorena Souza, Marlete Brum Cleff, Melissa O. Xavier, Patrícia da Silva Nascente, Renata Osório Faria, Rosema Santin e Tatiana de Ávila Antunes, pelo carinho, incentivo, amizade e auxílio em todos os momentos.

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Micologia, Franklin, Luiza, Anelise, Ângela e Lara pela amizade e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À Prof. Cristina Gevehr Fernandes pelo auxílio com a análise histopatológica.

Ao Prof. Luiz Filipe Damé Schuch pela amizade, incentivo, paciência e auxílio com a análise estatística.

À Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

Aos funcionários da Faculdade de Veterinária, Paulo e Daiane pela colaboração, com o preparo dos materiais utilizados neste projeto.

Ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas pela experimentação “in vivo”.

Aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e FAPERGS pelo financiamento desta pesquisa e concessão de bolsas.

À empresa Hebron Farmacêutica em especial ao Sr. Avaniel Marinho, diretor de pesquisa, desenvolvimento e inovação tecnológica, por ceder o medicamento Imuno-glucan[®] para realização do experimento.

Aos meus pais, Guaraci e Sirley (*in memoriam*), por terem me criado com muito amor e carinho ensinando-me com simplicidade, grandes valores da vida: amor, respeito e honestidade... Mãe, sei que estás vibrando comigo esta vitória e

com certeza ela também te pertence. Pai obrigado por tudo, por acreditares em mim e estares sempre ao meu lado, por me dar oportunidades e principalmente força para que realizasse meus sonhos. AMO VOCÊS!!

Ao meu filho Matheus, meu eterno amorzinho, pelos sorrisos, pelos abraços e beijos que me deram forças para prosseguir mesmos nas horas mais difíceis. Obrigado por existires, te amo muito!!!

Ao meu esposo Gomer, que em todos os momentos me incentivou com seu amor, compreensão, amizade e companheirismo, sem os quais não poderia ter chegado até aqui. Obrigado por estares sempre ao meu lado, te amo!!!

Aos meus sogros Mario e Zila, por fazerem parte da minha vida ajudando-me a concretizar mais essa etapa. Muito obrigado!

Ao meu irmão, cunhada e sobrinhos, pelo carinho e incentivo que sempre encontrei em vocês.

Ao meu avô, padrinhos, tios, primos e afilhados, por acreditarem em mim, entenderem a minha ausência e estarem sempre ao meu lado quando precisei.

Enfim, a todos os outros que não foram citados aqui, mas que fazem parte da minha vida e me incentivaram nessa jornada.

RESUMO

MARTINS, Anelise Afonso. **Avaliação do uso do imunomodulador β (1-3) glucana isoladamente e em associação ao Itraconazol na esporotricose experimental.** 2008. 83f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
Orientador: Mário Carlos Araujo Meireles
Co-orientador: Márcia de Oliveira Nobre

A esporotricose, micose subcutânea causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, acomete o homem e várias espécies de animais, sendo os felinos domésticos envolvidos nos relatos zoonóticos da enfermidade. Considerando as dificuldades terapêuticas no tratamento da micose nessa espécie animal, incluindo toxicidade e o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos tradicionalmente utilizados no tratamento da enfermidade, o estudo objetivou avaliar a eficácia do imunomodulador β (1-3) glucana isoladamente e em associação ao Itraconazol no tratamento da esporotricose cutânea experimental. Foram utilizados 100 ratos Wistar, cepa UFPel, machos, os quais foram divididos em quatro grupos de 25 animais: grupo controle (G1), recebeu 0,5ml de água destilada estéril via oral (VO) e 0,25ml de solução salina estéril via subcutânea (SC); grupo G2 tratado com 10mg/kg de itraconazol VO e 0,25ml de solução salina SC; grupo G3 tratado com 10mg/kg de itraconazol VO associado a 0,5 mg de β (1-3) glucana SC e o grupo G4 tratado com 0,5 ml de água destilada estéril VO e 0,5 mg β (1-3) glucana SC. Os animais foram inoculados por via subcutânea com 2×10^3 células de *Sporothrix schenckii*/ml, e após 12 dias, quando todos apresentavam lesões características da esporotricose, iniciou-se o tratamento que prosseguiu por seis semanas. O antifúngico e a água destilada estéril foram administrados diariamente, enquanto que a solução salina e a β (1-3) glucana semanalmente. Dez animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e submetidos a avaliações clínicas semanais observando presença de nódulos, úlceras, regressão e cicatrização das lesões durante o período experimental. O restante dos animais (três de cada grupo) foram eutanasiados e necropsiados semanalmente para a quantificação das unidades formadoras de colônias fúngicas (UFCs), retroisolamento e avaliação histopatológica. O mesmo procedimento foi realizado nos animais submetidos às avaliações clínicas ao término do tratamento. Na avaliação clínica foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos G2, G3 e G4 em relação ao controle (G1), entre os grupos tratados o grupo G3 resultou em maior frequência (9/10) de animais em processo de regressão e cicatrização das lesões. Nas UFCs assim como nos retroisolamentos do *S. schenckii* foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados e controle, sendo que entre os tratamentos o grupo G3 demonstrou a menor quantificação fúngica assim

como de retroisolados positivos para o agente. Na avaliação histopatológica foi verificada a presença de granulomas iniciais a tardios, tendo o G1 predomínio de granulomas iniciais. Na análise histopatológica foi observado semelhante padrão de infiltrado inflamatório nos quatro grupos experimentais, no entanto os G3 e G4 obtiveram maior frequência (32%, 36%) de animais com infiltrado de polimorfonucleares (PMN). Conforme os resultados obtidos os três tratamentos foram eficazes para a remissão da esporotricose cutânea experimental, no entanto, a associação do antifúngico ao imunomodulador propiciou uma regressão mais precoce das lesões.

Palavras-chaves: Esporotricose. Itraconazol. β (1-3) glucana. Imunomodulador. *Sporothrix scheckii*

ABSTRACT

MARTINS, Anelise Afonso. **Evaluation of the immunemodulator β (1-3) glucan use isolated and in association to itraconazole in the experimental sporotrichosis.** 2008. 83f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Orientador: Mário Carlos Araujo Meireles

Co-orientador: Márcia de Oliveira Nobre

The sporotrichosis, subcutaneous mycosis caused by the fungus dimorphic *Sporothrix schenckii*, can infect the man and several species of animals. The domestic felines are involved in the zoonotic reports of this illness. Considering the therapeutic difficulties in the treatment of this mycosis in felines, including toxicity and the resistance development to the antifungal currently use, the aim of the study was evaluate the effectiveness of the immunemodulator β (1-3) glucan isolate and in association with itraconazole in the treatment of the experimental cutaneous sporotrichosis. One hundred mice Wistar, strain UFPel, males were used. They were divided in four groups with 25 animals: group control (G1) witch received 0,5ml of sterile distilled water orally (VO) and 0,25ml of sterile saline solution subcutaneously (SC); group G2 treated with 10mg/kg of itraconazole VO and 0,25ml of saline solution SC; group G3 treated with 10mg/kg of itraconazole VO associated to 0,5 mg of β (1-3) glucan SC and the group G4 treated with 0,5 ml of distilled sterile water VO and 0,5 mg β (1-3) glucan SC. Animals were inoculated subcutaneously with 2×10^3 cells of *Sporothrix schenckii*/ml, and after 12 days, when all of them had already show characteristic lesions of sporotrichosis, the treatment was started, continuing for six weeks. Antifungal and distilled sterile water were administered daily, while the saline solution and the β (1-3) glucan weekly. Ten randomized animals of each group were choused and submitted to clinical evaluations weekly observing the presence of nodules, ulcers, regression and cicatrisation of the lesions during the experimental period. The remaining animals (three of each group) were weekly necropsied for the quantification of the units forming fungal colonies (UFCs), retroisolation and for histopathology evaluation. The same procedure was accomplished in the animals submitted to the evaluations at the end of the treatment. In clinical evaluation statistical difference was observed ($p < 0,05$) among the groups G2, G3 and G4 in relation to the control (G1). Among the treated groups, the group G3 resulted in larger frequency (9/10) of animals with regression process and cicatrisation of the lesions. In UFCs as well as in the retro isolation of the *S. schenckii* statistical differences were observed between the treated groups and control. The group G3 demonstrated the smallest fungal quantification as well as the minimum positive retro isolation of the agent. In the histopathology evaluation the presence of initial

granulomas was verified as well as the late ones. In the G1 the prevalence was for initial granulomas. Similar inflammatory infiltrated was observed in all experimental groups, however G3 and G4 showed larger frequency (32%, 36%) of animals with polymorphonuclear infiltrate. According to the observed results, we conclude that all of the treatments were effective against cutaneous experimental sporotrichosis, however the glucana and itraconazole association showed an earlier lesions decreases.

Keywords: Itraconazole. Sporotrichosis. β (1-3) glucan. Immunemodulator. *Sporothrix schenckii*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Colônia filamentosa de *Sporothrix schenckii* em placa contendo meio Agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida proveniente de esporotricose disseminada felina (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....35
- Figura 2. Preparo do inóculo fúngico. (A) Retirada de fragmentos da colônia de *Sporothrix schenckii* do meio de cultura com auxílio de lâmina de bisturi estéril; (B) Transferência dos fragmentos fúngicos para tubo de ensaio contendo solução salina tamponada estéril (PBS); (C) Inóculo fúngico após filtragem e lavagem em PBS; (D) Inóculo de *S. schenckii* padronizado em 2×10^3 células/ml (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....36
- Figura 3. Inoculação subcutânea no coxim plantar direito com a suspensão fúngica contendo 2×10^3 células de *S. schenckii*/ml (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....37
- Figura 4. Administração dos fármacos; (A) animais experimentais tratados por via oral com auxílio de sonda orogástrica; (B) animais experimentais tratados por via subcutânea (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....38
- Figura 5. Unidades Formadoras de Colônias (UFC); (A) maceração do fragmento de lesão com o auxílio de grau e pistilo; (B) diluições seriadas da suspensão fúngica; (C) transferência da suspensão fúngica para placas; (D) suspensão fúngica semeada através da técnica de espalhamento com alça de Drigalski (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....40
- Figura 6. Animais pertencentes ao G1: (A) Lesão ulcerada e exsudativa no ponto de inoculação no início do período experimental (semana três); (B) Edema da pata inoculada envolvendo articulação tibiotársica e presença de úlcera no ponto de inoculação no final do período experimental (semana sete) (Setor de Micologia, FV-UFPEl)43
- Figura 7. Animais pertencentes ao G2: (A) Lesão ulcerada no coxim plantar direito no início do período experimental (semana três); (B) lesão em processo de cicatrização no final do período experimental (semana sete) (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....43
- Figura 8. Animais pertencentes ao G3: (A) Lesão ulcerada e exsudativa no ponto de inoculação no início do período experimental (semana três); (B) Cicatrização no sítio de inoculação no final do período experimental (semana sete)(Setor de Micologia, FV-UFPEl).....44
- Figura 9. Animais pertencentes ao G4: (A) Lesão ulcerada e exsudativa no início do período experimental (semana três); (B) Lesão em processo de regressão no final do período experimental (semana sete) (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....44

- Figura 10. Período experimental correspondente a permanência de úlceras ativas no ponto de inoculação dos animais com esporotricose cutânea, conforme os grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....45
- Figura 11. Evolução clínica da esporotricose cutânea em relação à permanência de úlceras e exsudato no ponto de inoculação. (G1)- grupos controle; (G2)- grupo itraconazol; (G3)- grupo itraconazol + β (1-3) glucana; (G4) grupo β (1-3) glucana (Setor de Micologia, FV-UFPEL)45
- Figura 12. Frequência de regressões e cicatrização das lesões no ponto de inoculação dos animais com esporotricose cutânea experimental em sete semanas (Setor de Micologia, FV-UFPEL)46
- Figura 13. Frequência de animais com esporotricose cutânea em processo de regressão e cicatrizada no ponto de inoculação conforme grupo experimental (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....46
- Figura 14. Animais experimentais apresentando lesões em outras áreas corpóreas: (A) animal do grupo G1 com lesões ulceradas localizadas no dorso da pata inoculada na quinta semana experimental; (B) animal do grupo G1 com lesão ulcerada localizada na cauda ao término do período experimental; (C) animal do grupo G2 com lesões ulceradas na articulação do membro inoculado; (D) animal do grupo G3 com edema na articulação tibiotarsiana na terceira semana experimental; (E) animal do grupo G4 com lesão nodular localizada no dorso da pata inoculada (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....48
- Figura 15. Frequência semanal de animais com esporotricose cutânea apresentando lesões em outras partes corpóreas além do ponto de inoculação conforme os grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....48
- Figura 16. Alterações anatomopatológicas observadas na necropsia do grupo G1; (A) membro inoculado apresentado lesão com exsudato purulento no ponto de inoculação e articulação tibiotarsiana; (B) presença de lesões puntiformes esbranquiçadas no fígado (C) presença de lesões puntiformes esbranquiçadas no baço (Setor de Micologia, FV-UFPEL)50
- Figura 17. Frequência de retroisolamento positivo para *Sporothrix schenckii* obtido a partir dos órgãos internos conforme o grupo experimental (Setor de Micologia, FV-UFPEL)51
- Figura 18. Retroisolamento positivo para o *Sporothrix schenckii* (A) Colônias filamentosas de *S. schenckii* apresentado coloração inicialmente creme passando a enegrecidas com o envelhecimento da colônia; (B) aspecto microscópico do fungo apresentando hifas finas hialinas com conidióforos simpodiais frutificando conídios dispostos ao redor (Setor de Micologia, FV-UFPEL).....51
- Figura 19. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da suspensão de *Sporothrix schenckii* (na diluição 10^{-2}) provenientes da primeira necropsia (Setor de Micologia, FV-UFPEL)53

- Figura 20. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Sporothrix schenckii*, em três diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) pertencentes ao grupo controle (G1) ao final do período experimental (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....53
- Figura 21. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Sporothrix schenckii*, em três diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) pertencentes ao grupo itraconazol (G2) no final do período experimental (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....54
- Figura 22. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Sporothrix schenckii*, em três diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) pertencentes ao grupo itraconazol + glucana (G3) ao final do período experimental (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....54
- Figura 23. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Sporothrix schenckii*, em três diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) pertencentes ao grupo glucana (G4) ao final do período experimental (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....55
- Figura 24. Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias de *Sporothrix schenckii* provenientes do ponto de inoculação dos animais conforme os grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....55
- Figura 25. Frequência de animais com esporotricose cutânea experimental que apresentaram infiltrado inflamatório contendo polimorfonucleares (PMN) no ponto de inoculação (Setor de Micologia, FV-UFPEl).....57
- Figura 26. Corte histológico pertencente ao G1 proveniente da 6ª necropsia: (A) Úlcera cutânea. Observa-se a perda da continuidade da epiderme. Presença de necrose tecidual e intenso infiltrado inflamatório. HE, obj. 10x (B) Pulmão. Granulomas multifocais, constituídos por centro necrótico, circundado por infiltrado de mononucleares e células gigantes, delimitados por cápsula de tecido conjuntivo. HE, obj.4x (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPEl).....58
- Figura 27. Corte histológico pertencente ao G1 proveniente da 6ª necropsia (7ª semana). Ponto de inoculação (derme). Presença de células PAS-positivo, *Sporothrix Schenckii*, no interior de células gigantes na periferia de foco necrótico. PAS, obj. 40x (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPEl).....58
- Figura 28. Corte histológico pertencente ao G2, proveniente da 3ª necropsia (semana 4): (A) Linfonodo. Grande granuloma contendo centro com extensa área de necrose (a) Granulomas multifocais pequenos, bem organizados, com necrose escassa e ampla cápsula fibrosa (b). H-E, obj.10x. (B) Detalhe da foto anterior. Múltiplos focos de *S. schenckii* no interior de ampla área de necrose. PAS, obj. 10x (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPEl).....59
- Figura 29. Corte histológico pertencente ao G3, proveniente da 3ª necropsia (A) Granuloma profundo, constituído por grande centro necrótico. Observa-se a epiderme íntegra. H-E, obj. 10x. (B) Detalhe da foto anterior, no qual observa-se os restos celulares que constituem a necrose e a espessa cápsula de tecido conjuntivo que circunda a mesma. H-E, obj. 20x (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPEl).....59

Figura 30. Corte histológico pertencente ao G4 proveniente da 3ª necropsia: (A) Presença de grande granuloma profundo, subjacente a pele íntegra. H-E, obj. 5x. (B) Detalhe da borda do granuloma, onde observa-se infiltrado inflamatório de macrófagos. H-E 40x (Laboratório de Histoquímica, FV-UFPel).....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.....	34
Tabela 2. Freqüência de animais com esporotricose cutânea apresentando nódulos, úlceras e exsudato, regressão e cicatrização das lesões no ponto de inoculação conforme os grupos experimentais.....	42
Tabela 3. Freqüência de animais com alterações anatomopatológicas observadas durante as necropsias realizadas no decorrer do período experimental conforme cada grupo de tratamento (n=25).....	49
Tabela 4. Quantificação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de <i>Sporothrix schenckii</i> referentes ao ponto de inoculação dos animais conforme os grupos experimentais.....	52

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	14
INTRODUÇÃO	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
<i>Sporothrix schenckii</i>	19
Esporotricose.....	21
Tratamento da esporotricose	26
Itraconazol.....	27
β (1-3) Glucana.....	28
MATERIAL E MÉTODOS	33
Modelo experimental.....	33
Grupos experimentais.....	33
Isolado de <i>Sporothrix schenckii</i>	34
Preparo do inóculo.....	35
Inoculação experimental.....	36
Tratamento dos animais experimentais com esporotricose cutânea.....	36
Acompanhamento clínico.....	38
Necropsia dos animais experimentais.....	38
Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i>	38
Contagem de Unidades Formadoras de Colônias(UFCs).....	39
Avaliação histopatológica.....	40
Análise estatística.....	40

RESULTADOS	41
Avaliação clínica dos animais experimentais.....	41
Lesões no ponto de inoculação.....	41
Presença de múltiplas lesões.....	47
Alterações anatomopatológicas dos animais experimentais.....	49
Retroisolamento do <i>Sporothrix schenckii</i>	50
Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs).....	52
Análise histopatológica.....	56
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	66
PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

O aumento da quimioterapia, a disponibilidade de novos antibióticos, os transplantes de órgãos, constituem avanços que modificaram a evolução natural de doenças degenerativas e infecciosas. Entretanto, tais recursos e procedimentos geram dano ao sistema imunológico do hospedeiro, conseqüentemente, predispondo às doenças oportunistas como as causadas por fungos. A esporotricose, micose subcutânea causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* tem se destacado pelo número crescente de casos envolvendo varias espécies de animais e o homem principalmente os imunocomprometidos que desenvolvem formas mais graves da enfermidade. Esta enfermidade apresenta distribuição mundial, sendo que no Brasil os principais relatos da micose pertencem ao Rio de Janeiro com mais de 1400 casos descritos em humanos e animais seguido de São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Paraná (BARROS et al., 2001, 2003, 2004; FERNANDES et al., 2004; FLEURY et al., 2001; GORGOZINHO et al., 2006; LARSSON et al., 1989; MARQUES et al., 1997; MEINERZ et al., 2007b; NOBRE et al., 2001, 2002a; SCHUBACH et al., 2004; 2006; XAVIER et al., 2004).

A transmissão direta da esporotricose está associada à perfuração da derme por felpas de madeiras, espinhos de roseiras e outros vegetais contaminados pelo agente fúngico, sendo assim considerada uma enfermidade ocupacional, afetando, principalmente, trabalhadores rurais, floristas e jardineiros (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002). No entanto nas últimas décadas são crescentes os casos zoonóticos envolvendo o felino doméstico, especialmente macho e não castrado. Os relatos descrevem a transmissão da doença por arranhadura, mordedura, contaminação por solução de continuidade cutânea preexistente, ou contato direto da pele levemente irritada com lesões ulceradas e exsudativas dos animais enfermos. Sugere-se que a transmissão seja facilitada pela presença do microrganismo em unhas, cavidade bucal de felinos domésticos e devido à grande quantidade de leveduras presente nas lesões dos animais

infectados (MARQUES et al., 1993; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; SCHUBACH et al., 2001; SCHUBACH et al., 2003; SOUZA et al., 2006; XAVIER et al., 2004). Aliado a esses fatores, a presença cada vez mais freqüente do felino como animal de companhia, convivendo no mesmo “nicho urbano” que o homem, favorece a transmissão da esporotricose a partir do animal portador do *S. schenckii* (BARROS et al., 2003; 2004; NETO et al., 1999; SOUZA et al., 2000; XAVIER et al., 2004).

Na década de noventa o itraconazol, atual antifúngico de eleição para as formas cutânea e linfocutânea da esporotricose, emergiu como uma opção terapêutica eficaz com menos efeitos colaterais em relação aos antifúngicos tradicionalmente utilizados para a micose. Porém, estudos posteriores vêm demonstrando que são crescentes os casos de resistência *in vitro*, assim como recidiva e falha terapêutica em indivíduos e animais, especialmente felinos (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004; NOBRE et al., 2002b; RESTREPO et al., 1986; ROCHETTE; ENGELEN; VANDEN BOSSCHE, 2003; KOHLER et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004).

Em vista da dificuldade terapêutica relacionada à toxicidade e tempo prolongado de terapia antifúngica nos casos de esporotricose felina, tem se buscado novas alternativas para o tratamento da enfermidade. Dentre elas se destaca o uso de imunomoduladores que apresentam grande relevância no combate aos microrganismos patogênicos através da estimulação da resposta imune. Em especial, a β (1-3) glucana apresenta ampla capacidade moduladora tanto da resposta celular, através da estimulação de células fagocitárias, quanto da humoral. As principais atividades imunofarmacológicas da β (1-3) glucana estão relacionadas com efeitos anti-tumorais, aumento na proteção contra infecções virótica, bacterianas, parasitárias e fúngica (AZEVEDO et al., 2005; CRISPIM; MEDEIROS; SALES, 2004; LEE et al., 2002; MEIRA et al., 1996; PELIZON et al., 2005). Neste contexto, o estudo teve como objetivo avaliar o uso do imunomodulador β (1-3) glucana isoladamente e em associação ao itraconazol no tratamento da esporotricose cutânea experimental em modelo murino, com o intuito de encontrar uma substância que possa auxiliar no tratamento dos casos graves e refratários aos antifúngicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Sporothrix schenckii*

O fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* foi isolado pela primeira vez em 1898 nos Estados Unidos a partir de uma lesão de paciente humano, nesta ocasião o agente etiológico da esporotricose foi denominado de *Sporotrichia*. Em 1900, Hektoen & Perkins relataram o segundo caso da enfermidade e denominaram o fungo isolado de *S. schenckii*. Na França em 1905, Beurman & Gougerot isolaram o agente de casos clínicos, porém o consideraram diferente denominando-o *Sporotrichum beurmanni*. Contudo em 1921, tanto a esporotricose americana quanto a francesa foram consideradas idênticas, sendo em 1963, proposto por Carmichael a denominação do agente de *Sporothrix schenckii* (RIPPON, 1988; ARENAS, 1993; LACAZ et al., 2002).

O agente etiológico da esporotricose está classificado taxonomicamente na sua forma anamorfa como pertencente à subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Hyphomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Moniliaceae*, gênero *Sporothrix* e espécie *schenckii*, única espécie do gênero considerada patogênica. Estudos moleculares sugerem que a sua forma sexuada seja a *Ceratocystis stenoceras* (*Ophiostoma stenoceras*) (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002).

A temperatura ideal para o crescimento do *S. schenckii* é de 25-27°C com a sua inibição a 39-40°C (LACAZ et al., 2002), embora alguns isolados tenham a capacidade de se multiplicar a temperatura de 40 e 41 °C com pouca viabilidade. Devido ao seu dimorfismo, o *S. schenckii* apresenta no meio ambiente ou em condições *in vitro* a 25°C um rápido crescimento, inicialmente como colônia branca amarelada, de aspecto sedoso, membranoso, às vezes com micélio aéreo, que com a maturidade do cultivo torna-se pregueada e escurecida. Microscopicamente são observadas hifas finas, septadas, ramificadas, medindo 1-2µm de diâmetro com conidióforos alongados, simpodiais, contendo ápices intumescidos, frutificando conídios hialinos, elípticos ou ovais dispostos em forma de rosetas. Em parasitismo

ou quando cultivado a 37°C, a colônia adota aspecto leveduriforme de coloração cinza ou creme com micromorfologia caracterizada por células pequenas, arredondadas, ovais ou no formato de “charutos”, com brotamento simples ou múltiplo (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002).

Vários fatores além da temperatura estão relacionados ao dimorfismo do *S. schenckii*, entre eles se destacam o pH, tensão de dióxido de carbono, aeração e fonte de carbono (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). A transição da forma micelial para leveduriforme dura em torno de 13 dias, sendo que em condições experimentais nas primeiras 48h após a inoculação do agente foi comprovado o desaparecimento das hifas e o início da mudança dos conídios para forma leveduriforme (CORREA et al., 1991).

Estudos demonstram que o dimorfismo, termotolerância, enzimas extracelulares, componentes da parede celular e presença de melanina estejam envolvidos na patogenicidade do *S. schenckii*. Quanto à termotolerância, estudos observaram que isolados incapazes de crescer a temperaturas superiores a 35 e 37°C, estariam associados à forma cutânea da micose, enquanto que os mais termotolerantes estariam aptos a se desenvolver nos órgãos internos, desenvolvendo a forma sistêmica da esporotricose (KAUFFMAN, 1999; TACHIBANA; MATSUYAMA; MITSUYAMA, 1999; KONG et al., 2006). Em relação à melanina, já foi demonstrado que a sua presença confere ao agente proteção celular a danos químicos e físicos, provavelmente através do seqüestro de radicais livres e dificulta a ação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (DIXON; DUCAN; HURD, 1992; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000; NOBRE et al., 2004).

As enzimas extracelulares produzidas pelo *S. schenckii*, como as proteinases, desempenham importante função na invasão tecidual, provocando a lise do estrato córneo, colágeno tipo I e elastina da pele, permitindo desta forma, o desenvolvimento fúngico. As fosfatases ácidas influenciam na interação da célula leveduriformes com macrófagos, além de atuarem na membrana celular, catalisando e liberando fosfato das fosfoproteínas (ARNOLD et al., 1986; YOSHIKE et al., 1993; HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996; LIMA et al., 1999; 2001).

Os fatores de virulência relacionados ao agente favorecem a invasão tecidual e dificultam a resposta imune, propiciando a instalação e permanência do microrganismo no hospedeiro (HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996; LIMA; SCHAFFER;

BORBA, 2003; NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

A parede celular fúngica é composta por glucanas solúveis e insolúveis e peptídeo-ramnomanana composto por ramnose, manose e proteína (LLOYD; BITTON 1971). Estudos *in vivo* estabeleceram a possível relação entre a patogenicidade do *S. schenckii* com o seu tempo de cultivo, onde demonstraram que isolados mais jovens com maior concentração de ramnose do que manose foram mais patogênicos, em comparação aos isolados com maior tempo de cultivo com proporção de ramnose menor (PREVIATO et al., 1979; FERNANDEZ; MATHEWS; BEZERRA, 1999). Acredita-se que isto ocorra devido a peptídeo-ramnomanana estimular a mitose de linfócitos, incitando reação de hipersensibilidade tardia assim como, a produção de anticorpos (CARLOS; SGARBI; PLACERES, 1999; FERNANDEZ; MATHEWS; BEZERRA, 1999; FIGUEIREDO et al., 2004; KAJIWARA et al., 2004).

2.2 Esporotricose

A esporotricose é uma infecção subcutânea de evolução subaguda ou crônica causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* que afeta o homem e várias espécies de animais. A enfermidade apresenta distribuição mundial, com maior frequência em zonas de clima temperado e tropical, sendo a maioria dos casos descritos na América Central e América do Sul (CONTI-DIAZ, 1989; PAPPAS et al., 2000; DE ARAUJO; MARQUES; FERDEL, 2001; SCHUBACH et al., 2002; NOBRE et al., 2002a; XAVIER et al., 2004; MADRID et al., 2007).

O primeiro relato da enfermidade foi descrito nos Estados Unidos por Benjamin Schenck, em 1898, o qual realizou o isolamento do agente a partir de uma lesão de paciente humano. No Brasil, a micose é conhecida desde 1907, quando foi relatada por Lutz; Splendore a infecção no homem e em ratos no estado de São Paulo. Posteriormente, Freitas, Migliano e Zani Neto (1956) descreveram a enfermidade em felinos, e Souza (1957) descreveu em cães em Santa Catarina. No Rio Grande do Sul o primeiro registro foi realizado por Londero, Castro e Fischman (1964), que diagnosticaram a esporotricose em dois cães. Almeida et al. (1955) alertou quanto à possível transmissão zoonótica envolvendo felinos e humanos.

A infecção com *S. schenckii* está associada à inoculação traumática do microrganismo na derme, por espinhos, felpas de madeiras, material vegetal, assim como por arranhadura e mordedura de animais contaminados ou por contaminação da pele com solução de continuidade (DIAZ, 1987; MARQUES et al., 1993; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000). Raramente a contaminação ocorre por inalação do agente, podendo resultar nas formas pulmonar ou sistêmica da micose (MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). Em humanos, a esporotricose é uma doença considerada ocupacional, envolvendo pessoas expostas a vegetais ou solo rico em matéria orgânica, como agricultores, floristas e jardineiros (MARQUES et al., 1993). No entanto nas últimas décadas são crescentes os relatos zoonóticos da micose envolvendo o felino doméstico, especialmente nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná (LARSSON et al., 1989; NOGUEIRA et al., 1995; BARROS et al., 2001, 2003, 2004; FLEURY et al., 2001; NOBRE et al., 2001, 2002a; SCHUBACH et al., 2004; FERNANDES et al., 2004; XAVIER et al., 2004; MEINERZ et al., 2007b).

Nos felinos a contaminação com o agente da esporotricose está relacionada aos hábitos peculiares da espécie, como contato com o solo e vegetais ou mordedura e arranhadura durante brincadeiras e brigas com outros felinos principalmente machos não castrados e de vida livre (DIXON et al., 1991; DONADEL et al., 1993; FARIAS et al., 1997; SOUZA et al., 2006). Estudos evidenciam que a transmissão zoonótica do *S. schenckii* a humanos pelos felinos, seja facilitada pelo grande número de leveduras presente nas lesões desses animais infectados, assim como pela presença do agente nas unhas e cavidade bucal, destacando o risco de transmissão através destas vias (SCHUBACH et al., 2001; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; SOUZA et al., 2006). Aliado a esses fatores, é importante salientar o crescente número de felinos adquiridos como animais de companhia o que propicia o contato próximo do felino com o proprietário humano (CARVALHO et al., 1991, BARROS et al., 2004, SCHUBACH et al., 2004; XAVIER et al., 2004).

A esporotricose pode apresentar distintas formas com diferente evolução clínica, de acordo com o estado imunológico do hospedeiro suscetível, quantidade de inóculo e virulência do fungo (JUSTA P. NETO et al., 1999; SEVERO et al., 1999; APPENZELLER et al., 2006; KONG et al., 2006). De maneira geral são descritas a forma cutânea (cutânea fixa, linfocutânea e cutânea disseminada), a extracutânea

(pulmonar primária, ocular, articular e ósseo) e a sistêmica (DONADEL et al., 1993; FARIAS et al., 1997; SAMPAIO; CASTRO; RIVITTI, 2000; SCHUBACH; SCHUBACH 2000).

A forma cutânea fixa da esporotricose é caracterizada por uma lesão primária restrita ao ponto de inoculação, enquanto que na linfocutânea ocorre comprometimento da cadeia linfática adjacente à lesão primária. Essas apresentações clínicas são as de maior ocorrência em cães e humanos (DONADEL et al., 1993; FARIAS et al., 1997; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000). Na cutânea disseminada, múltiplas lesões distribuem-se pelo tegumento cutâneo e muitas vezes evoluem para forma sistêmica da doença com o envolvimento de um ou mais órgãos internos, incluindo tecido articular, ósseo, pulmonar, nervoso, hepático e ocular. Essa forma está associada freqüentemente a indivíduos imunocomprometidos e felinos domésticos (MARQUES et al., 1993; NETO et al., 1999; NOBRE et al., 2001; ROCHA et al., 2001; HARDMAN et al., 2005).

As lesões cutâneas são caracterizadas pela formação de eritema, nódulos de consistência firme ou flutuante que posteriormente evoluem para uma lesão com centro necrótico-ulcerado, podendo drenar exsudato de aspecto serosanguinolento de coloração castanho avermelhado originando crostas (DONADEL et al., 1993; SAMPAIO; CASTRO; RIVITTI, 2000, SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; NOBRE et al., 2005, MEINERZ et al., 2007b). Nas espécies canina e felina, as lesões distribuem-se principalmente pela região cefálica, porção distal dos membros e base da cauda, comumente observando-se linfadenopatia regional ou generalizada (DUNSTAN et al., 1986; MARQUES et al., 1993; FARIAS et al., 1997). As lesões se assemelham àquelas observadas em outras enfermidades erodo-ulcerativas, principalmente em felinos, como o carcinoma epidermóide, criptococose, piodermite e leishmaniose, o que demonstra a importância do exame micológico para diagnóstico de certeza (LARSSON et al., 1989; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000; NOBRE et al., 2002a).

A cultura micológica de exsudatos, tecidos ou aspirados de lesões, permite a confirmação do diagnóstico da esporotricose. A visualização direta do microrganismo é difícil em exsudatos de lesão em humanos, devido à pequena quantidade do agente presente. Ao passo que em felinos o exame citológico, freqüentemente, revela a presença de grande quantidade do microrganismo, polimorfo, localizado inter ou intracelular. O *S. schenckii* se desenvolve bem em vários meios de cultivo,

entre eles o meio ágar Sabouraud com cloranfenicol acrescido de cicloheximida, podendo, também ser cultivado em meios como ágar-fubá, infusão cérebro coração (BHI) e ágar batata (KNOW-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002).

A visualização do *S. schenckii* nas lesões pode ser realizada através do exame histopatológico. Os cortes teciduais corados pelas técnicas histoquímicas de hematoxilina-eosina (HE), Ácido Periódico de Schiff (PAS) e metenamina argêntica de Gomori-Grocott permitem evidenciar a reação inflamatória e as células leveduriforme do microrganismo, respectivamente. No HE são observadas leveduras pleomórficas, com corpos celulares pequenos, ovaladas ou alongadas que devido a retração da parede celular mostram-se envoltas por um halo de coloração clara, que podem se localizar no interior ou não de células fagocitárias. Quando corados pela prata metenamina de Gomori-Gracott, observam-se formas em naveta, arredondadas com brotamento simples ou múltiplos. Corados em PAS observa-se corpo celular basofílico, halo claro e rima periférica vermelha. No entanto, as formas parasitárias do agente podem não ser visualizadas, mesmo em casos de lesões ativas, com cultura positiva (MIYAJI; NISHIMURA, 1982; MARQUES et al., 1993, FLEURY et al., 2001; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

A reação inflamatória observada no exame histopatológico resultante das formas clínicas de esporotricose é predominantemente piogranulomatosa composta principalmente por células polimorfonucleares e células gigantes. A formação de granulomas com microabscedação central pode ser observada na epiderme, derme, tecido subcutâneo e/ou outros tecidos, na forma sistêmica da enfermidade. O granuloma causado pelo *S. schenckii*, de forma geral apresenta centro supurativo, necrótico, circundado por inflamação granulomatosa epitelióide, com grande número de células gigantes, multinucleadas e halo linfoplasmocitário circundado por tecido de granulação e fibrose (MIYAJI; NISHIMURA, 1982, MORRIS-JONES, 2002; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

Os mecanismos de defesa frente ao *S. schenckii* não estão completamente elucidados. Estudos prévios descrevem a imunidade celular representando um importante papel na defesa do organismo, visto que a micose se manifesta de forma mais grave em animais experimentais atímicos (DICKERSON; TAYLOR; DRUTZ, 1983; CARLOS et al., 1992; TACHIBANA; MATSUYAMA; MITSUYAMA, 1999; FERNANDEZ et al., 2000; MAIA et al., 2006). Neste contexto os neutrófilos, macrófagos e células dendríticas são as principais células de defesa por

desempenharem funções de fagocitose, ativação da imunidade adaptativa através da produção de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, além de realizarem o processo de apresentação de antígenos (ROMANI; FRANCESCO; PUCETTI, 2002; ROMANI, 2004; SHOHAM; LEVITZ, 2005; UENOTSUCHI et al., 2006).

Tachibana, Matsuyama e Mitsuyama (1999) demonstraram que a imunidade adquirida contra *S. schenckii* é principalmente realizada pelos macrófagos ativado por interferon-gama (IFN- γ) produzido por LT CD4⁺. Esses dados também foram observados em estudos realizados por Fernandez et al. (2000) onde foi descrito que macrófagos peritoneais de camundongos são capazes de eliminar o agente apenas após ativação celular com IFN- γ e LPS com concomitante produção de óxido nítrico (NO). Nesse mesmo estudo foi observado que e os animais experimentais que não possuíam o gene para IFN- γ eram mais suscetíveis à esporotricose sistêmica. O papel protetor do NO durante o processo infeccioso, foi confirmado após a observação de que animais infectados e tratados com inibidor da NO sintase tinham uma menor sobrevivência (FERNANDEZ et al., 2000).

Estudos demonstraram que a resposta imune celular é deprimida entre a quarta e sexta semana de infecção, quando é possível observar um aumento na multiplicação fúngica, em animais experimentais, indicando um agravamento da doença. Essa depressão na imunidade pode em parte ser devido à produção anormal de interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pelos macrófagos ativado, prejudicando assim a amplificação da resposta imune (CARLOS et al., 1992;1994; CARLOS; SGARBI; PLACERES, 1999, MAIA et al., 2006). Estudos recentes em ratos inoculados experimentalmente evidenciaram que antígeno de *S. schenckii* induz resposta humoral específica com a presença de IgG1 e IgG3. Altos níveis de IgG1 contribuem para que a imunidade humoral controle a infecção, visto que essa é uma importante imunoglobulina na neutralização do antígeno, estando envolvido com a opsonização e aumento da eficiência na fagocitose (NASCIMENTO; ALMEIDA, 2005).

2.3 Tratamento da esporotricose

Os fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento da esporotricose compreendem o iodeto de potássio, anfotericina B, itraconazol, terbinafina e fluconazol. A escolha terapêutica é dependente da forma clínica, extensão das lesões cutâneas, efeitos colaterais e envolvimento sistêmico da micose (NOBRE et al., 2002b; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

Os iodetos, em especial o iodeto de potássio, foram as primeiras substâncias a serem utilizadas na terapia da esporotricose, representando alternativa eficaz e de baixo custo. Porém, em Medicina Veterinária teve seu uso limitado, devido aos freqüentes efeitos tóxicos principalmente na espécie felina (ZAPEDA et al., 1990; KELLY; KLARRK, 1991; FARIAS et al., 1997; COSKUN et al., 2004).

A anfotericina B, por sua vez, foi introduzida em 1956 e permanece sendo um fármaco muito utilizado para as formas sistêmicas da enfermidade. No entanto, devido a sua toxicidade, principalmente renal, tem seu uso restrito nos animais domésticos (GALLIS; DREW; PICKARD, 1990; HOPPE-TICHY, 1997).

A terbinafina, antifúngico do grupo das alilaminas, tem sido avaliada como uma alternativa para o tratamento da esporotricose, sendo que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram boa atividade frente ao *S. schenckii*, assim como, boa tolerabilidade e ação no tratamento da esporotricose cutânea e cutânea linfática. (KAUFFMAN; HAIJJEH; CHAPMAN, 2000; MORISHITA et al., 2001; ODDS, 2003; COSKUN et al., 2004; TRILLES et al., 2005; KHOLER et al., 2006; MEINERZ et al., 2007a).

Os antifúngicos do grupo dos azóis são estruturalmente relacionados, compondo fármacos de amplo espectro com similar mecanismo de ação, variando a farmacocinética, toxicidade e uso clínico. A estrutura química compreende basicamente, um ou mais anéis de cinco átomos de carbono (anel azólico), unidos ao restante da molécula por ligações do tipo C-N. Os imidazóis contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico e os triazóis, por sua vez foi introduzido um terceiro átomo de nitrogênio. A substituição do anel imidazólico por triazólico favoreceu o amplo espectro de ação e seletividade para o citocromo P450 da célula fúngica com isso o itraconazol, antifúngico triazol, se liga mais especificamente ao citocromo celular fúngico do que àqueles pertencentes aos mamíferos, diminuindo a interação com o sistema enzimático humano e animal (PIERARD; ARRESE; PIERARD-FRANCHIMONT, 2000; FARIAS; GILFFRIDA, 2002; CATALÁN; MONTEJO, 2006).

2.3.1 Itraconazol

Atualmente o itraconazol é o principal antifúngico para uso em Medicina Veterinária, surgiu na década de noventa como uma alternativa terapêutica eficaz e com menos efeitos colaterais em comparação aos antifúngicos normalmente utilizados para o tratamento da esporotricose. No entanto o uso indiscriminado dos azóis tem ocasionado resistência, com isso falha terapêutica e recidiva da doença (KAUFFMAN; HAIJJEH; CHAPMAN, 2000; ROCHETTE; ENGELEN; VANDEN BOSSCHE, 2003; KOHLER et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004; CATALÁN; MONTEJO, 2006).

O mecanismo de ação do itraconazol baseia-se na capacidade do fármaco de bloquear a síntese do ergosterol, um componente vital da membrana da célula fúngica. Isso ocorre através da inibição seletiva da enzima 14 alfa-demetilase, dependente do citocromo P-450, que participa da conversão de lanosterol a ergosterol. Conseqüentemente há um acúmulo de uma série de precursores metilados com a concomitante diminuição, ou mesmo a ausência, do produto final da via biossintética. Este bloqueio acarreta o aumento da permeabilidade da membrana celular, desencadeando alterações morfológicas que resultam em inibição do crescimento fúngico e necrose celular. A atividade é primariamente fungistática, podendo ser fungicida em doses elevadas frente a determinadas espécies fúngicas (JAHAM; PARADES; PAPICH, 2000; FARIAS & GILFFRIDA, 2002; NOBRE et al., 2002b).

O itraconazol é altamente lipofílico apresentando baixa solubilidade em soluções aquosas e rápida absorção pela via oral, aconselhando-se a sua administração juntamente com refeições ricas em lipídios para sua melhor biodisponibilidade. A absorção é dependente do pH gástrico, assim para melhores resultados sugere-se que seja evitada a administração simultânea à fármacos que provoquem a diminuição da acidez estomacal como cimetidina e ranitidina. O antifúngico tem ampla distribuição tecidual, explicando a sua ação em diferentes sítios anatômicos de infecção, contudo apresenta pouca concentração no fluido cérebro-espinhal, saliva e fluidos oculares. A sua metabolização é hepática, sendo eliminado principalmente através das fezes e em menor quantidade na urina (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2004; CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Devido as suas propriedades farmacológicas, o itraconazol vem sendo amplamente empregado na terapêutica das micoses superficiais e sistêmicas inclusive em pacientes imunocomprometidos. Em especial para a esporotricose, o fármaco demonstrou grande atividade em estudos *in vitro* e *in vivo*, em pacientes apresentando as formas cutâneas, linfocutâneas e extra-cutâneas da micose em doses variando de 100 a 400mg/dia (WINN et al., 1993; BADLEY; VAN SCOY, 1996; MATSUMOTO et al., 2000; BONIFAZ et al., 2001; MCGINNIS et al., 2001; STALKUP; BELL; ROSEN, 2002; BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004, ALVARADO-RAMÍREZ & TORRES-RODRÍGUEZ, 2007; MEINERZ et al., 2007a).

Em Medicina Veterinária, o itraconazol é indicado para o tratamento da dermatofitose, blastomicose e aspergilose nasal em cães nas doses de 5 a 10mg/kg. Em felinos é utilizado no tratamento das dermatofitoses e criptococose nas mesmas doses prescritas para cães, sendo que para a esporotricose as doses podem variar de 10 a 40mg/kg (NOBRE et al., 2002a; ROCHETTE; ENGELEN; VANDEN BOSSCHE, 2003; SCHUBACH et al., 2004).

Mesmo sendo considerado um fármaco com reduzida toxicidade, são descritos como os principais efeitos adversos anorexia, hipocalcemia, náuseas, vômitos, hipertensão e cefaléia. Pode haver ainda aumento de enzimas hepáticas como a fosfatase alcalina. O fármaco é contra-indicado na gravidez, lactação e em pacientes com doença hepática. Em felinos foram descrito efeitos como anorexia e ocasionalmente sinais gastrointestinais (AMICHAÏ; GRUNWALD, 1998; KAUFFMANN; HAIJJEH; CHAPMAN, 2000; ROCHETTE; ENGELEN; VANDEN BOSSCHE, 2003).

2.4 β (1-3) glucana

Os polissacarídeos presentes na parede celular fúngica apresentam a capacidade de alterar a resposta imunológica, sendo assim denominados imunomoduladores. Farmacologicamente têm sido classificados como modificadores de resposta biológica (BRM) apresentando diversas aplicações. São crescentes os estudos envolvendo essas estruturas, se destacando os relacionados à ativação de células do sistema imune assim como a avaliação da atividade antitumoral frente a diferentes modelos e ativação do sistema de coagulação. (SAITÔ et al., 1991; ARINAGA et al., 1992; ADACHI; OHNO; YADOMAE, 1993; BOHN; BeMILLER, 1995; MÜLLER et al., 1996; YOSHIZAWA et al., 1996; Di LUZIO, 1999; MIZUNO et

al., 1999; TZIABANOS,2000; COOK et al., 2001; HAN et al., 2001; PELIZON et al., 2005; ARAÚJO-FILHO et al., 2006; MARQUES et al., 2006; SILVA et al., 2006).

Entre os polissacarídeos mais estudados estão as β -glucanas, tanto particuladas quanto as solúveis em água, as quais podem ser obtidas de diversas espécies de plantas e microrganismos (WAKSHULL et al., 1999; TZIABANOS, 2000). Pesquisadores vêm estudando desde 1940 um produto com atividade imunomodulatória derivado da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* denominado Zimosan (constituído de proteínas, lipídios e polissacarídeos), sendo que na década de 60 foi relatada que a substância ativa deste produto era o polissacarídeo β - D - glucana (RIGGI; DI LUZIO, 1961; FITZPATRICK; DICARLO, 1964).

A parede celular do *Saccharomyces cerevisiae* é formada por três componentes principais, sendo o maior deles a glucana. Este polímero de glicose possui ligações $\beta(1-3)$ e $\beta(1-6)$ seguido de mananaproteínas constituídas de polímeros de manose (20 -23%) e quitina um polímero de $\beta(1-4)$ N-acetilglicosamina (2%). As mananaproteínas se localizam na parte externa da parede celular, enquanto as glucanas e a quitina na região interna adjacente a membrana plasmática. As $\beta(1-3)$ são sintetizadas a partir da membrana plasmática pela enzima $\beta(1-3)$ sintetase, enquanto a $\beta(1-6)$ é sintetizada no interior do retículo endoplasmático. Cerca de 85% das glucanas encontradas na parede do *S. cerevisiae* são compostas por ligações $\beta(1-3)$ enquanto somente 3% são de ligações $\beta(1-6)$. As cadeias de $\beta(1-3)$ glucana possuem uma estrutura helicoidal tripla e as suas principais funções são manter a rigidez e a forma celular (SANDULA; MACHOVA; HRIBALOVA, 1995; KLIS et al., 2002; KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006).

Ainda não está completamente elucidada qual a estrutura básica necessária para o desencadeamento da atividade biológica das glucanas. Sabe-se que as características físico-químicas, entre elas solubilidade, peso molecular, conformação espacial e quantidade de ramificações $\beta(1-6)$ presente na partícula utilizada, podem influenciar no tipo de estimulação (BROWN; GORDON, 2003). Assim, as glucanas com altos pesos moleculares e insolúveis, estimulam de forma eficaz o sistema imune, porém podem causar diversos efeitos colaterais como formação de abscessos, asma e em casos extremos toxicidade letal quando associada a

determinados fármacos antiinflamatórios (BOHN; BeMILLER, 1995; OHNO et al., 1995; MIZUNO, 1999; BROWN & GORDON, 2005).

As β (1-3) glucanas estimulam o sistema imune do hospedeiro frente a diferentes microrganismos, além de serem moduladoras da resposta celular e humoral. Estudos comprovam a sua ação antitumoral e estimulante da hematopoiese, assim como descrevem as suas propriedades antioxidantes e hipocolesterêmica (REYNOLDS et al., 1980; PATCHEN; MACVITTIE, 1985; CZOP; AUSTEN, 1985; BOHN; BeMILLER, 1995; MEIRA et al., 1996; KELLOFF et al., 1999; TOKUNAKA et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2001; LEE et al., 2002; PELIZON, et al., 2005; PICKA, et al., 2005; ARAÚJO-FILHO et al., 2006; MARQUES et al., 2006; AI et al., 2007, SENER; TOKLU; CETINEL, 2007).

As glucanas são reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro através de receptores de superfície, que auxiliam no reconhecimento e controle de patógenos fúngicos. Porém essa ativação do sistema imune é prejudicada pela camada externa da parede celular composta por mananas. Os receptores para D-manose, por sua vez, não são expressos em monócitos circulantes e a sua expressão em macrófagos é regulada por glicocorticóides que aumentam sua expressão e pela liberação de interferon gama (IFN- γ) que age de forma inversa diminuindo sua expressão. Várias células dos mamíferos possuem receptores capazes de reconhecer e interagir com a β glucana principalmente leucócitos, incluindo macrófagos, monócitos, neutrófilos e Natural Killer (NK), assim como células endoteliais, e os fibroblastos (STAHL et al., 1984; BROWN; GORDON, 2003; BORCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004; ROEDER et al., 2004; NETEA; VAN DER MEER; KULLBERG, 2006; BROWN, 2006). Os receptores de β -D-glucanas conhecidos são CR3, lactosilceramida e dectin-1 sendo que destes o último parece ter um papel essencial na ativação da defesa do hospedeiro (TAYLOR et al., 2002; ADACHI et al., 2004; BROWN; GORDON, 2005; BROWN, 2006).

O receptor de complemento CR3 é expresso em células mielóides, células NK, e em alguns linfócitos, tem função de adesão celular e de estímulo a fagocitose em partículas de iC3b (molécula do sistema complemento) opsonizadas e não opsonizadas. Lactosilceramida é um glicoesfingolipideo encontrado em muitas células entre elas os linfócitos. O receptor dectin-1 é considerado o de maior importância na ativação das células imunes, possui dois ligantes um para polissacarídeos exógenos e outro co-estimulatório de células T. Estes receptores

localizam-se nas células dendríticas, células de Langerhans da pele, monócitos/macrófagos e neutrófilos (ROSS et al., 1999; TAYLOR et al., 2002; ZHANG et al., 2002; GANTNER et al., 2003; ADACHI et al., 2004; BROWN; GORDON, 2005). Estudos evidenciaram que macrófagos peritoneais de camundongos possuem receptores para β -glucanas, agindo através da ativação dessas células, caracterizada principalmente pela secreção de IL-1, IL-6, TNF- α , além da produção de NO, O₂, H₂O₂ e aumento da atividade fagocítica (ABEL; CZOP, 1992; SAKURAI; OHNO; YODAMAE, 1992; ADACHI; OHNO; YADOMAE, 1993; OKASAKI et al., 1995; 1996).

Estudos *in vivo*, utilizando glucana por via intraperitoneal para tratamento de peritonite por *Escherichia coli*, demonstraram resultados satisfatórios, onde o grupo tratado apresentou bacteremia decrescente após seis horas de inoculação, enquanto o controle apresentou bacteremia progressiva. Neste mesmo estudo foi observada ainda uma redução significativa, de 81% para 9% na mortalidade dos animais (WILLIAMS; BROWDER; DI LUZIO, 1983). Outros autores verificaram que animais experimentais tratados com a glucana e submetidos à sepse, tiveram maior sobrevida, assim como menor quantificação nas unidades formadoras de colônias bacterianas em detrimento dos grupos controle (DI LUZIO et al, 1979; CRISPIM; MEDEIROS; SALES, 2004; ARAUJO-FILHO et al, 2006). Da mesma forma Lahnborg, Kedstron e Nord (1982), ao produzirem sepse intra-abdominal em ratos, obtiveram mortalidade de 80% no grupo controle, 40% no grupo ampicilina enquanto que no grupo ampicilina com glucana todos os ratos sobreviveram. Em outro estudo, com animais infectados por *Staphylococcus aureus*, foi demonstrado que a associação do imunoestimulante ao antibiótico apresentou de oito a vinte vezes mais eficácia quando comparado aos animais que receberam somente o antibiótico (KAISER; KERNODLE, 1998).

Em se tratando das doenças fúngicas, recentemente Azevedo e colaboradores (2005), relataram um caso de cromoblastomicose pelo fungo *Fonsecaea pedrosoi* refratário ao tratamento com 400mg de itraconazol durante três anos. Foi instituída a terapia com a glucana associada ao antifúngico, na dose de 5mg uma vez por semana via intramuscular, e após um mês de tratamento foi possível observar regressão lenta das lesões. A resposta imune também foi modificada. Antes do tratamento com o imunoestimulante o paciente apresentava

redução no número de linfócitos, produção preferencial de IL-10 e TNF- α , sem ser detectado IFN- γ e após a administração da glucana foi observado o aumento significativo na linfoproliferação, diminuição de IL-10 e aumento significativo de IFN- γ e TNF- α .

O uso de glucana como tratamento preventivo das micoses foi avaliado por Pelizon et al (2005), onde camundongos foram tratados com glucana pela via intraperitoneal e posteriormente inoculados com o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Os resultados demonstraram que os macrófagos peritoneais do grupo β glucana tiveram uma atividade microbicida maior do que o grupo não tratado, verificado pela menor quantidade de unidade formadora de colônia e uma maior produção de IL-12 e TNF- α sob estímulo do *S.aureus* no grupo tratado previamente com glucana.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelo experimental

Para a realização do estudo foram utilizados 100 ratos albinos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, cepa UFPel, machos, com oito semanas de idade e peso variando de 320 a 380 gramas. Os animais foram alojados por um período de oito semanas na sala de experimentação do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) com controle de temperatura, umidade, ventilação, ciclo de claro e escuro de 12 horas, recebendo dieta de acordo com o peso corporal e água *ad libitum*.

Este estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pelotas-UFPel.

3.2 Grupos experimentais

Foram constituídos quatro grupos experimentais com 25 animais cada sendo eles: Grupo controle (G1), grupo Itraconazol (G2), grupo Itraconazol associado a β (1-3) glucana (G3) e grupo β (1-3) glucana (G4) (Tab. 1).

Tabela 1- Grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

Grupos experimentais	Tratamento
G1	Tratado com água destilada estéril
G2	Tratado com 10 mg/Kg de Itraconazol
G3	Tratado com 10 mg/Kg de Itraconazol + 0,5 mg de β (1-3) glucana
G4	Tratado com 0,5 mg de β (1-3) glucana

3.3 Isolado de *Sporothrix schenckii*

Foi utilizado isolado de *S. schenckii* pigmentado e termotolerante (MIC-116), proveniente de um felino com esporotricose disseminada (Fig. 1). O fungo foi armazenado na Micoteca do Setor de Micologia do Laboratório de Doenças Infecciosas – Faculdade de Veterinária/UFPel/RS, sendo mantido na sua fase micelial a partir de subculturas em tubos contendo meio Ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol com cicloheximida e preservados sobre refrigeração em temperatura média de 4°C, realizando subcultivos em intervalos de seis meses como o recomendado por Kohler et al., (2004).



Figura 1- Colônia filamentosa de *Sporothrix schenckii* em Ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida proveniente de esporotricose disseminada felina (Setor de Micologia, FV-UFPel)

3.4 Preparo do inóculo fúngico

O inóculo fúngico foi preparado a partir de colônia filamentosa do *S. schenckii* cultivada em meio ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol com cicloheximida a 25°C por um período de 10 dias. Fragmentos da colônia foram removidos do meio de cultura com auxílio de lâmina de bisturi estéril e transferidos para um tubo contendo solução salina tamponada (PBS) (Fig. 2A e 2B), filtradas em camada dupla de gaze estéril, centrifugadas (1500 rpm/ 15 minutos) e lavadas duas vezes com PBS, homogeneizada e padronizadas em 2×10^3 células de *S. schenckii*/ml (Fig. 2C e 2D).

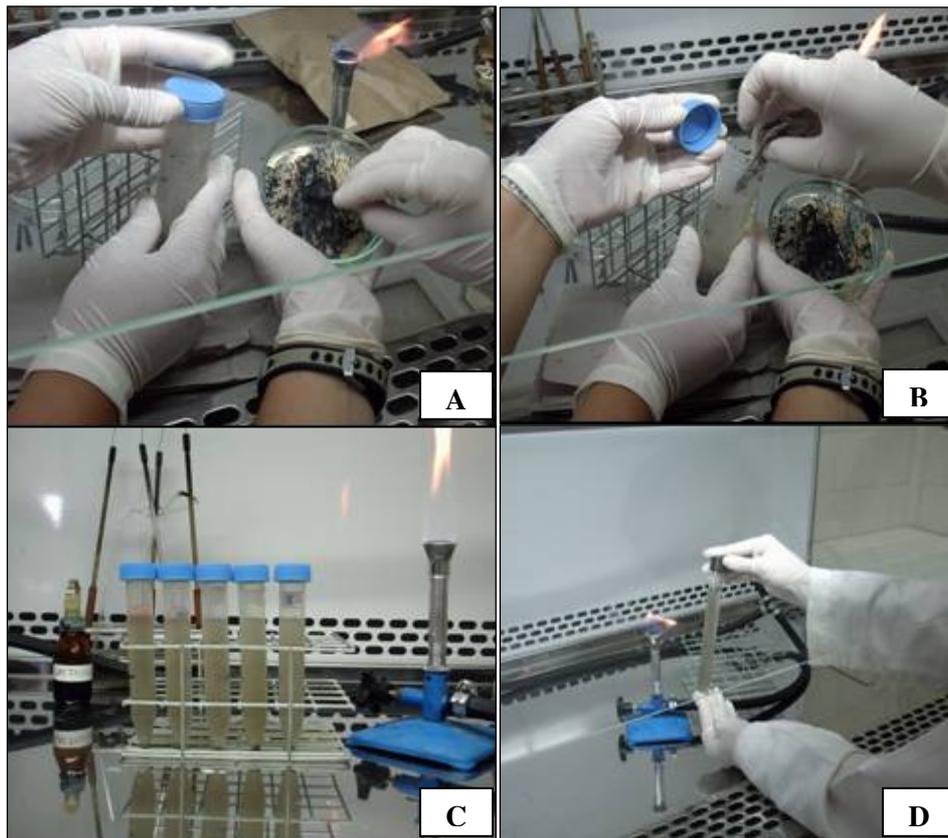


Figura 2- Preparo do inóculo fúngico. (A) Retirada de fragmentos da colônia de *Sporothrix schenckii* do meio de cultura com auxílio de lâmina de bisturi estéril; (B) Transferência dos fragmentos fúngicos para tubo de ensaio contendo solução salina tamponada estéril (PBS); (C) Inóculo fúngico após filtragem e lavagem em PBS; (D) Inóculo de *S. schenckii* padronizado em 2×10^3 células/ml (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

3.5 Inoculação experimental

Os animais foram inoculados pela via subcutânea no coxim plantar direito, utilizando seringa de insulina contendo 0,1 ml de suspensão do inóculo fúngico com 2×10^3 células de *S. schenckii*/ml (Fig. 3).



Figura 3- Inoculação subcutânea no coxim plantar direito com a suspensão fúngica contendo 2×10^3 células de *S. schenckii*/ml (Setor de Micologia, FV-UFPel)

3.6 Tratamento dos animais experimentais com esporotricose cutânea

O tratamento dos animais experimentais foi iniciado doze dias após a inoculação, quando estes apresentavam lesões características de esporotricose cutânea, como nódulos e úlceras.

Os animais foram tratados conforme o protocolo a seguir:

- G1: receberam 0,5ml de água destilada estéril, por via oral (VO) e 0,25 ml de salina estéril por via subcutânea (SC);
- G2: receberam 10mg/kg de itraconazol VO e 0,25 ml de salina estéril SC;
- G3: receberam 10mg/kg de itraconazol VO associado a 0,5mg de β (1-3) glucana SC;
- G4: receberam 0,5 ml de água destilada estéril VO e 0,5 mg β (1-3) glucana SC.

A água destilada estéril e o antifúngico foram administrados por via oral diariamente com auxílio de sonda orogástrica (Fig. 4A), enquanto a β (1-3) glucana e a solução salina foram administradas uma vez por semana por via subcutânea (Fig. 4B).

O itraconazol (Sporanox^{®1} – Janssen-Cilag) foi primeiramente macerado com auxílio de gral e pistilo e diluído em água destilada estéril. Posteriormente o fármaco foi homogeneizado em agitador (Vortex), sendo este procedimento realizado diariamente, obtendo-se assim a dose padrão de acordo com o peso de cada animal.

A β (1-3) glucana foi utilizada na forma comercial injetável com o nome de Imuno-glucan^{®2}.

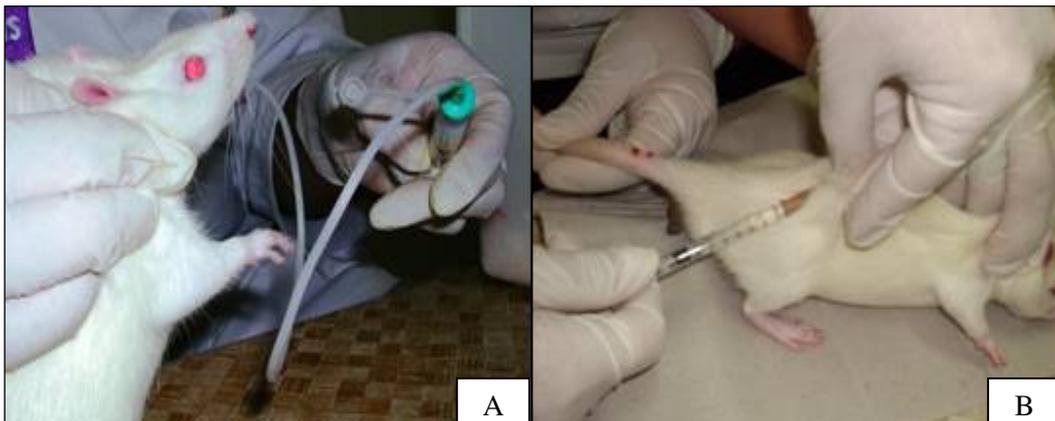


Figura 4- Administração dos fármacos; (A) animais experimentais tratados por via oral com auxílio de sonda orogástrica; (B) animais experimentais tratados por via subcutânea (Setor de Micologia, FV-UFPel)

¹ Sporanox[®] - Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda - Rua Gerivatiba, 207 - 11^º andar Butantã, São Paulo-SP, CEP 05501-900 e-mail: sac@janbr.inj.com

² Imuno-glucan[®] - Laboratório Hebron Farmacêutica – Rodovia BR 232, Km136, Bairro Agamenom Magalhães, Caruaru-PE, CEP: 55034-540. Farmacêutica Responsável: Rosa Lucia Carneiro da Silva hebron@hebron.com.br

3.7 Acompanhamento clínico

Foram escolhidos aleatoriamente 10 animais de cada grupo experimental para serem avaliados semanalmente quanto à evolução da esporotricose cutânea durante seis semanas de tratamento. Em todos os animais foi avaliado o local de inoculação, o desenvolvimento de lesões em outras áreas corpóreas e o estado geral de cada animal. A evolução clínica da esporotricose foi classificada conforme a formação de nódulos, presença de úlceras, exsudato e crostas assim como, pela regressão e cicatrização das lesões no ponto de inoculação.

3.8 Necropsia dos animais experimentais

Semanalmente foi realizada necropsia de três animais de cada grupo experimental, sendo a primeira realizada após uma semana de tratamento. Os animais foram eutanasiados com administração de Thiopental intraperitoneal conforme resolução do CFMV n° 714/2002.

Na necropsia foi avaliada a presença de lesões anatomopatológicas, bem como realizada a colheita do coxim plantar direito de cada animal para avaliação histopatológica, contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e retroisolamento do agente. Órgãos internos (fígado e baço), testículos e linfonodos poplíteos foram colhidos para retroisolamento do *S. schenckii* e avaliação histopatológica.

O mesmo procedimento anteriormente descrito foi realizado no restante dos animais no final do período experimental.

3.9 Retroisolamento do *Sporothrix schenckii*

O retroisolamento do agente foi obtido a partir de fragmentos teciduais coletados durante as necropsias provenientes do fígado, baço, testículo, linfonodo e demais órgãos caso fosse observado à presença de lesões características da micose. As amostras foram cultivadas em duplicata em placas contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida a 25°C e 37°C por até 10 dias para a caracterização macro e micromorfológica.

3.10 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Para a realização da contagem das UFCs, fragmento do coxim plantar direito coletado foi desinfetado com álcool 70%, dissecado e macerado em gral com auxílio de pistilo. Posteriormente esse foi lavado com água destilada estéril (10 ml) e filtrado em camada dupla de gaze estéril. O filtrado (0,1 ml) foi cultivado em diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) pela técnica de espalhamento sobre placa (em duplicata) em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, incubados a 25°C durante seis dias quando foi realizada a contagem das UFCs das três diluições, e após foi calculada a média final o resultado final (Fig. 5).

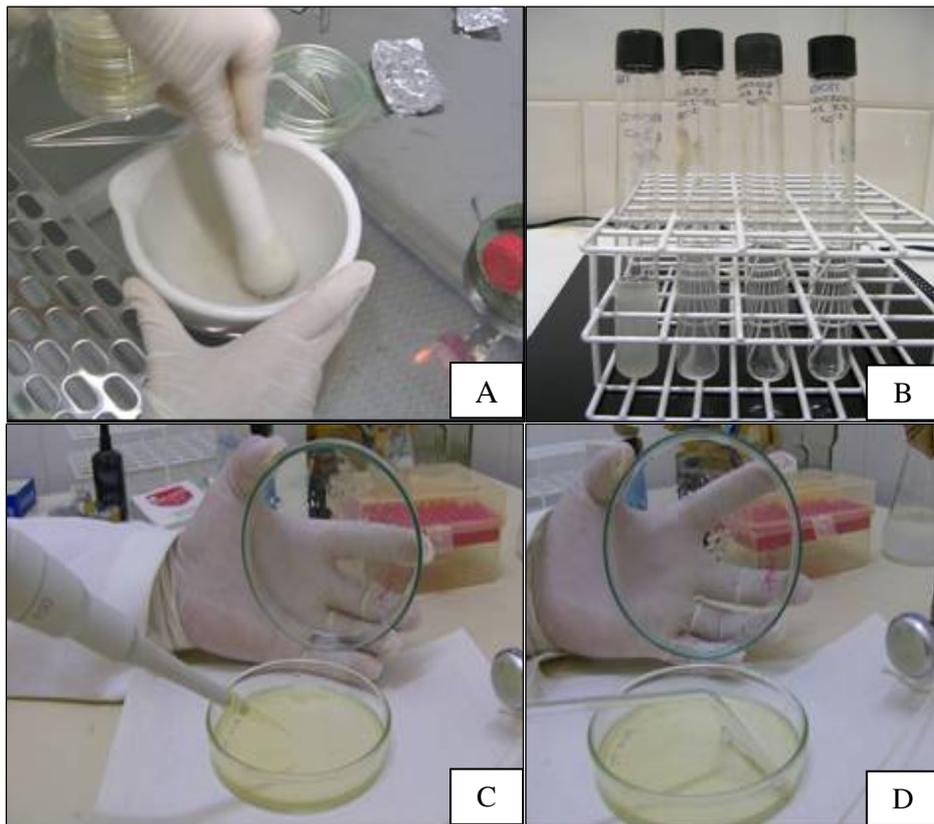


Figura 5- Procedimento para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC); (A) maceração do fragmento de lesão com o auxílio de grau e pistilo; (B) diluições seriadas da suspensão fúngica; (C) transferência da suspensão fúngica para placas; (D) suspensão fúngica semeada através da técnica de espalhamento com alça de Drigalski (Setor de Micologia, FV-UFPEl)

3.11 Avaliação histopatológica

As amostras de fragmentos teciduais obtidas a partir das necropsias foram fixadas em formol a 10%. Posteriormente foram incluídas em parafina. Os cortes histológicos foram corados através da coloração de hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de schiff (PAS). Após as lâminas histológicas foram observadas ao microscópio para pesquisa do agente e de lesões características da esporotricose.

3.12 Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada utilizando o programa Statistix 8.0 através da distribuição de freqüências semanais dos sinais clínicos e grau de evolução clínica. Para estimar as diferenças entre os tratamentos utilizou-se a análise variância e comparação entre as médias pelo método de Kruskal-Wallis e teste qui-quadrado, com significância mínima de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação clínica dos animais experimentais

4.1.1 Lesões no ponto de inoculação

Doze dias após a inoculação experimental a avaliação clínica revelou que todos os animais apresentavam lesões características da esporotricose com a presença de nódulos, úlceras e exsudato no coxim plantar direito (Tab. 2).

No decorrer do estudo as avaliações clínicas semanais demonstraram que, na segunda semana de tratamento, todos os animais do grupo controle (G1), 90% do grupo Itraconazol (G2), 80% do grupo Itraconazol + β glucana (G3) e 100% do grupo β glucana (G4) apresentavam o ponto de inoculação ulcerado. Nas semanas três e quatro 100% dos animais apresentavam úlceras com exsudato e presença de crostas no ponto de inoculação (Fig. 6A, 7A, 8A, 9A).

A partir da quinta semana os grupos experimentais começaram a se diferenciar, sendo visualizadas úlceras com exsudato e crostas em 50% do grupo G3 ($p < 0,05$), enquanto nos grupos G1, G2 e G4 foi observada a presença de úlceras ativas em 100%, 90% e 80% dos animais respectivamente. O restante dos animais, 10% do G2, 50% do G3 e 20% do G4 apresentavam processo cicatricial com início de regressão das lesões no ponto de inoculação.

Foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os três grupos tratados em relação ao controle na sexta semana do experimento, onde todos os animais pertencentes ao grupo controle apresentavam lesões ativas enquanto no grupo G3 70% dos animais apresentavam regressão das lesões e 20% ponto de inoculação cicatrizado, no grupo G2 e G4 40% dos animais em processo de cicatrização e 10% cicatrizado. Na sétima semana experimental apenas 10% dos animais do grupo G3 apresentavam úlceras ativas no ponto de inoculação, 60% estavam em processo de regressão das lesões e 30% apresentavam-se cicatrizados (Fig. 8B). No grupo G2 50% dos animais permaneciam com lesões ativas, 40% estavam em cicatrização

(Fig. 7B) e 10% cicatrizados. No grupo G4 60% permaneciam com úlceras, 30% em regressão (Fig. 9B) e 10% cicatrizados. Enquanto no grupo G1 somente 20% dos animais apresentavam processo de cicatrização e 80% permaneciam com lesões ativas no ponto de inoculação (Fig. 6B).

Entre os tratamentos, foi observado que o grupo de animais tratados com o itraconazol associado a β (1-3) glucana apresentou o menor tempo de permanência com lesões ativas no ponto de inoculação (3,7semanas) ($p < 0,05$), seguido pelo grupo tratado com o antifúngico (5,2 semanas), grupo tratado com a glucana (5,3 semanas) e por último o grupo controle com 6,2 semanas (Fig.10). No final do período experimental mesmo sendo observada diferença biológica entre os animais do grupo G3, em relação aos outros dois tratamentos, não foi verificado, diferença estatisticamente significativa ($p = 0,054$) Fig. 11,12,13).

Tabela 2 - Frequência de animais com esporotricose cutânea apresentando nódulos, úlceras e exsudato, regressão e cicatrização das lesões no ponto de inoculação conforme os grupos experimentais

GRUPOS																
SEM	CONT (G1)				ITRA (G2)				ITRA+GLUCANA (G3)				GLUCANA (G4)			
	N	UE	R	C	N	UE	R	C	N	UE	R	C	N	UE	R	C
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1*	70	30	-	-	60	40	-	-	70	30	-	-	40	60	-	-
2	-	100	-	-	10	90	-	-	2	80	-	-	-	100	-	-
3	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-
4	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-
5	-	100	-	-	-	90	10	-	-	50	40	10	-	80	20	-
6	-	100	-	-	-	60	40	-	-	10	70	20	-	60	40	-
7	-	80	20	-	-	50	40	10	-	10	60	30	-	60	30	10

SEM- semanas; N- nódulos; UE- úlcera e exsudato; R- regressão das lesões; C- cicatrizado; G1- grupo controle; G2- grupo tratado com de itraconazol; G3- grupo tratado com itraconazol e β (1-3) glucana; G4- grupo tratado β (1-3) glucana; * Primeira avaliação doze dias após inoculação e início de tratamento.



Figura 6- Animais pertencentes ao G1: (A) Lesão ulcerada e exsudativa no ponto de inoculação no início do período experimental (semana três); (B) Edema da pata inoculada envolvendo articulação tíbiotársica e presença de úlcera no ponto de inoculação no final do período experimental (semana sete) (Setor de Micologia, FV-UFPeI)



Figura 7- Animais pertencentes ao G2: (A) Lesão ulcerada no coxim plantar direito no início do período experimental (semana três); (B) lesão em processo de cicatrização no final do período experimental (semana sete) (Setor de Micologia, FV-UFPeI)



Figura 8- Animais pertencentes ao G3: (A) Lesão ulcerada e exsudativa no ponto de inoculação no início do período experimental (semana três); (B) Cicatrização no sitio de inoculação no final do período experimental (semana sete) (Setor de Micologia, FV-UFPel)

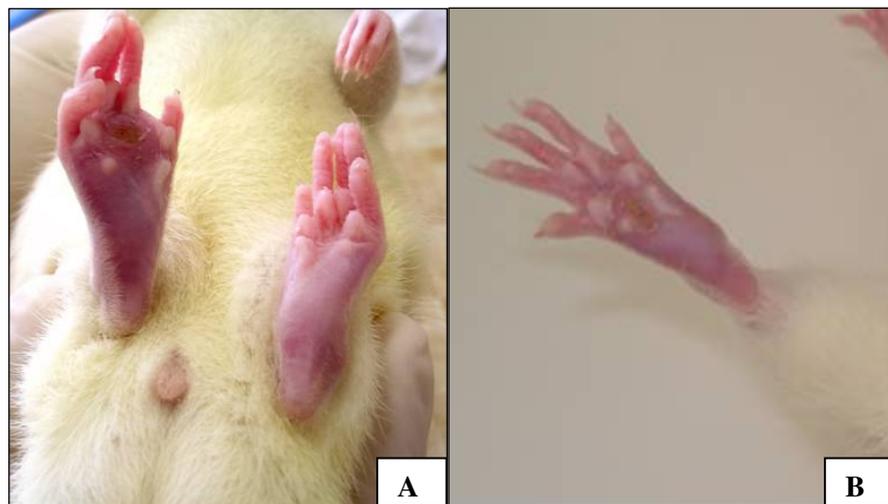


Figura 9- Animais pertencentes ao G4: (A) Lesão ulcerada e exsudativa no início do período experimental (semana três); (B) Lesão em processo de regressão no final do período experimental (semana sete) (Setor de Micologia, FV-UFPel)

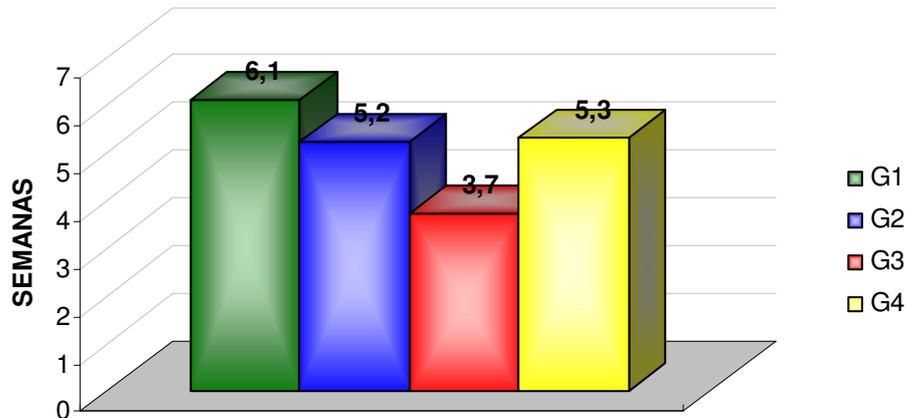


Figura 10- Período experimental correspondente a permanência de úlceras ativas no ponto de inoculação dos animais com esporotricose cutânea, conforme os grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPel)

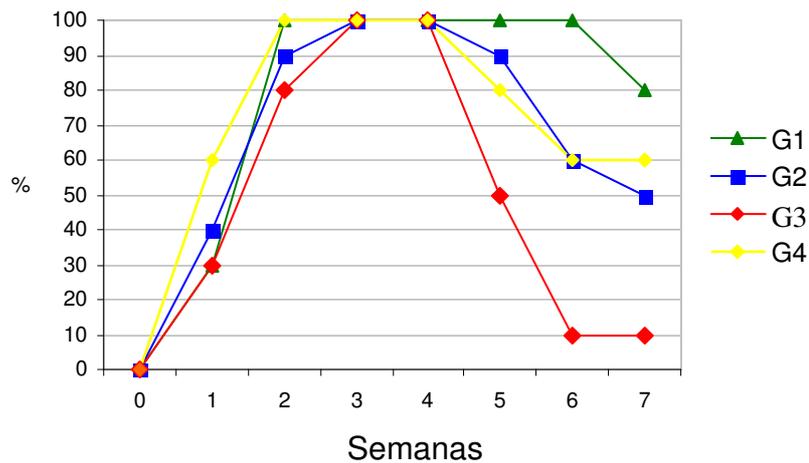


Figura 11– Evolução clínica da esporotricose cutânea em relação à permanência de úlceras e exsudato no ponto de inoculação. (G1)- grupos controle; (G2)- grupo itraconazol; (G3)- grupo itraconazol + β (1-3) glucana e (G4) grupo β (1-3) glucana (Setor de Micologia, FV-UFPel)

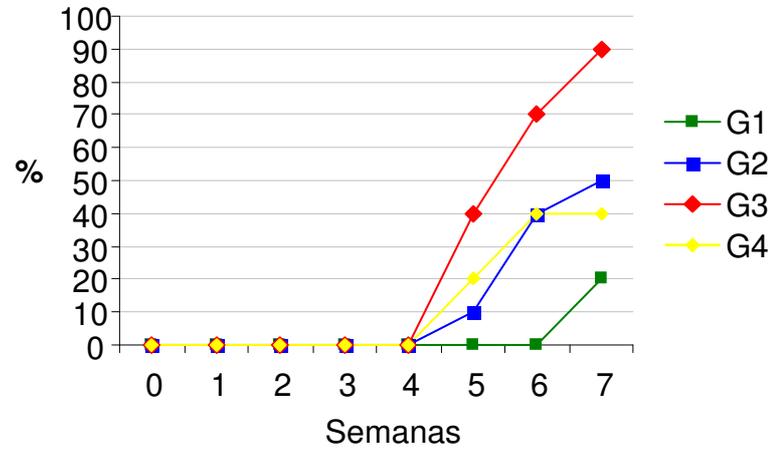


Figura 12- Frequência de regressões e cicatrização das lesões no ponto de inoculação dos animais com esporotricose cutânea experimental em sete semanas (Setor de Micologia, FV-UFPel)

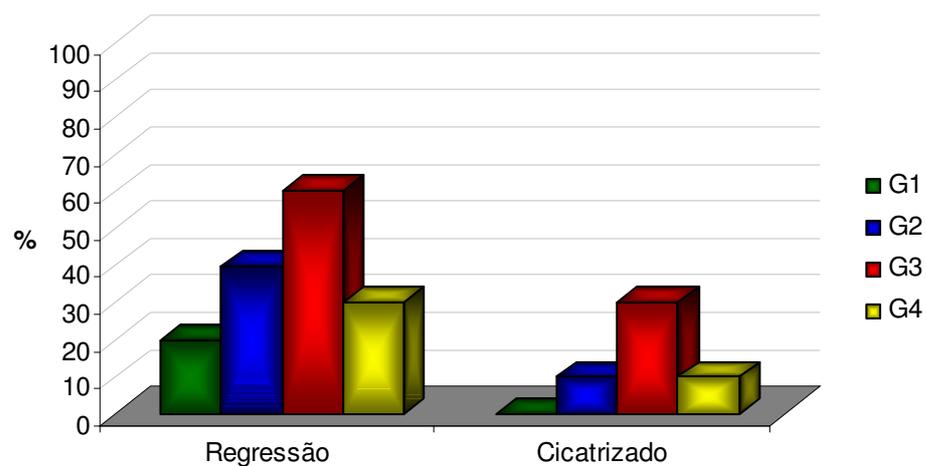


Figura 13- Frequência de animais com esporotricose cutânea em processo de regressão e cicatrizada no ponto de inoculação conforme grupo experimental ao término do período experimental (Setor de Micologia, FV-UFPel)

4.1.2 Presença de múltiplas lesões cutâneas

A partir da segunda semana de avaliação clínica, foram observadas lesões em outras áreas corpóreas nos animais experimentais. As regiões mais freqüentemente afetadas foram o dorso e articulação tibiotársica correspondente ao membro inoculado, membro anterior direito e cauda. As lesões eram caracterizadas pela presença de eritema, edema, nódulos e úlceras com presença de exsudato.

No grupo G1, na quinta e sexta semanas de experimento foram observadas múltiplas lesões em todos os animais. Estas se apresentavam inicialmente nodulares, evoluindo para úlceras, principalmente no dorso da pata, articulação tibiotarsiana, membro anterior direito e cauda (Fig. 14A e 14B), permanecendo 80% dos animais com lesões até o término do período experimental.

Quanto ao grupo G2, na quarta semana 80% dos animais desenvolveram lesões nodulares no dorso da pata inoculada e edema com posterior formação de nódulos e úlceras na articulação tibiotársica no mesmo membro inoculado (Fig. 14C). A partir da quinta semana houve regressão dessas lesões, chegando ao final do tratamento com 20% dos animais com permanência de lesão.

Em relação ao grupo G3, observou-se que 70% dos animais na quarta semana experimental apresentavam lesões múltiplas de esporotricose principalmente no dorso da pata e articulação (Fig. 14D). Na quinta semana foi observado o início de regressão dessas lesões, chegando ao final do período do estudo com somente 10% dos animais apresentando lesões múltiplas.

Em se tratando do grupo G4, o maior número de animais com lesões múltiplas ocorreu na quarta semana, correspondendo a 70% dos animais. As lesões estavam localizadas no dorso e articulação do membro inoculado e cauda (Fig. 14E). No final do tratamento 30% dos animais mantiveram múltiplas lesões.

A análise estatística demonstrou que os animais pertencentes aos grupos tratados (G2, G3 e G4) apresentaram diferenças ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, sendo que esses grupos tiveram menor freqüência de animais com múltiplas lesões no final do estudo (Fig. 15).

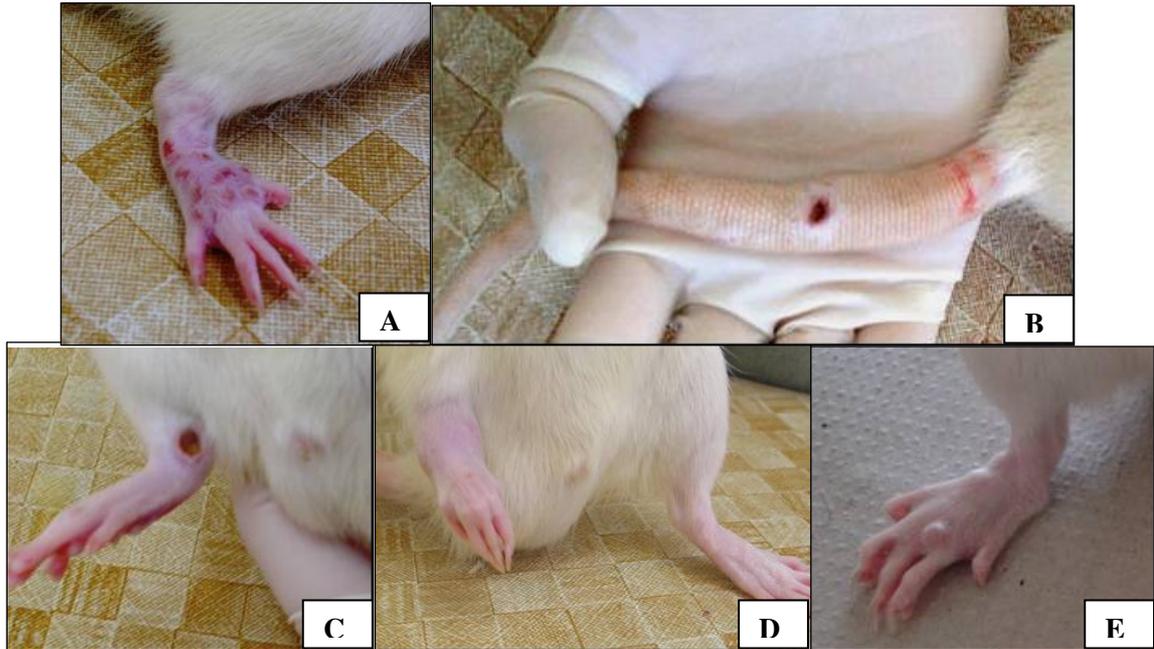


Figura 14- Animais experimentais apresentando lesões em outras áreas corpóreas: (A) animal do grupo G1 com lesões ulceradas localizadas no dorso da pata inoculada na quinta semana experimental; (B) animal do grupo G1 com lesão ulcerada localizada na cauda ao término do período experimental; (C) animal do grupo G2 com lesões ulceradas na articulação do membro inoculado; (D) animal do grupo G3 com edema na articulação tibiotarsiana na terceira semana experimental; (E) animal do grupo G4 com lesão nodular localizada no dorso da pata inoculada (Setor de Micologia, FV-UFPel)

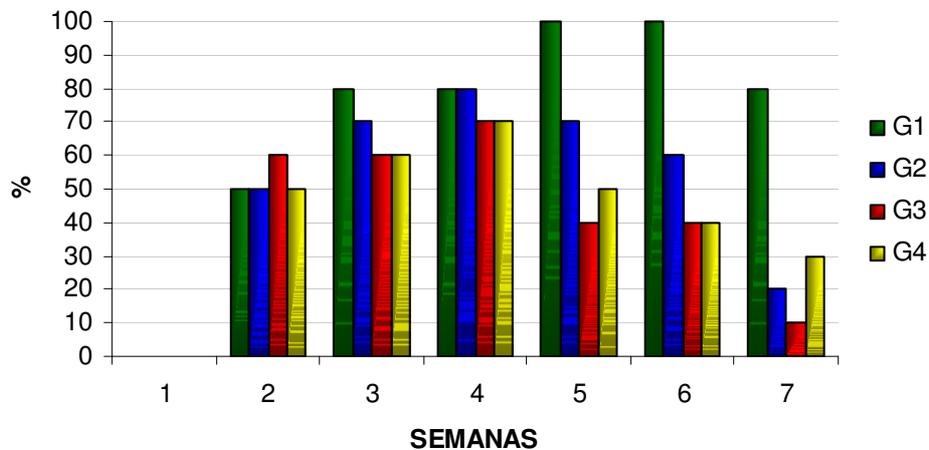


Figura 15- Frequência semanal de animais com esporotricose cutânea apresentando lesões em outras regiões corpóreas além do ponto de inoculação conforme os grupos experimentais (Setor de Micologia, FV-UFPel)

4.2 Alterações anatomopatológicas dos animais experimentais

Semanalmente foram realizadas necropsias, sendo feita a análise macroscópica dos órgãos internos de todos os animais a fim de avaliar o comprometimento sistêmico em cada grupo experimental. Foram coletados fígado, baço, testículos, linfonodo poplíteo e pulmão, sendo encaminhados para o retroisolamento do agente e análise histopatológica.

As principais alterações anatomopatológicas observadas foram aumento do linfonodo poplíteo e lesões puntiformes esbranquiçadas, localizada e/ou disseminada, no baço, fígado e pulmão (Fig. 16).

A análise estatística evidenciou que os animais pertencentes aos grupos tratados (G2, G3 e G4) diferiram $p < (0,05)$ em relação ao grupo controle (G1), demonstrando menor frequência ou ausência de alterações anatomopatológicas nos grupos tratados, no entanto não houve diferença significativa entre estes três grupos (tab. 3).

Tabela 3- Frequência de animais com alterações anatomopatológicas observadas durante as necropsias realizadas no decorrer do período experimental conforme cada grupo de tratamento (n=25).

Órgãos	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	G4 (%)
Baço	24	4	4	8
Fígado	40	12	8	16
Testículos	-	-	-	-
Linfonodo poplíteo	92	68	64	72
Pulmão	4	-	-	-

G1- grupo controle; G2- grupo Itraconazol; G3- grupo Itraconazol + β (1-3) glucana; G4- grupo β (1-3) glucana.

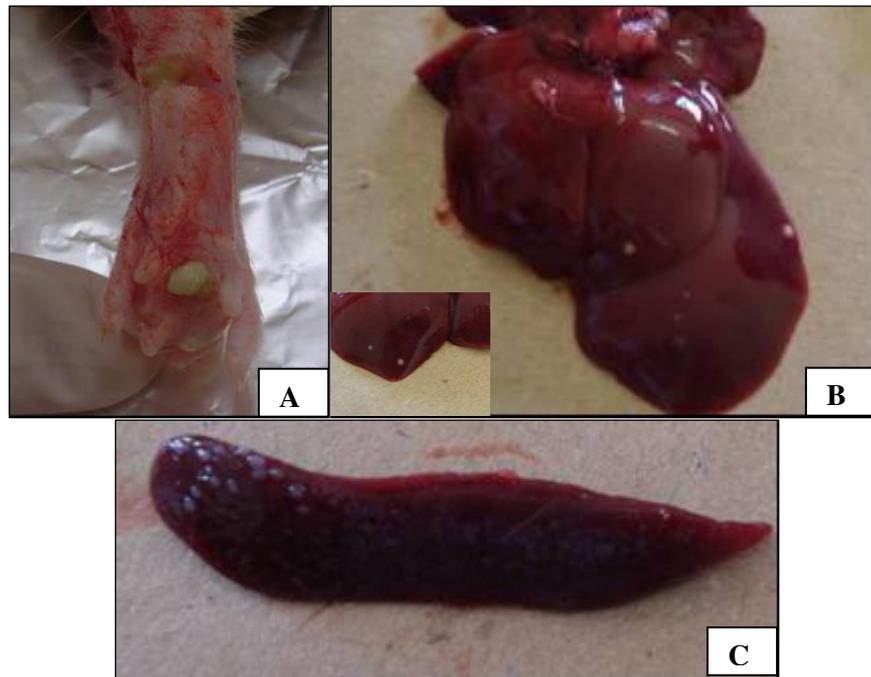


Figura 16- Alterações anatomopatológicas observadas na necropsia do grupo G1; (A) membro inoculado apresentado lesão com exsudato purulento no ponto de inoculação e articulação tibiotarsiana; (B) presença de lesões puntiformes esbranquiçadas no fígado (C) presença de lesões puntiformes esbranquiçadas no baço (Setor de Micologia, FV-UFPel)

4.3 Retroisolamento do *Sporothrix schenckii*

Ao final do experimento o retroisolamento do *S. schenckii* foi obtido em 54% (12/22) dos animais pertencentes ao G3. Nos grupos G1, G2 e G4 obteve-se, respectivamente, 95% (21/22), 86% (19/22) e 77% (17/22) dos órgãos com o cultivo positivo para o agente (Figura 17).

Os órgãos dos quais foram obtidos a maior frequência de retroisolamento de *S. schenckii* foram os linfonodos poplíteos, seguidos de testículos, fígado e baço (Fig. 18), e em um caso do grupo controle foi obtido o isolamento do tecido pulmonar.

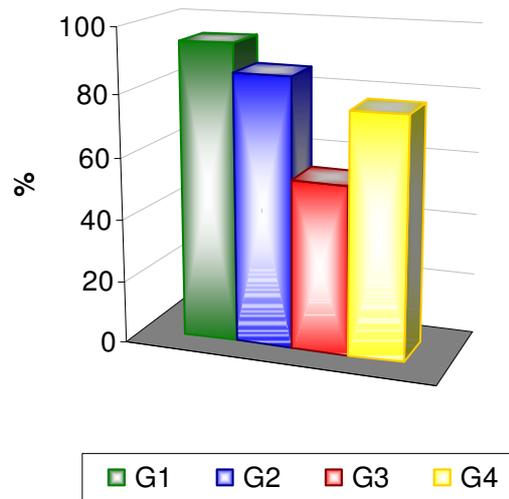


Figura 17- Frequência de retroisolamento positivo para *Sporothrix schenckii* obtido a partir dos órgãos internos conforme o grupo experimental (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

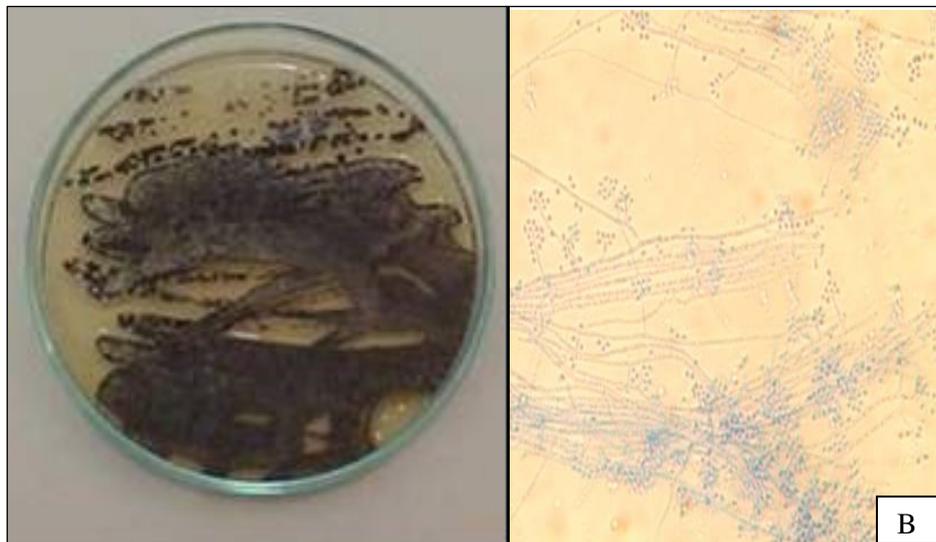


Figura 18- Retroisolamento positivo para o *Sporothrix schenckii* (A) Colônias filamentosas de *S. schenckii* apresentado coloração inicialmente creme passando a enegrecidas com o envelhecimento da colônia; (B) aspecto microscópico do agente apresentando hifas finas hialinas com conidióforos simpodiais frutificando conídios dispostos ao redor (Setor de Micologia, FV-UFPeI)

ERROR: syntaxerror
OFFENDING COMMAND: %ztokenexec_continue

STACK:

-filestream-
/GpPBeg1
-dictionary-
true
false